

**MÍRIAN RABELO DE FARIA**

**DINÂMICA DA COMUNIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA DE TRIGO  
DURANTE A INFECÇÃO POR *Bipolaris sorokiniana***

**Botucatu**

**2020**



**MÍRIAN RABELO DE FARIA**

**DINÂMICA DA COMUNIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA DE TRIGO  
DURANTE A INFECÇÃO POR *Bipolaris sorokiniana***

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Agronomia - Proteção de Plantas

Orientador: Wagner Bettiol

Coorientador: Rodrigo Mendes

**Botucatu**

**2020**

F224d

Faria, Mírian Rabelo de

Dinâmica da comunidade bacteriana da rizosfera de trigo durante a infecção por *Bipolaris sorokiniana* / Mírian Rabelo de Faria. -- Botucatu, 2020

114 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientador: Wagner Bettiol

Coorientador: Rodrigo Mendes

1. Agricultura. 2. Proteção de Plantas. 3. Microbioma. 4. Rizosfera. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título:

**"DINÂMICA DA COMUNIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA DE TRIGO DURANTE A INFECÇÃO POR *Bipolaris sorokiniana*"**

AUTORA: MÍRIAN RABELO DE FARIA  
ORIENTADOR: WAGNER BETTIOL  
COORIENTADOR: RODRIGO MENDES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. WAGNER BETTIOL  
Microbiologia Ambiental / Embrapa Meio Ambiente

Prof.ª Dr.ª RENATE KRAUSE SAKATE  
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP

Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO  
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu - UNESP

Prof. Dr. LUCAS WILLIAM MENDES  
Pós-Doutorando - Centro de Energia Nuclear na Agricultura / Universidade de São Paulo

Dr.ª MAIKE ROSSMANN  
Microbiologia Ambiental / Instituto de Química - USP

Botucatu, 29 de maio de 2020.



*Aos meus pais,*

*Marlene e José Martinho,*

*dedico*





## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por todas as oportunidades que tive durante a minha jornada de graduação, mestrado e doutorado e por permitir chegar ao final do projeto com saúde e sabedoria.

Aos meus pais, minha irmã Lílian e meu irmão Harley que sempre acreditaram no meu potencial e me incentivaram a lutar pelos meus objetivos. A todos os meus familiares que estiveram ao meu lado nesta jornada torcendo pela minha vitória.

À Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, por conceder a bolsa de doutorado.

Ao professor Wagner Bettiol, pela oportunidade de tê-lo como orientador no mestrado e doutorado, bem como pelos ensinamentos e incentivo durante a minha formação profissional.

Ao meu coorientador Rodrigo Mendes, pela orientação, por compartilhar o seu conhecimento e nos incentivar durante o trabalho de pesquisa e investigação científica

De forma especial, à Lilian Abreu, pela grande parceria no projeto, incentivo de todos os dias e ensinamentos nesta jornada. Compartilhamos inúmeros desafios, sempre com o espírito colaborativo e com esperança de grandes vitórias. Obrigada pelas palavras positivas de cada dia e pela amizade.

Aos colegas do grupo de Microbioma de plantas, pela colaboração ao longo dos anos. Em especial, à Josiane Chiaramonte, por compartilhar seu conhecimento e pela parceria durante as análises e desenvolvimento do trabalho; e à Maike Rossman, pelo auxílio no trabalho e com os dados e resultados

À Embrapa Meio Ambiente, por disponibilizar toda a estrutura de trabalho e aos funcionários do LMA pelos ensinamentos e auxílio nas atividades do projeto.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Ambiental “Raquel Ghini” da Embrapa Meio Ambiente, pela amizade, ajuda nas atividades e por vivenciar momentos tão importantes durante o período de doutorado.

À Unesp Botucatu – FCA e aos professores do Departamento de Proteção de Plantas, pela qualidade de ensino e oportunidade de enriquecer minha carreira.



## RESUMO

A comunidade microbiana da rizosfera desempenha várias funções, dentre elas a proteção de plantas. Abordagens sustentáveis vêm sendo exploradas utilizando o uso do microbioma da rizosfera para a proteção de plantas com intuito de reduzir os efeitos deletérios da agricultura intensiva. O objetivo do trabalho foi avaliar a dinâmica da comunidade bacteriana na rizosfera de genótipos de trigo, resistentes e suscetíveis a *Bipolaris sorokiniana*, fungo causador de podridão das raízes em trigo, ao longo de ciclos sucessivos de cultivo para identificar grupos bacterianos associados à supressão da doença. Esta hipótese foi testada avaliando a dinâmica da comunidade de rizobactérias durante a invasão do fungo *B. sorokiniana* na rizosfera de genótipos de trigo em monocultivo. Inicialmente foram avaliados 14 genótipos de trigo quanto à resistência ao patógeno. Os dois genótipos que apresentaram maior resistência (Frontana e IAC 5 Maringá) ou maior suscetibilidade (Karakilcik e Guamirim) a *B. sorokiniana* foram selecionados para avaliar a dinâmica das comunidades bacterianas da rizosfera em condições de plantio sucessivo sob a influência deste patógeno. Para isso, foram realizados cinco ciclos de cultivo dos quatro genótipos de trigo selecionadas em microcosmos. Em todos os ensaios a severidade da doença foi avaliada quatro semanas após a inoculação do patógeno, com auxílio de uma escala diagramática variando de 0 a 3. A comunidade rizobacteriana foi avaliada por meio de sequenciamento do fragmento do gene 16S RNAr e a dinâmica do patógeno foi avaliada utilizando qPCR. Os dados foram explorados por meio de análises multivariadas e de network. De maneira geral, os resultados indicaram aumento da progressão da doença nos genótipos resistentes Frontana e Karakilcik e redução nos níveis das doenças nos genótipos susceptíveis IAC 5 e Guamirim ao longo dos ciclos de cultivo. Separação das comunidades bacterianas durante os ciclos de cultivo para todos os genótipos, bem como entre os genótipos resistentes e suscetíveis foi observada. Ocorreu enriquecimento diferencial das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) na rizosfera dos genótipos de trigo mais contrastantes em relação à doença com maior número de táxons exclusivos observados nas plantas suscetíveis (Guamirim), no último ciclo de cultivo. Para estes genótipos, também foram observadas alterações no padrão de co-ocorrência entre os microrganismos. Como prova de conceito, após os cinco ciclos de cultivo, os genótipos mais contrastantes em relação ao progresso da doença (Frontana e Guamirim) foram selecionados para avaliação do efeito protetor da comunidade microbiana. O genótipo com maior índice de severidade da doença (Frontana) foi cultivado no solo previamente enriquecido com a sua própria rizosfera, no solo previamente cultivado como genótipo Guamirim e no *bulk soil*. Foi observada a redução da severidade da doença (53%) nas plantas do genótipo Frontana (resistente) cultivadas em solo enriquecido com a rizosfera do genótipo Guamirim (suscetível), indicando uma possível indução de supressividade neste solo promovida pelo genótipo susceptível. A análise de *network* revelou uma mudança na estrutura da comunidade por meio dos ciclos, enriquecendo as famílias bacterianas associadas à proteção das plantas e

diferentes funções metabólicas, isto é, *Chitinophagacea* e *Rhodospirillaceae*, durante a indução da supressão da doença no solo. Os dados metabolômicos mostraram que, quando a rizosfera é invadida pelo patógeno, em solos cultivados em todos os ciclos, o número e a diversidade de compostos são maiores que na ausência do patógeno. Os resultados em conjunto sugerem que o processo de defesa à doença está correlacionado com o recrutamento de grupos bacterianos específicos na rizosfera desses genótipos. Compreender a reorganização da comunidade bacteriana contra os fitopatógenos pode auxiliar em estratégias de manipulação do microbioma e na seleção de microrganismos chave para melhorar o desempenho das plantas.

**Palavras-chave:** Interação planta patógeno. Microbioma bacteriano. Proteção de plantas.

## ABSTRACT

The microbial community of the rhizosphere performs several functions, including plant protection. Sustainable approaches have been explored using the rhizosphere microbiome to protect plants in order to reduce the deleterious effects of intensive agriculture. The objective of this work was to evaluate the dynamic bacterial community in the rhizosphere of wheat genotypes resistant and susceptible to *Bipolaris sorokiniana* was evaluated along successive cultivation cycles to identify bacterial groups associated with disease suppression. This hypothesis was tested by evaluating the rhizobacteria community dynamics during the invasion of *B. sorokiniana* fungus in the rhizosphere of monoculture wheat genotypes. Initially, 14 wheat genotypes were evaluated for pathogen resistance. The two genotypes that presented higher resistance (Frontana and IAC 5 Maringá) or greater susceptibility (Karakilcik and Guamirim) to *B. sorokiniana* were selected to evaluate the dynamics of rhizosphere bacterial communities under successive planting conditions under the influence of this pathogen. For this, five cultivation cycles of the four wheat genotypes selected in microcosms were performed. In all trials, disease severity was assessed four weeks after pathogen inoculation using a diagrammatic scale ranging from 0 to 3. The rhizobacterial community was evaluated by 16S rRNA fragment sequencing and pathogen dynamics was evaluated using qPCR. Data were explored through multivariate and *network* analysis. Overall, the results indicated increased disease progression in resistant Frontana and Karakilcik genotypes and reduced disease levels in susceptible genotypes IAC 5 and Guamirim over growing cycles. A clear separation of bacterial communities was observed during cultivation cycles for all genotypes as well as between resistant and susceptible genotypes. Differential enrichment of operational taxonomic units (OTUs) occurred in the rhizosphere of the most contrasting wheat genotypes in relation to the disease with the largest number of exclusive taxa observed in susceptible plants (Guamirim) in the last cultivation cycle. For these genotypes, changes in the pattern of co-occurrence between the microorganisms were also observed. As a proof of concept, after the five cultivation cycles, the most contrasting genotypes regarding disease progression (Frontana and Guamirim) were selected to evaluate the protective effect of the microbial community. The genotype with the highest disease severity index (Frontana) was cultivated in soil previously enriched with its own rhizosphere, in soil previously cultivated as Guamirim genotype and in *bulk soil*. Disease severity reduction (53%) was observed in Frontana (resistant) genotype plants cultivated in soil enriched with the Guamirim (susceptible) rhizosphere, indicating a possible induction of suppressivity in this soil. *Network* analysis revealed a change in community structure across cycles, enriching bacterial families associated with plant protection and different metabolic functions, ie *Chitinophagaceae* and *Rhodospirillaceae*, during soil suppression induction. Metabolomic data showed that when the rhizosphere is invaded by the pathogen, in soils cultivated in all cycles, the number and diversity of compounds are higher when compared to other treatments. The results together suggest that the disease defense

process is correlated with the recruitment of specific bacterial groups in the rhizosphere of these genotypes. Understanding the reorganization of the bacterial community against phytopathogens can assist in microbiome manipulation strategies and selection of key microorganisms to improve plant performance.

**Key words:** Plant - pathogen interaction. Bacterial microbiome. Plant protection.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características químicas do solo utilizado nos experimentos. ....	43
Tabela 2 - Índices de Alpha diversidade entre os tratamentos e controle dentro dos ciclos (índice de riqueza Chao 1, índice de diversidade Shannon e Simpson). ....	63
Tabela 3 - Correlações e propriedades topológicas de <i>networks</i> da comunidade bacteriana da rizosfera de genótipos de trigo.....	74





## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Índice de severidade da doença para *Bipolaris sorokiniana* variando de 0 (plantas sem sintomas) a 3 (sintomas severos): 0 = sem sintomas, 1 = plantas infectadas com leve lesão escura apenas na folha do coleóptilo, 2 = plantas infectadas com sintomas moderados escuros ou avermelhados no colmo, 3 = plantas infectadas com sintomas escuros severos no colmo, acima da primeira folha e plantas mortas.....45
- Figura 2 - Desenho experimental dos bioensaios A. enriquecimento do microbioma da rizosfera de trigo com patógeno durante cinco ciclos B. enriquecimento do microbioma da rizosfera de trigo sem patógeno durante cinco ciclos (controle) e C. Ciclo de trocas de genótipos para avaliar a possível indução de supressividade.....50
- Figura 3 - Índice de severidade de doença de trigo causado por *Bipolaris sorokiniana* em genótipos de trigo dentre eles dois materiais ancestrais (Karakilcik) e Pakintan 81); três variedades modernas (Frontana, BH 1146 e IAC 5-Maringá) e três variedades modernas atualmente comercializadas (BRS Guamirim, Quartzo, IAC 385), outras variedades contrastantes quanto ao nível de resistência às doenças da parte aérea selecionadas de acordo com a recomendação da Embrapa Trigo (Sumai 3, Toropi, CEP24, BR18 Terena e BRS 194) e os controles caracterizado pelo cultivo de cada genótipo sem a inoculação do patógeno. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott's a 5% de probabilidade.....55
- Figura 4 – A. Análise de coordenadas principais restrita (CAP) para diferenças na comunidade rizosférica de genótipos de trigo ancestral e domesticados (BS = bulk soil, W1 = Iran, W2= Karakilcik, W3 = Pakintan, C1 = BH 1146, C2 = Frontana, C3 = IAC 5, C4 = Guamirim e C5 = Quartzo) (ROSSMANN et al, 2020). B. Índice de severidade da doença de genótipos de trigo causada por *Bipolaris sorokiniana*. Médias seguidas pela mesma letra não são significativas de acordo com o teste de Scott Knott's test ( $p < 0.05$ ).....56
- Figura 5 - Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) diferencialmente enriquecidas na rizosfera do genótipo Guamirim e IAC 5 obtidas pela análise diferencial (DESeq2). Os pontos representam as OTUs diferencialmente enriquecidas que estão em maior abundância em IAC 5 (resistente) (acima) e em Guamirim (suscetível) (abaixo). As OTUs estão demonstradas por classes no eixo das abcissas e coloridas de acordo com o filo que a OTU se origina ( $p < 0,05$ ; corrigido para FDR).....57

- Figura 6 - Dendrograma de similaridade de cada uma das amostras de rizosfera A. Agrupamento diferencial dos genótipos selecionados de IAC 5 (resistente) e Guamirim (suscetível) e índice de severidade da doença. B. Agrupamento por enriquecimento diferencial entre as amostras. Para análise de similaridade entre as amostras rizosféricas dos genótipos de trigo foi utilizado o índice de correlação de Spearman e o método UPGMA ..... 58
- Figura 7 - Heatmap da abundância absoluta de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) diferencialmente enriquecidas entre os genótipos contrastantes Guamirim (suscetível) e IAC 5 (resistente). O diagrama de cor no canto esquerdo superior indica o nível de abundância das OTUs..... 59
- Figura 8 - Índice de severidade da doença de genótipos de trigo contra *Bipolaris sorokiniana* em cinco ciclos de cultivo. A. Genótipos resistentes (Frontana e IAC 5). Colunas na cor azul escuro representam os tratamentos com patógeno e colunas na cor azul claro sem patógeno. B. Genótipos suscetíveis (Guamirim e Karakilcik). Colunas na cor vermelho escuro representam os tratamentos com patógeno e colunas na cor vermelho claro sem patógeno. As médias seguidas pela mesma letra nos genótipos (letras maiúsculas para comparação sem patógeno e letras minúsculas para comparação com patógeno) não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ )..... 60
- Figura 9 - Número de cópias de DNA (ng/  $\mu$ L) do patógeno *Bipolaris sorokiniana* presente na rizosfera do trigo de genótipos resistentes (Frontana e IAC 5) e suscetíveis (Guamirim e Karakilcik). As linhas pontilhadas indicam os tratamentos controle, ou seja, sem a inoculação do patógeno. .... 61
- Figura 10 - Abundância relativa dos filos rizobacterianos mais abundantes em amostras da rizosfera de trigo [4 genótipos sendo 2 resistentes (Fontana e IAC 5) e 2 suscetíveis (Guamirim e Karakilcik) e bulk soil coletadas em diferentes ciclos durante a indução da doença causada por *Bipolaris sorokiniana*..... 64
- Figura 11 - Análise de coordenadas principais (PCoA) de beta diversidade dos dados de amplificação do gene 16S rRNA da rizosfera de genótipos de trigo e coletadas em diferentes ciclos. Considerando 2 genótipos resistentes (Frontana e IAC 5) e 2 genótipos suscetíveis (Guamirim e Karakilcik com e sem patógeno e amostras de *bulk soil* em cinco ciclos. .... 65

- Figura 12 - Análise de coordenadas principais restrita (CAP) dos dados de amplificação do gene 16S rRNA da rizosfera de genótipos de trigo coletadas em diferentes ciclos. Considerando 2 genótipos resistentes (Frontana e IAC 5) e 2 genótipos suscetíveis (Guamirim e Karakilcik com e sem patógeno em cinco ciclos.....66
- Figura 13 - Análise de coordenadas principais restrita (CAP) da diversidade beta dos dados de amplificação 16S rRNA da comunidade bacteriana da rizosfera coletada em cada ciclo. Considerando 2 genótipos resistentes (Frontana e IAC 5) e 2 genótipos suscetíveis (Guamirim e Karakilcik com e sem patógeno em cinco ciclos e *bulk soil*. A. Ciclo 1 B. Ciclo 2 C. Ciclo 3 D. Ciclo 4 E. Ciclo 5 .....67
- Figura 14 - Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) diferencialmente enriquecidas entre os ciclos 1 e 5 na rizosfera do genótipo Guamirim (S) de acordo com a análise diferencial (DESeq2). Pontos representam OTUs diferencialmente enriquecidas que estão em maior abundância, agrupados por classe no eixo x e por filo no eixo y. ( $\log_2$  fold change  $\geq 1$  e  $p < 0,05$  calculado pelo teste WALD). .....68
- Figura 15 - Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) diferencialmente enriquecidas entre os ciclos 1 e 5 na rizosfera do genótipo Frontana (R) de acordo com a análise diferencial (DESeq2). Pontos representam OTUs diferencialmente enriquecidas que estão em maior abundância, agrupados por classe no eixo x e por filo no eixo y. ( $\log_2$  fold change  $\geq 1$  e  $p < 0,05$  calculado pelo teste WALD). .....69
- Figura 16 - Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) diferencialmente enriquecidas entre os genótipos Frontana e Guamirim de acordo com a análise diferencial (DESeq2) no último ciclo de cultivo. Pontos representam OTUs diferencialmente enriquecidas que estão em maior abundância, agrupados por classe no eixo x e por filo no eixo y. ( $\log_2$  fold change  $\geq 1$  e  $p < 0,05$  calculado pelo teste WALD). .....70
- Figura 17 - Dendrograma de similaridade das amostras de rizosfera do genótipo Frontana nos ciclos 1 e 5 A. Agrupamento de acordo com a composição da comunidade bacteriana considerando as OTUs B. Agrupamento de acordo com o índice de severidade da doença A similaridade foi calculada utilizando-se o índice de correlação de Spearman e o método UPGMA. A

letra indica o fenótipo (F = Frontana), o primeiro número indica o ciclo (ciclos 1 ou 5) e o segundo número indica a repetição (de 1 a 6), por exemplo, a amostra F1.1 significa a repetição 1, do ciclo 1 do genótipo Frontana..... 71

Figura 18 - Heatmap da abundância absoluta de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) diferencialmente enriquecidas entre os ciclos 1 e 5 na rizosfera do genótipo Frontana (resistente) . O diagrama de cor no canto esquerdo superior indica o nível de abundância das unidades taxonômicas operacionais (OTUs) OTUs..... 72

Figura 19 - Análise de co-ocorrência de redes de comunidades microbianas de rizosfera do genótipo de trigo A. Frontana (resistente) e B. Guamirim (suscetível) durante ciclos consecutivos de cultivo e com patógeno. Conexões somente para correlações positivas e negativas no intervalo de  $< -0,9$  (correlações negativas) a  $> 0,9$  (correlações positivas) e estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,01$ , O tamanho do nó é proporcional ao número de conexões que ele faz (grau). As cores representam os filios (com base no 16S rRNA)..... 75

Figura 20 - Análise de co-ocorrência de redes de comunidades microbianas de rizosfera do genótipo de trigo bulk soil durante ciclos consecutivos de cultivo e com patógeno. Conexões somente para correlações positivas e negativas no intervalo de  $< -0,9$  (correlações negativas) a  $> 0,9$  (correlações positivas) e estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,01$ , O tamanho do nó é proporcional ao número de conexões que ele faz (grau). As cores representam os filios (com base no 16S rRNA)..... 76

Figura 21 - Índice de severidade da doença no genótipo Frontana (R) em solo previamente cultivado com Frontana (barra na cor vermelho escuro), Frontana (resistente) em solo previamente cultivado o genótipo Guamirim (S) (barra na cor azul escuro), Frontana (resistente) em solo não cultivado durante os ciclos bulk soil (barra na cor marrom escuro). Índice de severidade da doença nos tratamentos controle (sem patógeno durante os ciclos) no genótipo Frontana (resistente) em solo previamente cultivado com Frontana (barra na cor vermelho claro), Frontana (resistente) em solo previamente cultivado como genótipo Guamirim (suscetível) (barra na cor azul claro). ..... 77

Figura 22 - Análise de co-ocorrência de redes de comunidades microbianas de rizosfera do genótipo de trigo A. Frontana (resistente) cultivado nos solos

de Guamirim (suscetível) (com patógeno), Frontana (resistente) (com patógeno) e bulk Soil (inoculado somente neste ciclo) inoculados patógeno em todos os ciclos B. Frontana (resistente) cultivado nos solos de Guamirim (suscetível) (sem patógeno), Frontana (resistente) (sem patógeno) e bulk soil (inoculado e cultivado somente neste ciclo) inoculados apenas neste ciclo. Conexões somente para correlações positivas e negativas estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,01$ . O tamanho do nó é proporcional ao número de conexões que ele faz (grau). As cores representam os filios (com base no 16S rRNA). .....79

Figura 23 - Diagrama de Venn representando graficamente os metabólitos compartilhados e exclusivos na rizosfera do trigo na parte superior das figuras e representação gráfica do número total de metabólitos observados em cada tratamento na parte inferior das figuras A. Frontana (resistente) em solo previamente cultivado o genótipo Guamirim (S) (sem patógeno), Frontana (resistente) em solo não cultivado durante os ciclos bulk soil. B. Genótipo Frontana (R) em solo previamente cultivado com Frontana (R) (com patógeno) e Frontana (resistente) em solo não cultivado durante os ciclos bulk soil.....80

Figura 24 - Análise componente principal (PCA) de metabólitos totais do solo. A. Comparação entre Frontana (resistente) em solo não cultivado durante os ciclos *bulk soil* e Frontana (resistente) em solo previamente cultivado o genótipo Guamirim (S) (sem patógeno) B. Comparação entre Frontana (resistente) em solo não cultivado durante os ciclos *bulk soil* e Genótipo Frontana (R) em solo previamente cultivado com Frontana (R) (com patógeno) C. Solo não cultivado durante os ciclos *bulk soil* e Frontana (resistente) em solo não cultivado durante os ciclos *bulk soil* D. Solo não cultivado durante os ciclos *bulk soil* e Frontana (resistente) em solo previamente cultivado o genótipo Guamirim (S) (sem patógeno).....84



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>26</b>
2.1	Microbioma da rizosfera	27
2.2	Dinâmica do microbioma da rizosfera durante a infecção por patógenos do solo	28
2.3	Supressividade a patógenos de solo	30
2.4	Mecanismos funcionais da microbiota da rizosfera no processo de defesa de plantas contra patógenos	32
2.5	Manipulação do microbioma da rizosfera para recrutamento de comunidades residentes benéficas	35
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
3.1	Avaliação da resistência dos genótipos de trigo a <i>Bipolaris sorokiniana</i>	42
3.1.1	Determinação do índice de severidade da doença causada por <i>B. sorokiniana</i> em genótipos de trigo	46
3.1.2	Correlação entre o índice de severidade da doença e a estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera de genótipos de trigos	46
3.2	Análise da comunidade bacteriana da rizosfera de genótipos de trigo susceptíveis e resistentes ao patógeno <i>Bipolaris sorokiniana</i> ao longo de cultivos sucessivos	47
3.3	Avaliação da comunidade bacteriana da rizosfera por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA	51
3.4	Análise de metabólitos da rizosfera de trigo durante a infecção do patógeno	53
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>55</b>
4.1	Seleção de genótipos de trigo com base na avaliação do índice de severidade da doença causada por <i>Bipolaris sorokiniana</i>	55
4.1.1	Correlação da estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera de genótipos de trigos com o índice de severidade da doença causada por <i>Bipolaris sorokiniana</i>	56
4.2	Índice de severidade da doença (ISD) dos genótipos resistentes e suscetíveis a <i>Bipolaris sorokiniana</i> ao longo dos ciclos de cultivo	59
4.3	Dinâmica do patógeno no solo	61
4.4	Dinâmica da comunidade rizobacteriana de genótipos de trigo durante ciclos consecutivos de cultivo na presença de <i>Bipolaris sorokiniana</i>	62
4.4.1	<b>Alpha Diversidade</b>	62
4.4.2	Beta diversidade	65
4.5	Táxons diferencialmente enriquecidos na rizosfera dos genótipos de trigo	68
4.6	Análise de <i>network</i> do microbioma da rizosfera	72

4.7	Ensaio de troca de solo (prova de conceito) - índice de severidade da doença do genótipo Frontana cultivado em diferentes solos obtidos nos ensaios de ciclos .....	76
4.7.1	Estrutura de <i>networks</i> do microbioma da rizosfera .....	78
4.7.2	Análise de metabólitos do solo .....	80
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>83</b>
5.1	Comparação da comunidade bacteriana rizosférica de genótipos de trigo resistentes e suscetíveis a <i>Bipolaris sorokiniana</i> . .....	83
5.2	Indução de supressividade com sucessivos ciclos de cultivo de genótipos de trigo resistentes e suscetíveis a <i>Bipolaris sorokiniana</i> .....	84
5.2.1	Dinâmica da comunidade de rizobactérias em genótipos de trigo resistentes e suscetíveis na presença de <i>Bipolaris sorokiniana</i> .....	85
5.2.2	Padrões de co-ocorrência do microbioma da rizosfera de trigos resistentes e suscetíveis a <i>B. sorokiniana</i> em sistema de monocultivo.....	89
5.3	Manipulação do microbioma da rizosfera de trigo para indução de supressão ao patógeno de solo <i>Bipolaris sorokiniana</i> .....	91
5.4	Exsudação de metabólitos na rizosfera durante a infecção do patógeno ....	92
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>94</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>95</b>
	<b>APÊNDICE A - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES</b> .....	<b>111</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As plantas coevoluíram simbioticamente com microrganismos resultando em estratégias nas quais a planta hospedeira usa funções do microbioma associado para enfrentar estresses bióticos e abióticos (GOPAL; GUPTA, 2016). O solo é um dos ecossistemas microbianos mais ricos da terra e um ambiente altamente complexo e dinâmico (GANS; WOLINSKY; DUNBAR, 2005), sendo o banco de diversidade microbiana a partir do qual uma planta seleciona seu microbioma para atender às suas necessidades nutricionais, de defesa e para seu desenvolvimento (GOPAL; GUPTA, 2016). Cada grama de solo na rizosfera pode conter bilhões de microrganismos que compreendem milhares de espécies (BULGARELLI et al., 2015a; PHILIPPOT et al., 2013). Essas comunidades microbianas interagem diretamente com o hospedeiro, afetando o sistema de defesa (RONALD; SHIRASU, 2012; VAN WEES; VAN DER ENT; PIETERSE, 2008), assim como a abundância de patógenos neste ambiente (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012).

O microbioma associado à rizosfera e sua relação com a fitossanidade e defesa das plantas, principalmente para redução dos efeitos deletérios causados pelo sistema agrícola (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012), está sendo explorado nas últimas décadas pelos pesquisadores. O sistema inato de defesa das plantas tem o potencial de modificar o microbioma na rizosfera recrutando microrganismos benéficos ou ativamente reprimindo a proliferação de patógenos. Essa microbiota é considerada a primeira linha de defesa das plantas contra a invasão de patógenos (CHAPARRO et al., 2012; MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013). Essa capacidade da comunidade microbiana do solo de prevenir o estabelecimento de patógenos ou inibir suas atividades foi relatado em outros estudos e o fenômeno é conhecido como supressividade do solo (MENDES et al., 2011; GÓMEZ EXPÓSITO, 2017). Um fenômeno de importância fundamental que está correlacionado com as mudanças no perfil do microbioma da rizosfera por meio do enriquecimento de taxas microbianas específicas (CARRIÓN et al., 2019; CHA et al., 2016; MENDES et al., 2011).

A forma com que as complexas interações entre plantas, seus patógenos e a comunidade microbiana do solo influencia o desenvolvimento da doença, sob

condições naturais de cultivo, ainda é pouco compreendida (WEI et al., 2019). É reconhecido que a invasão por fungos fitopatogênicos altera a estrutura da rizosfera e, direta ou indiretamente, induz respostas de estresse nessas comunidades, ativando características antagônicas que levam ao controle do patógeno (CHAPELLE et al., 2016), ou que no caso de espécies de plantas resistentes a doença, em um primeiro momento podem recrutar aliados bacterianos benéficos para se protegerem de infecções (KWAK et al., 2018; MENDES et al., 2017). Porém, é fundamental saber até que ponto a composição e funcionamento inicial do microbioma determina a variação na incidência de doenças nas plantas (WEI et al., 2019) e realmente identificar o impacto do microbioma da rizosfera na proteção de plantas. A partir deste conhecimento, será possível entender quais fatores são necessários combinar para criar comunidades microbianas da rizosfera mais diversificadas e benéficas às plantas, restaurando a resistência em solos afetados por doenças (CHAPARRO et al., 2012). Neste aspecto, o papel das interações, não somente entre isolados mas também para as comunidades da rizosfera, poderá possibilitar o manejo ou manipulação do microbioma a fim de aumentar a produtividade das culturas (FARRAR; BRYANT; COPE-SELBY, 2014).

Compreender o microbioma da rizosfera é uma grande promessa para a promoção de uma agricultura mais sustentável, principalmente pela capacidade natural das plantas em recrutar microrganismos benéficos que atuam direta e indiretamente contra patógenos (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012; MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013). Apesar da crescente demanda por estudos envolvendo os microrganismos da rizosfera e o processo de defesa das plantas, pouco se conhece sobre os mecanismos que governam a modulação do microbioma da rizosfera como a primeira linha de defesa da planta.

Para que o microbioma da rizosfera possa se tornar uma abordagem no controle de doenças de plantas é preciso identificar os fatores que favorecem tal condição. Para isso, serão necessárias pesquisas que, além de determinar a composição de forma descritiva, sejam capazes de avaliar as possibilidades de manejo dessas comunidades em prol das culturas agrícolas. Neste estudo foi proposto que genótipos de trigo suscetíveis e resistentes ao patógeno *Bipolaris sorokiniana*, causador de podridão das raízes em trigo, recrutariam um

microbioma da rizosfera distinto e estes microrganismos teriam papel importante na interação hospedeiro x patógeno favorecendo as plantas em relação ao processo de defesa contra doenças. Assumindo que as plantas dependem, ao menos em parte, do microbioma da rizosfera para se defenderem de fitopatógenos habitantes do solo foi investigada a dinâmica da comunidade bacteriana rizosférica de genótipos de trigo suscetíveis e resistentes e sua capacidade em promover a redução da doença de plantas trigo causada por *B. sorokiniana*.

Os objetivos do estudo foram avaliar a capacidade de estruturação da comunidade bacteriana da rizosfera de diferentes genótipos de trigo, incluindo materiais ancestrais e domesticados contrastantes em relação a resistência ao patógeno *Bipolaris sorokiniana* e correlacionar a estrutura da comunidade com os níveis de resistência à infecção por esse patógeno. Foram consideradas as seguintes questões científicas: (1) Qual a dinâmica da comunidade bacteriana durante a invasão da rizosfera de trigo por *B. sorokiniana*? (2) Quais são as diferenças taxonômicas entre microbiomas da rizosfera de genótipos resistentes e suscetíveis? (3) Quais as mudanças na montagem da comunidade bacteriana da rizosfera durante o monocultivo e indução da supressão da doença? e (4) Quais microrganismos estão correlacionados com o processo de defesa ao patógeno *B. sorokiniana*?

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A agricultura intensiva aumentou a produtividade das culturas agrícolas, porém gerou efeitos prejudiciais sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos (BOUWMAN; BEUSEN; BILLEN, 2009; PIMENTEL et al., 1995). Abordagens que consideram a integração da ecologia da comunidade microbiana e do ecossistema estão aprimorando a compreensão sobre a regulação e o significado funcional da biodiversidade do solo, bem como dos impactos ambientais induzidos pelo homem (WARDLE et al., 2004). Nos últimos dez anos as pesquisas com microbiomas modificaram a percepção sobre a complexidade e a estrutura das comunidades microbianas (ZORNER; FARMER; ALIBEK, 2018). Nesta perspectiva, a associação de microrganismos benéficos em sistemas de produção agrícolas propicia o potencial de aumentar significativamente a produtividade (BAKKER et al., 2012; SCHLAEPPI; BULGARELLI, 2015).

As plantas podem alterar a estrutura de seu microbioma radicular em favor de uma comunidade microbiana benéfica, incluindo a resistência contra patógenos (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012; BULGARELLI et al., 2015b), ou seja, o sucesso de um fitopatógeno é afetado pela ação dos microrganismos da rizosfera onde ocorre a infecção (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012). Este processo de proteção de plantas contra fitopatógenos pelo microbioma da rizosfera é evidenciado, principalmente, em solos supressivos às doenças causadas por patógenos habitantes do solo e está relacionado ao aumento de táxons bacterianos benéficos (ALABOUVETTE, 1999; BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012). Uma estratégia para melhorar a saúde e o desenvolvimento das plantas é por meio da seleção e modificação do microbioma da rizosfera, uma vez que foi demonstrado que é a primeira linha de defesa da planta contra os agentes patogênicos (CHAPARRO et al., 2012; MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013). Mesmo com o crescimento de pesquisas sobre as interações entre plantas e microrganismos, a compreensão do papel do microbioma vegetal, em termos de ecologia e função, permanece limitada (KIERS et al., 2011; WERNER et al., 2014).

Para alcançar a sustentabilidade é necessário que a diversidade biológica seja aumentada, recriando funções de controle e regulação (PRETTY; BHARUCHA, 2014). A aplicação de abordagens biologicamente sustentáveis na agricultura, como o uso e manipulação do microbioma, poderia de certa forma limitar a efeitos nocivos de infestações fúngicas graves, além de preservar os altos níveis de biodiversidade microbiana nos solos (ARAUJO et al., 2019), reduzindo a incidência de doenças de plantas (ANDREWS, 1992; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001).

## **2.1 Microbioma da rizosfera**

O microbioma refere-se ao conjunto de genomas dos microrganismos em um habitat particular (BULGARELLI et al., 2013). A rizosfera é a zona biologicamente ativa do solo onde ocorrem interações entre as raízes das plantas e os microrganismos, com importância para o desempenho das plantas (SINGH et al., 2004). Somados, a complexidade e a diversidade de microrganismos na rizosfera se tornam essenciais para manter a homeostase no ecossistema do solo (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004; RAAIJMAKERS et al., 2009).

A microbiota rizosférica é composta por várias espécies de microrganismos que exercem efeitos benéficos sobre o desenvolvimento e a saúde das plantas. Dentre esses microrganismos estão presentes as rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR), bactérias fixadoras de nitrogênio, fungos micorrízicos, agentes de biocontrole e também os patógenos de solo (MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013). Provavelmente, quantidades e tipos de compostos orgânicos exsudados pelas raízes tem efeito importante sobre esses microrganismos (HAICHAR et al., 2008; PÉREZ-JARAMILLO; MENDES; RAAIJMAKERS, 2015). Os exsudados radiculares variam entre as espécies de plantas e ao longo do eixo da raiz e são ainda modificados em resposta à fenologia das plantas, estado dos nutricionais, estresse e ataque de patógenos (NEUMANN, 2007). A composição do microbioma da raiz pode ser determinado por secreção ativa de compostos que estimulam ou reprimem membros da comunidade microbiana (DOORNBOS; LOON, 2012). Desta forma, ocorre o enriquecimento seletivo de diferentes populações dependendo da quantidade e composição de

exsudados radiculares (BERG et al., 2002; FOSTER, 1986; GOMES et al., 2001; MARILLEY; ARAGNO, 2007).

Além do genótipo das plantas (MARSCHNER et al., 2001) e do estágio de desenvolvimento (CHAPARRO; BADRI; VIVANCO, 2014; MICALLEF et al., 2009), o tipo de solo também está entre os principais determinantes da estrutura da microbiota da rizosfera (GRAYSTON et al., 1998; LIESACK et al., 1997; MICALLEF et al., 2009). Outros fatores também podem ser determinantes para a composição do microbioma da rizosfera como a nutrição (GRUNERT et al., 2019), as interações microbianas, a biogeografia, o pH do solo e o teor de carbono, os quais podem moldar a diversidade bacteriana e a abundância na rizosfera (ANDREW et al., 2012; LAUBER et al., 2009; MARQUES et al., 2014; QIAO et al., 2017; WEI et al., 2015).

É importante entender que as interações entre a planta hospedeira e seu microbioma tem papel fundamental para a sua saúde e produtividade, pois a microbiota pode interferir no crescimento das plantas em seus vários estágios de desenvolvimento (MAYAK; TIROSH; GLICK, 2004; WEYENS et al., 2009). Com o aumento da compreensão sobre o microbioma do solo fica evidente a associação de diversos fatores e microrganismos que fornecem boas condições para a planta ser saudável (BADRI et al., 2013). Para o agricultor, diversas estratégias podem gerar benefícios no campo, como os consórcios microbianos, a escolha de práticas de manejo agrícola que enriqueça a comunidade microbiana com funções benéficas ou abordagens de melhoramento de plantas que considere o microbioma (COMPANT et al., 2019).

## **2.2 Dinâmica do microbioma da rizosfera durante a infecção por patógenos do solo**

Os patógenos de solo podem ser uma limitação na produção de parte das áreas agrícolas (BRUEHL, 1987). Eles crescem e sobrevivem no solo, porém a rizosfera é o local de infecção, ou seja, onde o patógeno encontra a planta e estabelece uma relação parasitária. Também é nesta região que está localizada a comunidade rizosférica complexa que pode interagir com o patógeno e influenciar o resultado da infecção (RAAIJMAKERS et al., 2009).

Fungos fitopatogênicos podem induzir, diretamente ou via planta, respostas ao estresse na comunidade rizobacteriana que conduzem a mudanças na composição do microbioma e à ativação de características antagônicas que restringem a infecção (CHAPELLE et al., 2016). O microbioma presente na rizosfera pode proteger contra a infecção da raiz por meio da competição por nutrientes e ocupação de espaços que irá excluir o invasor patogênico (CHAPELLE et al., 2016; HACQUARD et al., 2017). Desta forma, as interações entre o patógeno, a planta e os microrganismos da rizosfera são importantes na formação um microbioma protetor de plantas (CHAPELLE et al., 2016). As rizobactérias formam uma rede microbiana dinâmica que afeta a invasão, infecção e a severidade dos patógenos (CHAPELLE et al., 2016; RAAIJMAKERS et al., 2009). Neste caso, a diversidade bacteriana do solo exerce um efeito positivo no declínio de doenças (ABBASI; CONN; LAZAROVITS, 2004; BERENDSEN et al., 2018; MENDES et al., 2011). Pesquisas recentes demonstraram a reestruturação da comunidade de rizobactérias após a invasão do patógeno, indicando seu efeito na proteção das plantas (MENDES et al. 2017; KWAK et al. 2018). Análises baseadas em rRNA revelaram que as famílias mais abundantes na rizosfera de mudas de beterrabas cultivadas em solo supressivo após invasão do fungo *Rhizoctonia solani* foram *Oxalobacteraceae*, *Burkholderiaceae*, *Sphingobacteriaceae* e *Sphingomonadaceae*. Além disso, os genes relacionados ao estresse (metabolismo de ppGpp e estresse oxidativo) foram regulados positivamente nessas famílias bacterianas em resposta à invasão do patógeno (CHAPELLE et al., 2016).

Essas características protetoras do microbioma da rizosfera são evidentes quando é feita a comparação entre solos supressivos e os conducentes. A abundância relativa de membros específicos da comunidade bacteriana é maior nos solos supressivos à murcha de *Fusarium*. Vários gêneros fúngicos e bacterianos exclusivos ou mais abundantes neste solo foram detectados, incluindo gêneros conhecidos por sua atividade contra *F. oxysporum* (SIEGEL-HERTZ et al., 2018). Outros trabalhos relataram que após a invasão por *Fusarium culmorum* nas raízes de *Carex arenaria* ocorre a liberação de uma mistura volátil que atrai bactérias específicas com propriedades antifúngicas (SCHULZ-BOHM et al., 2018).

A infecção de plantas por patógenos de solo pode ser reduzida por meio de interações competitivas com a comunidade microbiana do solo (RAAIJMAKERS et al., 2009; WELLER et al., 2002). O conhecimento sobre essas interações planta-microrganismos da rizosfera e sua relação com a saúde e defesa das plantas poderá aliviar os efeitos deletérios causado por um modelo de sistema de cultivo intensivo (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012).

### **2.3 Supressividade a patógenos de solo**

A capacidade que alguns solos tem de prevenirem naturalmente o estabelecimento de patógenos ou inibirem as suas atividades patogênicas é chamada de supressividade de solos e esses são conhecidos como solos supressivos (BETTIOL; GHINI, 2005). Em contrapartida, os solos favoráveis à doenças são conhecidos como solos conducentes, nos quais condições abióticas e bióticas são propícias aos patógenos (BAKER; COOK, 1974). A supressão de doenças de plantas recebeu maior atenção com os recentes avanços em abordagens independentes da cultura que permitiram aprofundar o conhecimento sobre o microbioma de plantas, incluindo o seu efeito nas plantas, o manejo da supressão de doenças e os fatores microbianos que estão associados a este fenômeno (ROSENZWEIG et al., 2012).

Até o momento, são conhecidos dois tipos de supressão. A primeira delas é chama de supressão geral, que se baseia em interações multitróficas e está relacionada à biomassa microbiana total no solo. Essa comunidade microbiana compete com o patógeno por recursos ou causa inibição por formas mais diretas de antagonismo, além disso, pode ser modulada por práticas de manejo do solo que afetam a atividade microbiana total (MAZZOLA; GU, 2002; ROVIRA; WILDERMUTH, 1981; STIRLING et al., 2012). A segunda categoria de supressividade, a chamada supressão específica, é basicamente direcionada a atividade de um indivíduo ou grupo seletivo de microrganismos antagônicos a um patógeno de planta específico do solo. É transferível de um solo para outro e pode ser eliminada por esterilização, pasteurização ou irradiação do solo (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004; MAZZOLA, 2002; MENDES et al. 2011; WELLER et al., 2002). Numerosas pesquisas demonstraram que a supressão específica de



patógenos radiculares em solos supressivos de doenças naturais é de origem microbiana (CHA et al., 2016; CHAPELLE et al., 2016; WELLER et al., 2002)

O conhecimento da supressão de doenças em solos permitiu progressos significativos na compreensão das forças bióticas e abióticas que inibem o desenvolvimento de doenças de plantas nesses solos (WELLER et al., 2002). Embora características abióticas, tais como atributos químicos e físicos do solo, possam contribuir para a supressão da doença, a supressividade do solo muitas vezes esta diretamente ou indiretamente ligada a uma função da atividade da microbiota do solo (CHANDRASHEKARA et al., 2012; MAZZOLA, 2002) que por meio de consórcios microbianos específicos protegem o hospedeiro da infecção (MENDES et al. 2011). Dentre os principais mecanismos envolvidos no processo de supressão do solo estão antibiose, competição, parasitismo e predação (CHANDRASHEKARA et al., 2012).

A supressividade do solo foi relatada para um número grande de patógenos, como bactérias, fungos e nematoides (SIEGEL-HERTZ et al., 2018). A supressão ao fungo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt), causador do mal-do-pé do trigo, é um dos exemplos mais citados. Após vários anos de trigo em monocultura e um surto grave da doença é observada a sua diminuição. Neste caso, a redução da doença está associada com a proliferação na rizosfera de trigo de cepas específicas de *Pseudomonas* fluorescentes que produzem o antibiótico 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) e suprimem com sucesso o Ggt. Porém, muitos microrganismos com capacidade de biocontrole, como *Trichoderma* spp. (DUFFY; SIMON; WELLER, 1996) e *Bacillus* spp. (KIM; COOK; WELLER, 1997), estão envolvidos na supressão do fungo Ggt, além de outros grupos taxonômicos diferentes (WELLER et al., 2002). Estudos , como de Mendes et al. (2011), mostraram que quando os solos supressivos a *Rhizoctonia solani*, patógeno fúngico da beterraba sacarina, foram misturados com os solos propícios à doença (proporção de 1:9 p/p), suprimiram com sucesso a infecção do fungo. Neste estudo, os principais filos bacterianos encontrados foram Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria, especialmente durante a infecção do patógeno, indicando a possibilidade de um microbioma induzido pelo hospedeiro para combater o ataque do patógeno. O efeito supressor da comunidade microbiana da

rizosfera também foi relatado para o fungo *Fusarium oxysporum*, onde foi possível observar que a diversidade de fungos difere entre solos supressivos e conducentes e que vários gêneros de fungos e bactérias, conhecidos por suas atividades contra *F. oxysporum* estão exclusiva ou mais abundantemente presentes em solos supressivos (SIEGEL-HERTZ et al., 2018).

Neste sistema é possível considerar diversas abordagens com potencial de melhorar o uso de comunidades microbianas no campo, elevando a produtividade das culturas e a sustentabilidade ambiental (QIU et al., 2019). O manejo de comunidades bacterianas residentes para induzir a supressão de doenças surge como uma possibilidade (MAZZOLA, 2007). Neste contexto, a manipulação de comunidades microbianas destaca-se como um importante indutor de supressividade às doenças, podendo ser uma ferramenta no manejo de doenças de plantas transmitidas pelo solo (CHANDRASHEKARA et al., 2012).

#### **2.4 Mecanismos funcionais da microbiota da rizosfera no processo de defesa de plantas contra patógenos**

O microbioma das plantas é citado como um segundo genoma (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012) capaz de exercer um efeito positivo ou negativo no desenvolvimento e adaptação das plantas (LAKSHMANAN; SELVARAJ; BAIS, 2014). As plantas mantêm interações com os microrganismos por meio do fornecimento de carbono orgânico que acessado diretamente dentro das plantas ou liberado pelas raízes na forma de rizodepósitos (BAIS et al., 2006; RUDRAPPA; BAIS, 2008). Esse processo desencadeia uma gama de funções microbianas que impactam na absorção de nutrientes e água, níveis hormonais, promoção de crescimento, comunicação planta – microbioma e proteção contra patógenos de solo (LEMANCEAU et al., 2017b).

As bactérias da rizosfera modulam os níveis de hormônios endógenos associados às plantas. Algumas delas promovem o crescimento por meio da produção de fitohormônios como auxina, citocininas e giberelina (GLICK, 2012; SANTOYO; OROZCO-MOSQUEDA; GOVINDAPPA, 2012). Além disso, os microrganismos da rizosfera favorecem a aquisição de nutrientes por meio da fixação de nitrogênio (*Azospirillum*, *Burkholderia* e *Stenotrophomonas*)

(DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003), fósforo (UNNO et al., 2005) e ferro (KATIYAR; GOEL, 2004), que são essenciais para planta (CALVO et al., 2017). Consequentemente, promovem o crescimento e o desenvolvimento (DO AMARAL et al., 2016; WINTERMANS; BAKKER; PIETERSE, 2016), impedem a colonização de patógenos e induzem a resistência das plantas a estresses bióticos e abióticos (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001; RAIS et al., 2016). Além disso, muitos microrganismos rizosféricos podem induzir resposta sistêmica na planta, resultando na ativação de mecanismos de defesa (PIETERSE et al., 2003). Esse sistema de defesa depende principalmente do jasmonato e sinalização de etileno e permite que as plantas sejam preparadas para reagir mais rapidamente e fortemente contra o ataque de patógenos (BULGARELLI et al., 2013). Numerosos microrganismos são considerados indutores de resistência, dentre eles *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Serratia* e *Trichoderma harzianum* (BULGARELLI et al., 2013). As plantas, dentro deste processo, reconhecem os microrganismos por meio de receptores de reconhecimento de padrões que se ligam a padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs), esse sistema desencadeia uma defesa basal capaz de impedir o crescimento de muitos patógenos (BÖHM et al., 2014; JONES; DANGL, 2006). Acredita-se que a maioria dos microrganismos benéficos às plantas certamente produz seus próprios MAMPs, o que pode ser a resposta para a questão de como as plantas não eliminam esses microrganismos por meio do sistema imune de defesa (FINKEL et al., 2017). Quando os padrões moleculares estão relacionados com microrganismos infecciosos são conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) sendo em sua grande maioria oligossacarídeos, glicopeptídeos e peptídeos (HENRY et al., 2012). A resistência basal ou imunidade desencadeada por PAMP (PTI) ocorre quando os elicitores reconhecem a sinalização gerais e desencadeiam uma ampla gama de reações (NICAISE et al., 2009). Em alguns casos, essa reação defensiva pode interromper a infecção antes do estabelecimento do patógeno invasor. Em outros casos, alguns microrganismos patogênicos podem ter sucesso na invasão e superar a resistência basal ao fornecer proteínas efetoras de virulência ou DNA dentro das células hospedeiras que inibem as vias de sinalização ou a síntese de compostos de defesa pela planta hospedeira (HENRY et al., 2012).

O uso do biocontrole por meio de microrganismos é uma estratégia extremamente importante contra invasão por patógenos (BERG, 2009; EMMERT; HANDELSMAN, 1999; PÉREZ-GARCÍA; ROMERO; DE VICENTE, 2011). O antagonismo microbiano inclui a competição por nutrientes e espaço, biossíntese de compostos microbianos (por meio da produção de antibióticos, enzimas líticas, compostos voláteis inibidores de patógenos e sideróforos) e parasitismo que pode envolver a produção de enzimas extracelulares de degradação da parede celular, como quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanase (COMPANT et al., 2005; HAAS; DÉFAGO, 2005; WHEATLEY, 2002; WHIPPS, 2001). Para ser eficaz, um agente de biocontrole deve proliferar e sobreviver no microbioma da rizosfera e atingir densidades celulares suficientes no momento e local críticos para a infecção por patógenos (RAAIJMAKERS et al., 2009). Vários microrganismos são usados de forma isolada para o controle de patógenos, tais como *Trichoderma* (KUMAR; ASHRAF, 2017), *Pseudomonas* (ARSENEAULT; GOYER; FILION, 2015), *Bacillus* (RAIS et al., 2017) e *Streptomyces* (SARWAR et al., 2018). Usando as tecnologias recentes de sequenciamento genético foi identificado que isolados do gênero *Streptomyces* modulam os microbiomas da endosfera e da rizosfera. Consequentemente, gera o melhor desenvolvimento das plantas, a redução de doenças radiculares e a elevação da produtividade de plantas (ARAUJO et al., 2019). No entanto, ainda é necessário aumentar a compreensão de como os inoculantes influenciam o microbioma residente, de que forma o microbioma afeta a atividade do isolado aplicado ou como os inoculantes microbianos colonizam o ambiente da planta no campo (COMPANT et al., 2019).

Apesar do avanço no conhecimento sobre a composição da microbiota vegetal e de que forma a sua exploração pode ser feita ter aumentado substancialmente nos últimos anos (COMPANT et al., 2019), entender a sua funcionalidade e a sua influência sobre as culturas agrícolas permitirá o avanço no uso de tecnologias que podem explorar as interações entre microrganismo e plantas hospedeiras (LAKSHMANAN; SELVARAJ; BAIS, 2014).

## **2.5 Manipulação do microbioma da rizosfera para recrutamento de comunidades residentes benéficas**

Compreender como os microrganismos interagem com seus hospedeiros e entre si em ambientes naturais pode favorecer a implementação eficiente da proteção de doenças mediada pelo microbioma (VANNIER; AGLER; HACQUARD, 2019). Tal conhecimento poderia ser usado para a manipulação direta ou indireta da microbiota do solo para melhorar a saúde e o rendimento das culturas agrícolas (BENDER; WAGG; VAN DER HEIJDEN, 2016; BERG; SMALLA, 2009; COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; SINGH; GILL; TUTEJA, 2011). Desta forma, o manejo das propriedades bióticas e abióticas do solo é uma estratégia importante para promover as atividades de microrganismos benéficos na rizosfera (JANVIER et al., 2007).

Alcançar o controle de doenças transmitidas pelo solo por meio do microbioma, ou seja, biologicamente mediada pode se tornar uma alternativa promissora para a agricultura sustentável. Neste caso, a estratégia vai além do uso de produtos biológicos com agentes isolados e incluiriam práticas para manejar a biologia residente na rizosfera com o objetivo de induzir supressividade do solo (MAZZOLA, 2007). Se as comunidades microbianas do solo e da raiz estão intimamente ligadas, então elas também podem ser afetadas pelas práticas agronômicas. Por isso, a manipulação do microbioma da rizosfera por meio de práticas de manejo que minimizem os efeitos negativos sobre essas comunidades e ao mesmo tempo beneficie o sistema agrícola são desejadas e precisam ser desenvolvidas (BENDER; WAGG; VAN DER HEIJDEN, 2016).

É possível que a primeira estratégia de manipulação do microbioma tenha ocorrido de forma involuntária durante o processo de melhoramento genético. Neste sentido, todas as alterações na diversidade genética de cultivares ocorridas ao longo dos anos impactaram as associações benéficas com os microrganismos da rizosfera (WEESE et al., 2015). Alguns autores propõem que devido às alterações nas características das plantas melhoradas sob condições ideais de crescimento, essas plantas não suportam o microbioma benéfico em sua rizosfera tão prontamente quanto seus ancestrais (PHILIPPOT et al., 2013). Como

consequência, muitos fatores podem estar relacionados às mudanças na composição do microbioma rizosférico das plantas durante o processo de domesticação dos quais podem ser citados: alteração no padrão de exsudação das raízes (SHAPOSHNIKOV et al., 2016), diferenciação morfológica das plantas, como por exemplo: a arquitetura das raízes (PÉREZ-JARAMILLO et al., 2017), e até mesmo, as mudanças progressivas que ocorreram no meio ambiente e práticas de manejo, com intensificação na produção agrícola (PÉREZ-JARAMILLO; MENDES; RAAIJMAKERS, 2015). Recentemente, estudos comparativos entre plantas ancestrais e domesticadas identificaram a existência de divergências na composição da comunidade rizobacteriana entre plantas domesticadas em relação ao seu progenitor selvagem (BOUFFAUD et al., 2014; BULGARELLI et al., 2015b; PÉREZ-JARAMILLO et al., 2017). Em contrapartida, em algumas situações, a domesticação teve pouco impacto sobre as comunidades bacterianas na rizosfera e na raiz, como é o caso do girassol comum (*Helianthus annuus*) onde os efeitos potencialmente importantes da domesticação foram observados somente em comunidades fúngicas (LEFF et al., 2016). A mudança mais marcante na composição da comunidade microbiana do solo é observada ao comparar plantas ancestrais com seus genótipos geneticamente melhorados em relação à proteção contra patógenos (MENDES et al. 2017; KWAK et al. 2018). Nesses casos, é possível observar que a domesticação causou alterações estruturais e metabólicas nas plantas que modificaram o microbioma rizosférico a ponto de favorecer a proteção contra doenças (KWAK et al. 2018; MENDES et al. 2017; CARRIÓN et al. 2019)

Na perspectiva da proteção de plantas, pesquisas recentes demonstraram a proteção de plantas suscetíveis por meio da comunidade bacteriana rizosférica de genótipos resistentes (KWAK et al., 2018), sugerindo que o processo de melhoramento genético pode impactar a montagem da comunidade rizobacteriana e adicionalmente isso poderia favorecer a proteção das plantas contra patógenos de solo (KWAK et al., 2018; MENDES et al., 2017; PÉREZ-JARAMILLO et al., 2017). Do ponto de vista prático, o uso de genótipos com maior capacidade de recrutar populações residentes benéficas (MAZZOLA, 2007) pode se tornar uma abordagem a ser considerada no manejo de patógenos de solo.

A adaptação de práticas culturais tem sido proposta como um meio de diminuir o potencial de inóculo do solo ou aumentar o nível de supressão às doenças (STEINBERG et al., 2006). Nesta perspectiva, a dinâmica das comunidades microbianas benéficas pode ser fortemente influenciada pela interação entre os solos, práticas de manejo agrícola e umidade (MAVRODI et al., 2018). A integração de características benéficas do microbioma vegetal ao sistema de cultivo (ex: plantio direto e cultivo orgânico) tem sido uma abordagem feita em pesquisas recentes, principalmente porque se conhece a influência marcante dessas práticas sobre bactérias e fungos dominantes tanto no solo quanto nas raízes (HARTMAN et al., 2018). O aumento da diversidade de plantas espacialmente, como intercalar culturas, ou temporariamente, por meio da rotação de culturas ou culturas de cobertura, pode causar alterações benéficas sobre os fatores biológicos da rizosfera (LI et al., 2007; ZAK et al., 2003). No caso do manejo da umidade do solo, resultados evidenciam que a água impulsiona o desenvolvimento de populações de rizobactérias produtoras de antibióticos benéficas, as quais contribuem para a supressão natural de doenças transmitidas pelo solo nas culturas de cereais (MAVRODI et al., 2018).

A aplicação de fertilizantes orgânicos é amplamente aceita como método biológico promissor para suprimir os patógenos habitantes do solo e promover o crescimento de plantas (CAO et al., 2011; EL-HASSAN; GOWEN, 2006). A incorporação de compostos orgânicos pode causar a indução de supressividade do solo por meio do estímulo da atividade da microbiota residente do solo. Isso ocorre devido ao aumento de microrganismos benéficos, favorecidos pelos compostos liberados durante a decomposição da matéria orgânica (BETTIOL et al., 2009). Pesquisas relataram a supressividade contra doenças em solos tratados com compostos orgânicos (MITSUBOSHI et al., 2018), adubo verde (LARKIN; GRIFFIN, 2007), resíduos orgânicos da agroindústria (CROTEAU; ZIBILSKE, 1998), e, mais recentemente, biocarvão (ELAD et al., 2012). A lista de patógenos afetados inclui fungos como *Verticillium dahliae*, *Fusarium* spp., *Sclerotinia* spp., *Sclerotium* spp. e *Rhizoctonia solani*, bactérias como *Ralstonia solanacearum*, oomicetos como *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp. (BONANOMI et al., 2007). A utilização da aplicação de matéria orgânica aliada à solarização afeta a estrutura biológica do solo (KANANAN; MEDINA; RAVIV, 2017). O uso de

resíduos orgânicos combinado com a técnica de solarização do solo tem sido também eficiente na prevenção ou redução de patógenos e na indução de supressão (KLEIN; KATAN; GAMLIEL, 2011, 2012). A solarização é um método que utiliza a energia solar para aumentar a temperatura do solo a níveis nos quais as estruturas de muitos fitopatógenos não sobrevivem ou são fortemente enfraquecidas. Essa prática obtém um controle significativo das doenças, sem no entanto eliminar todos os microrganismos do solo, apenas modificando o equilíbrio a favor das comunidades benéficas (RAAIJMAKERS et al., 2009).

Em uma abordagem *in situ*, uma estratégia de manipulação alternativa seria o uso da biologia sintética que permitiria a construção de novas funções e a aplicação de probióticos nas plantas ou no solo, manipulando antecipadamente o microbioma e suas atividades. (SINGH; TRIVEDI, 2017). Os probióticos vegetais podem aumentar a produtividade a baixos custos, além de reduzir o uso de produtos químicos e, conseqüentemente, seria a base de uma agricultura sustentável (TIKHONOVICH; PROVOROV, 2011). O consórcio de diferentes grupos de microrganismos com características complementares ou sinérgicas tem potencial para ser mais eficaz em relação a aplicação do microrganismos isolados e aumentar a eficácia do biocontrole (STOCKWELL et al., 2011). O uso de microrganismos em combinações se torna vantajoso devido a maior diversidade de microrganismos capazes de ocupar nichos diferentes na zona da raiz. Neste contexto, é necessário citar também a diversificação dos mecanismos de biocontrole oferecidos por cada componente microbiano, o que também pode elevar o nível de supressão da doença (JETIYANON, 2007; KANAAN; MEDINA; RAVIV, 2017; SRIVASTAVA et al., 2010). Em uma avaliação mais profunda, uma outra estratégia seria controlar as funções do microbioma através da compreensão sobre a regulação dos antibióticos, expressão gênica e biossintética por meio da introdução de sinalização por apropriadas moléculas (BAKKER et al., 2012). Manipular a microbiota bacteriano para modular os microbiomas ou a fisiologia das culturas por meio da liberação de substâncias químicas, pode estimular a comunidade de microrganismos benéficos (SINGH; TRIVEDI, 2017). Neste caso, o conhecimento da capacidade metabólica desses organismos poderia ser usada para desenvolver estratégias de enriquecimento seletivo (BAKKER et al., 2012). Esse seria um tipo de manipulação de médio a longo prazo, devido a



complexidade da microbiota do solo e alta diversidade de moléculas que esses microrganismos utilizam (SINGH; TRIVEDI, 2017).

Portanto, pesquisas recentes com microbioma do solo principalmente após o surgimento das ferramentas moleculares, têm identificado possibilidades de indução de supressividade por meio da manipulação das comunidades rizosféricas residentes como alternativa de controle de patógenos habitantes do solo (KWAK et al., 2018; MAZZOLA, 2007; MENDES et al., 2011; SILVA; MEDEIROS; CAMPOS, 2018).

A montagem da microbiota da rizosfera é basicamente resultado de uma hierarquia de eventos que pode gerar o estabelecimento de consórcios microbianos estáveis e diversificados baseados em interações cooperativas (COYTE; SCHLUTER; FOSTER, 2015; PHILIPPOT et al., 2013). Fatores como ambiente, interação entre microrganismos (competição e cooperação) e entre hospedeiro e microrganismo, tornam-se moduladores na estruturação das comunidades microbianas associadas às plantas promovendo a diversidade e a co-ocorrência microbiana (HACQUARD et al., 2017). Essa troca dinâmica e bidirecional de efeitos entre plantas e microrganismos do solo é significativa nos sistemas agrícolas e o aprimoramento de nossa capacidade de manipular ou direcionar essas interações pode oferecer progresso em direção à sustentabilidade por meio do desenvolvimento de genótipos que seletivamente melhoram funções benéficas no microbioma da rizosfera (BAKKER et al., 2012). A transição da ciência de uma ferramenta descritiva para preditiva permitirá aplicações práticas de gerenciamento da ecologia microbiana na agricultura (ZORNER; FARMER; ALIBEK, 2018), ou seja, o próximo passo consiste em demonstrar não somente a dinâmica do microbioma, mas também como estabelecer interações com um efeito positivo entre microrganismos e as plantas com estratégia que possam ser usadas pelos agricultores no campo.

## **2.6 Cultura do trigo**

O trigo é uma das mais antigas culturas exploradas pelo homem e um dos principais cereais cultivados no mundo (USDA 2020). O seu cultivo iniciou cerca

de 10.000 anos atrás, como parte da Revolução Neolítica, onde foi possível a transição do modo de vida do homem da caça e coleta de alimentos para a agricultura (HEUN et al., 1997; NESBITT, 1998).

O trigo é uma gramínea pertencente ao gênero *Triticum*, sendo as principais espécies cultivadas *Triticum durum*, *Triticum monococcum* e *Triticum aestivum* (LEON; ROSELL, 2007). Esse cereal é usado principalmente como fonte de alimento (GHANY, 2013). No Brasil, foi introduzido pelos europeus e sofreu várias limitações devido ao tipo de solo, doenças e pragas. Porém, muitos desses problemas foram superados por meio do melhoramento genético de plantas (CUNHA et al., 1999).

A safra 2019/2020 de trigo no Brasil, chegou a aproximadamente 5.200 milhões de toneladas e o consumo deste cereal chegou a 12.100 milhões de toneladas (USDA, 2020). Porém, o sistema de plantio em monocultivo dos genótipos domesticados de trigo, associado à baixa diversidade genética resultou em ressurgimentos de patógenos que ameaçam o suprimento de trigo (FIGUEROA et al., 2017). Além disso, o plantio direto é favorável à ocorrência e ao aumento da intensidade de determinadas doenças (REIS; CASA, 2001).

## **2.7 *Bipolaris sorokiniana***

O fungo *Bipolaris sorokiniana* está entre os principais patógenos do trigo (REIS; CASA, 2005). Este patógeno causa perdas consideráveis em áreas de cultivo (MEHTA, 1993). O fungo coloniza todos os órgãos da planta e está presente durante todo o ciclo de desenvolvimento da planta (HETZLER et al., 1991; REIS et al., 1998). Sua fase teleomorfa (sexual), *Cochliobolus sativus*, é encontrada nas sementes, colonizando restos culturais, em plantas daninhas, em hospedeiros secundários e conídios livres dormentes no solo (REIS et al., 2001). Os principais sintomas causados por este patógeno são crestamento da espiga, das folhas e de plântulas e podridão da raiz (MEHTA, 1993). Quando *B. sorokiniana* infecta as raízes ocorre a podridão comum de raiz presente em todas as regiões tritícolas do Brasil (REIS, 1988). Os sintomas mais comuns caracterizam-se pela descoloração dos tecidos radiculares. Ao atingir a base da planta ocorre também a morte prematura das folhas basais (REIS, 1988).

Para o controle da mancha marrom do trigo é preconizada a adoção simultânea de várias práticas como: plantio em épocas adequadas, práticas culturais, aplicação de fungicidas e uso de plantas resistente (MEHTA et al., 1992; REIS et al., 1988). É conhecido que algumas variedades de trigo podem expressar genes de proteínas (PR-1, TLP e  $\beta$ -1,3-glucanases) relacionados à patogênese, quando estão sob estresse fúngico de *B. sorokiniana* (MANGHWAR et al, 2018). A resistência a este fungo nas plantas de trigo é principalmente quantitativa (SINGH et al. 2016). O gene Lr34 / Yr18 / Sr57 / Pm38 / Ltn1 que confere resistência à ferrugem apresenta resistência parcial ao fungo *B. sorokiniana* sendo denominado de Sb1 (SINGH et al., 2015). Além disso, outros dois genes relacionados à resistência a *B. sorokiniana* foram mapeados nos cromossomos 5B e 3B sendo designados como Sb2 (KUMAR et al., 2015) e Sb3 (LU et al., 2015).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Avaliação da resistência dos genótipos de trigo a *Bipolaris sorokiniana*

A escolha dos materiais vegetais da espécie *Triticum aestivum* foi realizada com base numa linha histórica de cultivares antigos e domesticados (PÉREZ-JARAMILLO; MENDES; RAAIJMAKERS, 2015) e de acordo com os seguintes critérios: disponibilidade no banco de germoplasma da Embrapa Trigo e a capacidade de desenvolvimento nas condições climáticas do estado de São Paulo. Foram selecionados dois materiais ancestrais considerando o centro de origem: Karakilcik (originado na Turquia) e Pakintan 81 (originado no Paquistão); três variedades domesticadas de importância histórica para o Brasil: Frontana (lançado em 1940 e recomendado no país durante 48 anos e com moderada tolerância à doença foliar), BH 1146 (lançado na década de 50 e recomendado por 43 anos) e IAC 5-Maringá (lançado em 1969 e caracterizado por sua elevada produtividade e alto perfilhamento) e três variedades domesticadas atualmente comercializadas: BRS Guamirim, Quartzo e IAC 385. Outros genótipos contrastantes quanto ao nível de resistência às doenças da parte aérea, devido a falta de informação na literatura sobre a resistência a doenças radiculares, foram selecionados de acordo com a recomendação da Embrapa Trigo: Sumai 3, ; Toropi, CEP24 Industrial (moderadamente suscetível); BR18 Terena, BRS 194 (suscetível). O solo agrícola (Tabela 1) usado nesse estudo foi coletado na cidade de Assis, SP em uma área com histórico de cultivo de trigo, rotacionado com soja, de mais de dez anos.

**Tabela 1- Características químicas do solo utilizado nos experimentos.**

Análise Química do Solo						
<b>B</b> (mg dm <sup>-3</sup> )	<b>Cu</b> (mg dm <sup>-3</sup> )	<b>Fe</b> (mg dm <sup>-3</sup> )	<b>Mn</b> (mg dm <sup>-3</sup> )	<b>Zn</b> (mg dm <sup>-3</sup> )	<b>P</b> Resina (mg dm <sup>-3</sup> )	<b>N</b> total (mg kg <sup>-1</sup> )
0,46	6,6	12	46,2	2,9	49	3500
<b>K</b> Resina (mmolc dm <sup>-3</sup> )	<b>Ca</b> Resina (mmolc dm <sup>-3</sup> )	<b>Mg</b> Resina (mmolc dm <sup>-3</sup> )	<b>M.O</b> (g kg <sup>-1</sup> )	<b>C.O</b> (g kg <sup>-1</sup> )	<b>pH</b> CaCl <sub>2</sub>	<b>M.O.</b> (g dm <sup>-3</sup> )
8	60	43	25	14	5,7	31
<b>H+Al</b> (mmolc dm <sup>-3</sup> )	<b>SB</b> (mmolc dm <sup>-3</sup> )	<b>CTC</b> (mmolc dm <sup>-3</sup> )	<b>V %</b>	<b>Al KCl 1</b> mol L <sup>-1</sup> (mmolc dm <sup>-3</sup> )	<b>m %</b>	
18	111	129	86	<0,02	0	

O isolado de *Bipolaris sorokiniana* (BS 0208) foi obtido na coleção Micológica da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS e multiplicado em meio batata-dextrose-ágar (BDA) (140 g Batata, 15 g Dextrose e 20 g Ágar, pH final 5,5 ± 0,2). Após sete dias de incubação, em câmara de crescimento a 21 ± 2°C e fotoperíodo de 12/12 h (luz/escuro), a obtenção da suspensão de *B. sorokiniana* foi realizada por meio de raspagem superficial das estruturas do fungo no meio sólido utilizando alça de Drigalsky e 5 mL de água destilada esterilizada + Tween 80% para a liberação dos esporos. A suspensão final teve sua concentração ajustada para 10<sup>4</sup> conídios mL<sup>-1</sup> em câmara de Neubauer.

Para construção da escala diagramática foi realizado um experimento em sala climatizada (21 ± 2°C) na Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, em condições de fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro, 65% de umidade relativa. Dez sementes de cada genótipo foram semeadas a profundidade de 2 cm em vasos com capacidade de 300 g de solo. A umidade do solo foi mantida de acordo com a capacidade de campo do solo mediante irrigações periódicas e a fase de desenvolvimento da planta (1 ou 2 vezes ao dia). O patógeno foi inoculado após sete dias da semeadura (2 - 3 folhas) aplicando-se 1 mL de suspensão de conídios (10<sup>4</sup> conídios mL<sup>-1</sup>) no colmo de cada planta com o auxílio de uma pipeta

(1.000 µL) com ponteiras esterilizadas. Vasos com plantas de todos os genótipos sem a inoculação do patógeno foram utilizados como controle. O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições, considerando 13 genótipos (2 acessos ancestrais de trigo, seis variedades domesticadas de trigo, cinco variedades contrastantes), um patógeno (*Bipolaris sorokiniana*) e cada variedade foi representada por plantas controle sem a presença de patógenos. Após quatro semanas, as plantas foram removidas do solo e avaliadas. Para a construção de uma escala diagramática específica para os experimentos posteriores, a proporção de raízes infectadas para cada sistema radicular foi estimada e classificada em quatro categorias:

- Sem sintomas: (0 = plantas sem sintomas);
- Sintoma leve: (1 = plantas infectadas com leve lesão escura apenas nas folhas do coleótilo);
- Sintoma moderado 2: (2 = plantas infectadas com sintomas moderados escuros ou avermelhados no colmo);
- Sintoma severo: (3 = plantas infectadas com sintomas escuros e severos no colmo, acima da primeira folha e plantas mortas) (Figura 1).

Após as plantas terem sido classificadas dentro de cada categoria foi calculado o índice de severidade da doença (ISD%) para cada vaso, utilizando a fórmula:

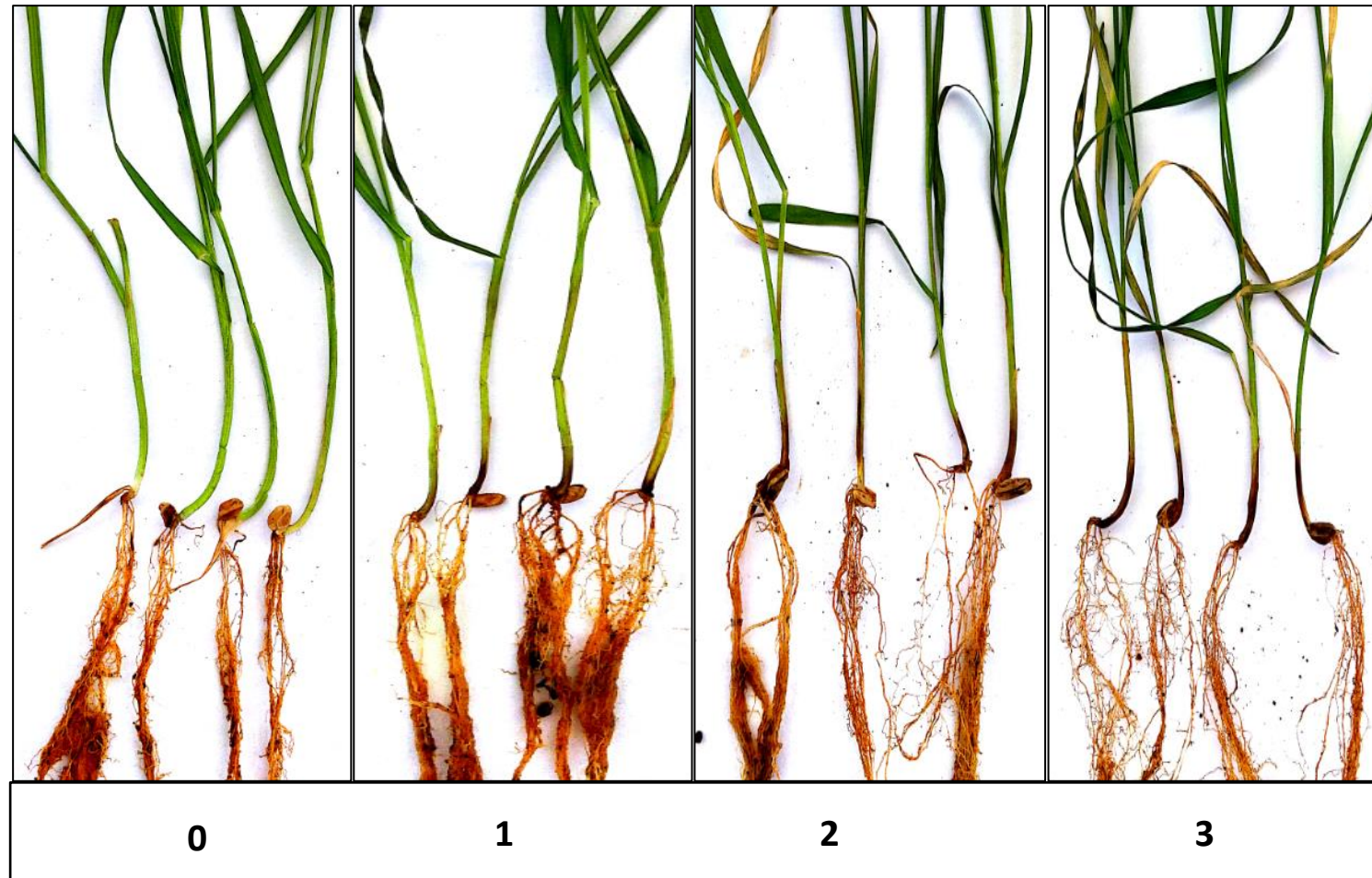
$$\text{ISD (\%)} = \frac{(1 \times n1) + (2 \times n2) + (3 \times n3) \times 100}{N}$$

**n:** porcentagem de plantas na categoria

**N:** dividido pelo número de categorias de 1 a 3, com o máximo ISD 100%.

Após as avaliações os resultados obtidos de ISD foram usados para a classificação dos quanto ao nível de resistência a doença por meio de análise de variância (one- way ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) (SCOTT; KNOTT, 1974).

Figura 1 - Índice de severidade da doença para *Bipolaris sorokiniana* variando de 0 (plantas sem sintomas) a 3 (sintomas severos): 0 = sem sintomas, 1 = plantas infectadas com leve lesão escura apenas na folha do coleóptilo, 2 = plantas infectadas com sintomas moderados escuros ou avermelhados no colmo, 3 = plantas infectadas com sintomas escuros severos no colmo, acima da primeira folha e plantas mortas, total de 40 plantas avaliadas.por tratamento.



### **3.1.1 Determinação do índice de severidade da doença causada por *B. sorokiniana* em genótipos de trigo**

Os experimentos foram realizados em sala climatizada ( $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) na Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, em condições de fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. Dez sementes de cada genótipo foram semeadas a profundidade de 5 cm em vasos com capacidade de 300 g de solo. A umidade do solo foi mantida de acordo com a capacidade de campo do solo e fase de desenvolvimento da planta (1 ou 2 vezes ao dia). O patógeno foi inoculado após sete dias da semeadura (2-3 folhas) aplicando-se 1 mL de suspensão de conídios no colmo de cada planta com o auxílio de uma pipeta (1.000  $\mu\text{L}$ ) com ponteiros esterilizados. Vasos com plantas de todos os genótipos sem a inoculação do patógeno foram utilizados como controle. Após quatro semanas, as plantas foram removidas do solo, suas raízes lavadas e então avaliadas por meio da escala de notas e posteriormente calculado o índice de severidade da doença (ISD%) adaptado de BATEMAN, 2005; MCMILLAN; GUTTERIDGE; HAMMOND-KOSACK, 2014).

O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 4 repetições (cada repetição foi constituída de um vaso onde foram semeadas 10 sementes de um genótipo), considerando 14 genótipos (3 acessos ancestrais de trigo, 6 variedades domesticadas de trigo, 5 variedades contrastantes), 1 patógeno (*Bipolaris sorokiniana*) e cada variedade foi representada por plantas controle sem a presença de patógenos. Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Barlett ( $P > 0,05$ ) para verificação de adequação aos pressupostos de normalidade e homocedasticidade, respectivamente, e à análise de variância (*one-way* ANOVA) onde as médias foram comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) (Scott & Knott, 1974). Para realização das análises foram utilizados os softwares R (R Core Team, 2016) pacotes Vegan (OKSANEN et al., 2016) e ExpDes.pt (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013). Os gráficos foram feitos utilizando os pacotes GGPlot2 (WICKHAM, 2009) e o Excel 14.0 (Office 2010).

### **3.1.2 Correlação entre o índice de severidade da doença e a estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera de genótipos de trigos**



Os dados da estrutura da comunidade bacteriana associada aos genótipos de trigo avaliados foram obtidos previamente no projeto “O Microbioma da rizosfera de cultivares domesticados e antigos de trigo” CNPq 443112/2014-2 (ROSSMANN et al., 2020) coordenado pelo Pesquisador Dr. Rodrigo Mendes. Nesta avaliação foram usados os genótipos Karakilcik, Pakintan, BH 1146, Frontana, IAC 5, Guamirim e Quartzo. Para se estabelecer a relação entre a caracterização dos genótipos quanto a resistência à *B. sorokiniana* e a comunidade bacteriana na rizosfera foi realizada uma análise diferencial (DeSeq2) para verificar as famílias diferencialmente enriquecidas nos genótipos mais contrastantes em relação a doença. Assim, com bases nesses resultados foi realizado o teste de Mantel para analisar a correlação entre a estrutura da comunidade bacteriana diferencialmente enriquecida e o índice de severidade da doença nos genótipos com maior e menor ISD. A visualização dos dados foi realizada por meio de *heatmaps* de abundância e análises de cluster para a comunidade microbiana.

### **3.2 Análise da comunidade bacteriana da rizosfera de genótipos de trigo susceptíveis e resistentes ao patógeno *Bipolaris sorokiniana* ao longo de cultivos sucessivos**

Com os resultados do experimento descrito no item 3.1 foi possível definir os genótipos de trigo para a avaliação das estruturações da comunidade microbiana da rizosfera de trigo em monocultivo após a inoculação de *B. sorokiniana*. Na seleção de genótipos de trigo suscetíveis e resistentes foi levado em consideração não somente os resultados de maior e menor índice de severidade da doença, mas também a boa capacidade de germinação e estabelecimento das plantas para manutenção das parcelas experimentais durante todo período de duração do bioensaio. O genótipo selecionado para realização deste ensaio foi o Frontana que foi cultivada nos solos previamente enriquecido com a sua própria rizosfera, seu respectivo controle, do genótipo Guamirim e seu respectivo controle e no *bulk soil*.

Para a avaliação da dinâmica da doença ao longo de ciclos sucessivos de cultivo de trigo, as sementes desses genótipos resistentes e suscetíveis foram semeadas em vasos com capacidade de 300 g de solo e mantidas em sala climatizada com um fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro) a 22°C. Após seis dias da emergência foi feita a inoculação do patógeno seguindo a metodologia descrita no item 3.1 e após quatro

semanas foi realizada a avaliação do índice de severidade da doença e coleta da rizosfera. No momento da amostragem foi mantida a umidade do solo adequada. Desta forma, foi necessária a interrupção da irrigação no dia anterior a coleta. No momento da coleta o solo foi retirado do vaso, colocado sobre um pedaço de papel e destorroado até que sobrasse somente o solo rizosférico (solo aderido às raízes). Em um outro papel as raízes foram agitadas cuidadosamente até que toda amostra rizosférica se desprendesse. O solo rizosférico foi coletado e inserido em microtubos de 1,5 mL. Essas amostras foram armazenadas em freezer (- 40°C) com intuito de manter as características do solo até o momento da extração de DNA total. O sistema radicular restante foi cortado com auxílio de uma tesoura desinfestada e 0,5 g foi homogeneizada com o solo excedente e armazenada novamente no seu respectivo vaso para o próximo ciclo de plantio.

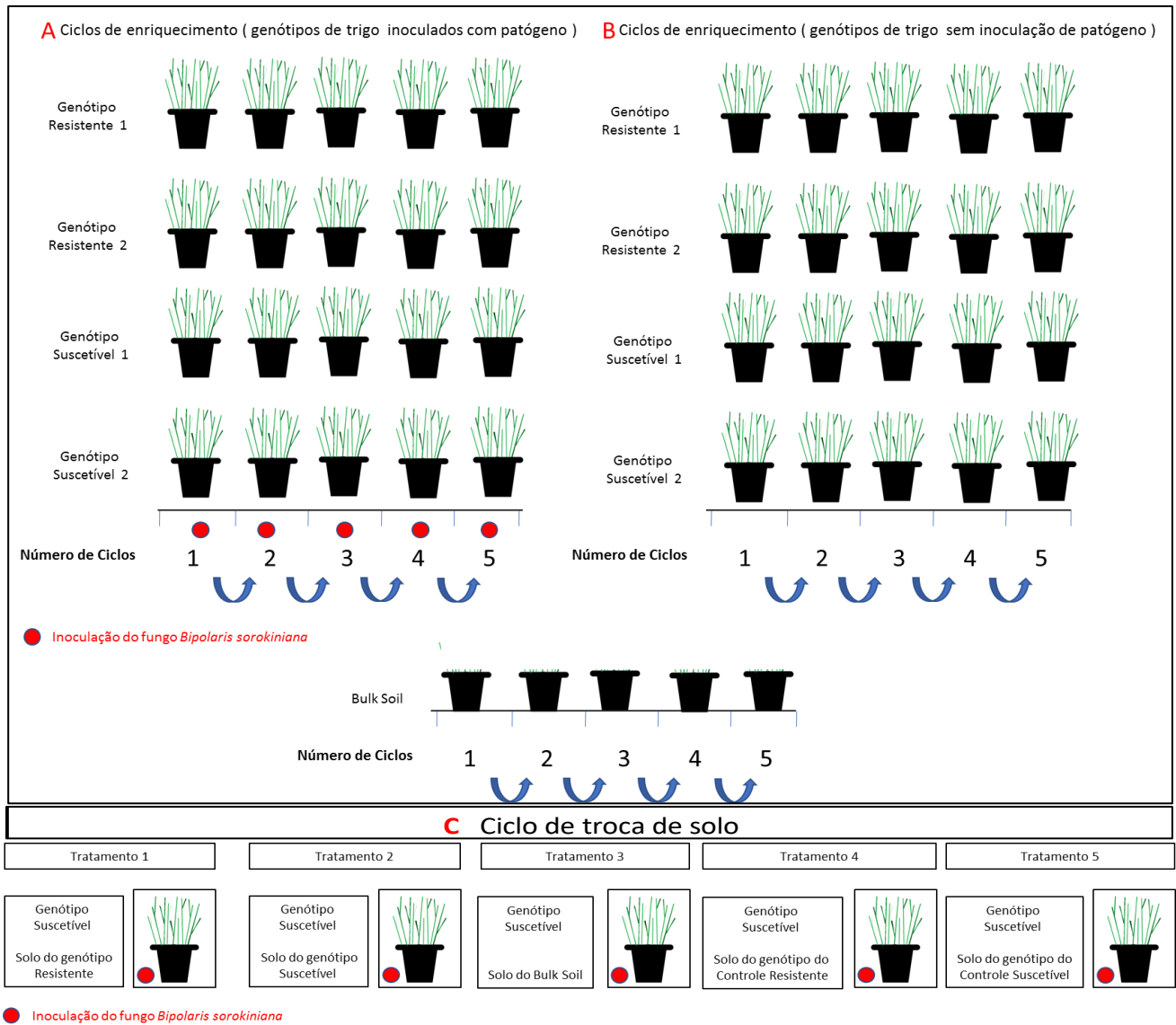
O experimento foi repetido por cinco vezes a cada quatro semanas. Esse processo caracterizou cinco ciclos de cultivos dos genótipos de trigo, permitindo o enriquecimento dos vasos com a rizosfera de cada um deles. Após o quinto ciclo, os genótipos mais contrastantes em relação a resistência e suscetibilidade à doença foram selecionados para o ensaio de prova de conceito. Neste ensaio, o genótipo com maior progresso da doença durante os ciclos foi cultivado nos solos enriquecido com a rizosfera do genótipo onde ocorreu a redução do índice de severidade da doença, em solo enriquecido com sua própria rizosfera, nos solos controles desses tratamentos (rizosfera enriquecida, porém sem patógenos) e também em solo não rizosférico (*bulk soil*). Para efeito comparativo, neste experimento todas as plantas de todos tratamentos foram inoculadas com o patógeno, seguindo a mesma metodologia citada nos ensaios anteriores.

O experimento foi instalado no delineamento inteiramente casualizado (DIC) considerando 9 tratamentos e 6 repetições (2 genótipos resistentes; 2 genótipos suscetíveis; os mesmos 2 genótipos resistentes na ausência do patógeno; os mesmos 2 genótipos suscetíveis na ausência do patógeno e 1 *bulk soil* compondo o tratamento onde não ocorreu o cultivo de trigo para uma avaliação da ausência de efeito rizosférico) para *B. sorokiniana* (Figura 2 A e B). Para o ensaio de troca de solo, também foi utilizado delineamento inteiramente casualizado considerando 5 tratamentos x 6 repetições (1 genótipo suscetível cultivado no vaso do genótipo resistente; 1 genótipo suscetível cultivado no seu próprio vaso; 1 genótipo suscetível cultivado no vaso do genótipo resistente controle (sem patógeno); genótipo suscetível

cultivado no seu próprio vaso controle (sem patógeno) e genótipo suscetível cultivado no *bulk soil* (Figura 2C).

A concentração de DNA do patógeno foi feita a partir da quantificação de DNA das mesmas amostras de rizosfera do trigo coletadas durante todos os ciclos de cultivos e usadas para o sequenciamento. Para extração do DNA genômico foram pesados 0,25 g das amostras de solo rizosférico e feita a extração do DNA total utilizando o Kit PowerSoil® DNeasy (QIAGEN catalog #12888-100) de acordo com as instruções do fabricante. A análise de qPCR foi feita no aparelho StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems®, Foster City, Califórnia, EUA) de acordo com a metodologia proposta por Horevaj et al. (2011), adaptada para o fungo *B. sorokiniana*, usando o kit SYBR Green qPCR Super Mix-UDG (Invitrogen by ThermoFisher Scientific®) e os iniciadores (*primers*) específicos para espécie *B. sorokiniana*, senso (*Forward*) - CosA\_F\_519 5'-TCAAGCTGACCAAATCACCTTC (MATUSINSKY et al., 2010) e antisenso (*Reverse*) - CosA\_R\_248 5'-AATGTCGAGCTTGCCAAAGT (HORNE, 2015). Em cada reação foi utilizado um mix com volume final de reação de 20 µl, contendo 10 µl de SYBR Green qPCR Super Mix-UDG (Invitrogen by ThermoFisher Scientific), 5 µl (10 ng µl<sup>-1</sup>) de DNA genômico e 1 µmol l<sup>-1</sup> dos primers. A curva de calibração foi feita a partir da amplificação do *primer*. As condições de reação usada neste estudo consistiram de desnaturação inicial de 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s e alongamento a 72°C por 45 min. Os dados de quantidade de DNA em cada amostra foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Barlett ( $p > 0,05$ ) para verificar a adequação dos pressupostos de normalidade de homocedasticidade, respectivamente. Posteriormente, foram submetidos a análise de variância (one- way ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) (SCOTT; KNOTT, 1974). Para realização das análises foram utilizados os softwares R (R Core Team, 2016) pacotes Vegan (OKSANEN et al., 2016) e ExpDes.pt (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013) e os gráficos foram feitos utilizando o Excel 14.0 (Office 2010).

**Figura 2 - Desenho experimental dos bioensaios. A. enriquecimento do microbioma da rizosfera de trigo com patógeno durante cinco ciclos B. enriquecimento do microbioma da rizosfera de trigo sem patógeno durante cinco ciclos (controle) e C. Ciclo de trocas de genótipos para avaliar a possível indução de supressividade.**



### 3.3 Avaliação da comunidade bacteriana da rizosfera por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Para a extração de DNA genômico total foram pesados 0,25 g de cada amostra de cada tratamento de solo rizosférico totalizando 48 amostras por ciclo. A extração do DNA total foi realizada utilizando o Kit PowerSoil® DNeasy (QIAGEN catalog #12888-100) específico para extração de DNA de solo, de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi estimada utilizando o NanoDrop®ND-2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific®, Wilmington, DE, EUA) e a integridade confirmada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TAE 1X. A concentração do DNA ( $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) foi estimada utilizando-se o fluorímetro QUBIT® 2.0 (Life Technologies®). Todas as amostras foram calibradas para um volume final de 20  $\mu\text{l}$  (DNA + H<sub>2</sub>O ultrapura) com concentração de 5  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$  baseada na leitura mínima de concentração feita no QUBIT® 2.0. Após a padronização, as placas contendo as amostras foram liofilizadas em aparelho Edwards (RV3) e enviadas para sequenciamento genético do gene 16S rRNA. Os primers de amplificação usados foram 515F-806R, a região V4, e o DNA extraído foi sequenciado na plataforma Illumina HiSeq2500 Argonne National Laboratory, EUA) utilizando a estratégia de sequenciamento paired-end com geração de *reads* de aproximadamente 250 pb.

As sequências da região 16S rRNA obtidas por meio do sequenciamento na plataforma Illumina Hiseq foram pré-processadas usando o software Qiime V.1.9 (CAPORASO et al., 2010) previamente à análise da estrutura da comunidade bacteriana. O pareamento das *reads* (*forward* e *reverse*) geradas foi feito por meio dos métodos Fastq-join (ARONESTY, 2011). Em seguida, a demultiplexação (separação entre os *barcodes* e remoção das sequências de primers), com posterior identificação e remoção de quimeras usando o Usearch61 Database (EDGAR, 2010). A identificação das unidades taxonômicas operacional (OTU) representativas (pick OTUs) foi realizada considerando 97% de similaridade entre as sequências, que posteriormente foram alinhadas por meio do algoritmo PyNAST (CAPORASO et al., 2010). A classificação taxonômica foi atribuída comparando os dados em relação ao Silva's database (QUAST et al., 2013). Após a remoção das sequências de cloroplasto e mitocôndrias foi gerado o arquivo contendo as OTUs para análises estatísticas.

A análise dos dados de sequenciamento de variância permutacional não paramétrica (PERMANOVA) foi usada para avaliar o efeito dos fatores – presença do

patógeno e dos diferentes genótipos em monocultivo na comunidade microbiana da rizosfera – usando a função *adonis* (Pacote Vegan; RStudio versão 1.2.5001) (ANDERSON, 2001; DIXON, 2013; OKSANEN et al., 2016). As análises de coordenadas principais restrita (CAP), em dissimilaridades de Bray-Curtis, foram realizadas para estimar a influência das variáveis estudadas de forma isolada sobre o microbioma da rizosfera e foram realizadas usando a função *ordinate* (Pacote Phyloseq; RStudio versão 1.2.5001) (MCMURDIE; HOLMES, 2013).

A diversidade alfa foi calculada a partir de uma matriz de riqueza usando o índice de Shannon, Simpson e Chao1. Os índices de diversidade foram calculados no software R pacotes Vegan (OKSANEN et al., 2016) e pacote Phyloseq; R Studio versão 1.2.5001 (MCMURDIE; HOLMES, 2013). Para determinar as diferenças estatísticas entre os tratamentos, os valores de alpha diversidade em cada tratamento foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Barlett ( $p > 0,05$ ) para verificar a adequação dos pressupostos de normalidade de homocedasticidade, respectivamente. Posteriormente, foram submetidos a análise de variância (one-way ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) (SCOTT; KNOTT, 1974). Para realização das análises foram utilizados o software R (R Studio versão 1.2.5001) e o pacote ExpDes.pt (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013)

As OTUs diferencialmente enriquecidas foram identificadas na rizosfera de cada um dos genótipos que apresentaram maior e menor índice de severidade da doença (Frontana e Guamirim) e ao longo do progresso da doença utilizando DeSeq2, uma análise diferencial de dados adequada para ser utilizada com dados de contagem provenientes de sequenciamento de última geração e presença de valores extremos que requerem uma abordagem estatística adequada (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Os valores de significância dessa análise foram corrigidos de acordo com Benjamini e Hochberg (1995) para taxa de falsas descobertas (FDR).

A análise de *networks* de co-ocorrência de comunidades microbianas da rizosfera é uma abordagem praticada em avaliações ecológicas para elucidar padrões mais difíceis de detectar usando as métricas padrões de diversidade alfa/beta (PROULX; PROMISLOW; PHILLIPS, 2005). Todas as análises estatísticas foram realizadas no ambiente R usando os pacotes Vegan (OKSANEN et al., 2016) e Igraph (CSARDI G, 2006). Um evento de co-ocorrência válido foi considerado como uma correlação robusta quando apresentou coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) de  $r > 0.9$  e  $r <$

-0,9 e estatisticamente significativa (valor  $p = 0,01$ ). As 500 OTUs mais abundantes de cada amostra foram retidas para análise. Para descrever a topologia da rede resultante, um conjunto de medidas (conectividade média do nó, comprimento médio do caminho, diâmetro de rede, conectividade e modularidade) foram calculados (NEWMAN, 2006). As *networks* foram exploradas e visualizadas com a plataforma interativa Gephi 0.9.1 (BASTIAN; HEYMANN; JACOMY, 2009). Os nós na rede representam taxa ao nível filo, as arestas (isto é, as conexões entre os táxons como OTUs) correspondem a uma correlação forte e significativa (positiva ou negativa) entre os nós ou seja, os táxons como OTUs (DINI-ANDREOTE et al., 2014).

### **3.4 Análise de metabólitos da rizosfera de trigo durante a infecção do patógeno**

A análise metabolômica foi realizada no ensaio de prova de conceito para avaliar a indução de supressividade. Neste ensaio, o genótipo com maior progresso da doença durante os ciclos foi cultivado nos solos enriquecido com a rizosfera do genótipo onde ocorreu a redução do índice de severidade da doença, em solo enriquecido com sua própria rizosfera, nos solos controles desses tratamentos (rizosfera enriquecida, porém sem patógenos) e também em solo não rizosférico (*bulk soil*). Porém, para efeito comparativo, neste experimento todas as plantas de todos tratamentos foram inoculadas com o patógeno, seguindo a mesma metodologia citada nos ensaios anteriores.

As amostras de solo rizosférico foram secas previamente antes da extração dos metabólitos para maior eficiência da extração. As amostras foram colocadas em tubo cônico de polipropileno de 50 mL para liofilização, e em seguida congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para a liofilização foram feitos furos nas tampas usando agulhas e as amostras foram colocadas em liofilizador pré-resfriado até a secagem completa do solo. Após este processo o solo foi peneirado em malha de 2 mm e 2 g de solo de cada amostra foram coletados e armazenados em tubos cônicos de 50 mL, apropriadamente rotulados para extração (NORTHEN, 2007).

As amostras de solo foram analisadas em modo íon positivo em HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) (Hewlett Packard, série Agilent Technologies® 1290) acoplada a um espectrômetro de massa Q-ToF 6550 iFunnel equipado com uma fonte

de ionização por eletropulverização (ESI) para a análise LC-MS (espectrometria de massa com cromatografia líquida). A cromatografia líquida foi realizada em uma coluna C18 usando a fase móvel A composta de etanol: água (50:50) com 0,1% de ácido fórmico e a fase móvel B foi acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico. As amostras foram eluídas com uma taxa de fluxo de  $0,45 \text{ mL min}^{-1}$  e o seguinte gradiente linear: 0 a 3 min, 5% 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% B. Os parâmetros do espectrômetro de massa utilizados foram: VCap 3000 V; tensão do fragmentador a 150 V; OCT 1RF Vpp a 750 V; temperatura do gás a  $290^{\circ}\text{C}$ ; temperatura do gás da Bainha a  $350^{\circ}\text{C}$ ; gás secante a  $12 \text{ L min}^{-1}$ . Os espectros de massa foram adquiridos no modo de perfil e o intervalo de aquisição foi de 50 a 1700 m/z (NORTHEN, 2007).

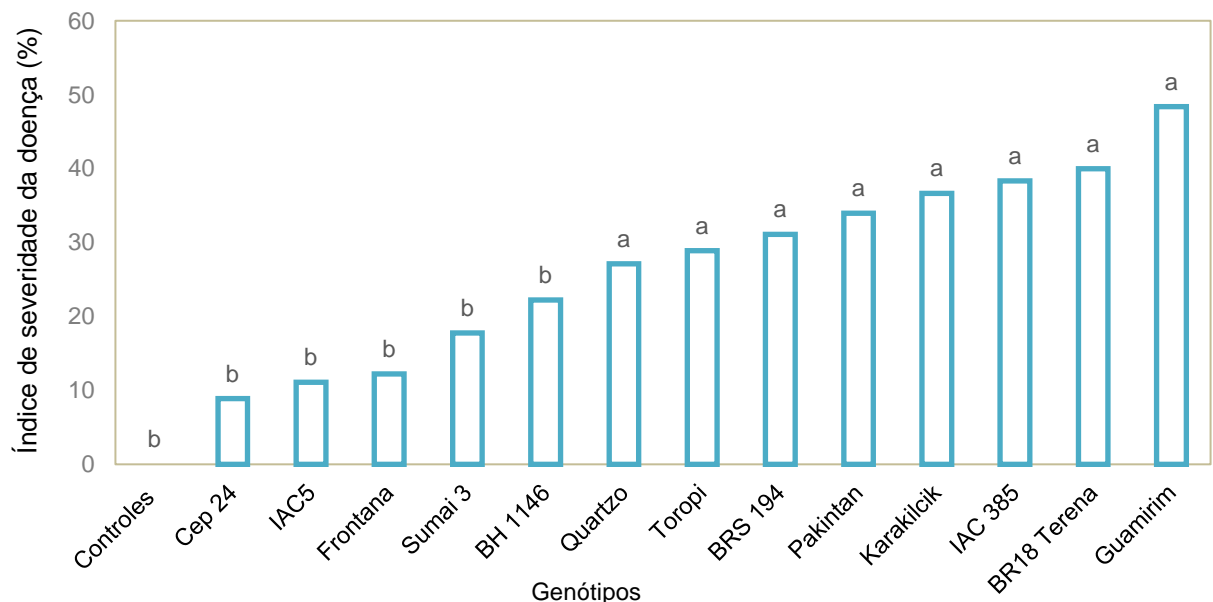


## 4 RESULTADOS

### 4.1 Seleção de genótipos de trigo com base na avaliação do índice de severidade da doença causada por *Bipolaris sorokiniana*

Os resultados da análise de variância demonstraram a existência de diferenças significativas entre os genótipos de trigo avaliados quanto ao índice de severidade da doença (ISD). Os valores de ISD encontrados entre os 13 genótipos avaliados variaram de 8,88% para Cep 24 até 48,39% para Guamirim (Figura 3).

**Figura 3 - Índice de severidade de doença de trigo causado por *Bipolaris sorokiniana* em genótipos de trigo dentre eles dois materiais ancestrais (Karakilcik) e Pakintan 81); três variedades domesticadas (Frontana, BH 1146 e IAC 5-Maringá) e três variedades domesticadas atualmente comercializadas (BRS Guamirim, Quartzo, IAC 385), outras variedades contrastantes quanto ao nível de resistência às doenças da parte aérea selecionadas de acordo com a recomendação da Embrapa Trigo (Sumai 3, Toropi, CEP24, BR18 Terena e BRS 194) e os controles caracterizado pelo cultivo de cada genótipo sem a inoculação do patógeno. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott's a 5% de probabilidade.**



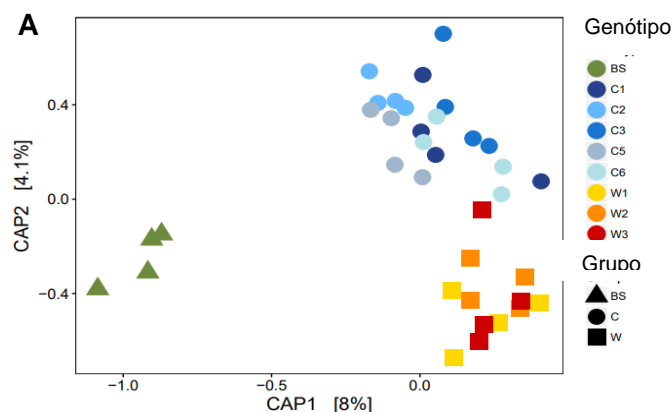
Considerando os resultados da Figura 3, para a avaliação da dinâmica da comunidade rizobacteriana em sistema de monocultivo na presença do patógeno foram selecionados os genótipos IAC 5 (resistente) e Frontana (resistente) que

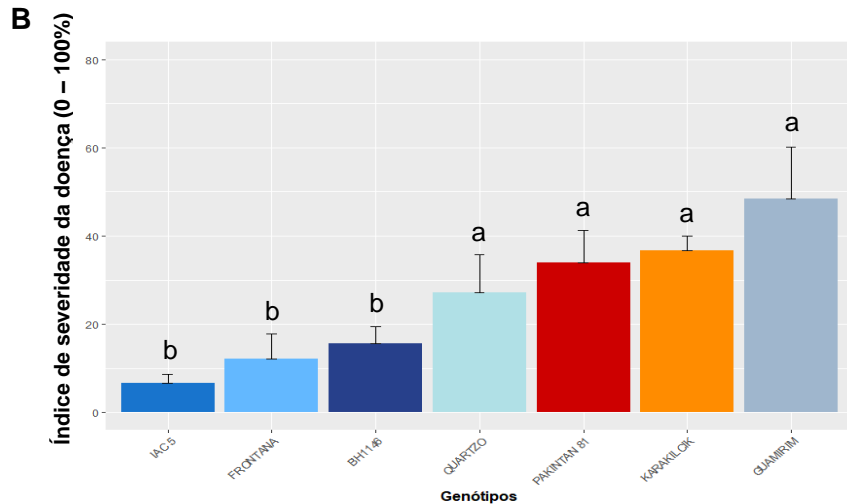
apresentaram o menor ISD e os genótipos Guamirim (suscetível) e Karakilcik (suscetível) que apresentaram os maiores ISD. Nesta seleção foi considerado o vigor de germinação e o melhor desenvolvimento das plantas por meio da observação do estabelecimento de estande de plantas em cada tratamento durante os ensaios visando manter o padrão de avaliação no ensaio.

#### 4.1.1 Caracterização da estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera de genótipos de trigos com o índice de severidade da doença causada por *Bipolaris sorokiniana*

A análise de componentes principais restrita (CAP) baseado no sequenciamento de *amplicons* do gene 16S rRNA (Figura 4 A) indicou um forte efeito rizosférico acompanhado de um padrão de agrupamento que diferencia os genótipos ancestrais e domesticados. Essa correlação foi feita considerando os dados da estrutura da comunidade bacteriana associada aos genótipos de trigo avaliados previamente no projeto “O Microbioma da rizosfera de cultivares domesticados e antigos de trigo” (CNPq 443112/2014-2). A correlação do microbioma bacteriano rizosférico com o índice de severidade da doença causada por *B. sorokiniana* foi avaliada nas plantas da variedade IAC 5 (resistente) e nas da variedade Guamirim (suscetível). A estruturação da comunidade bacteriana da rizosfera e o ISD foram positivamente correlacionados ( $p = 0,03$ ) (Figura 4B).

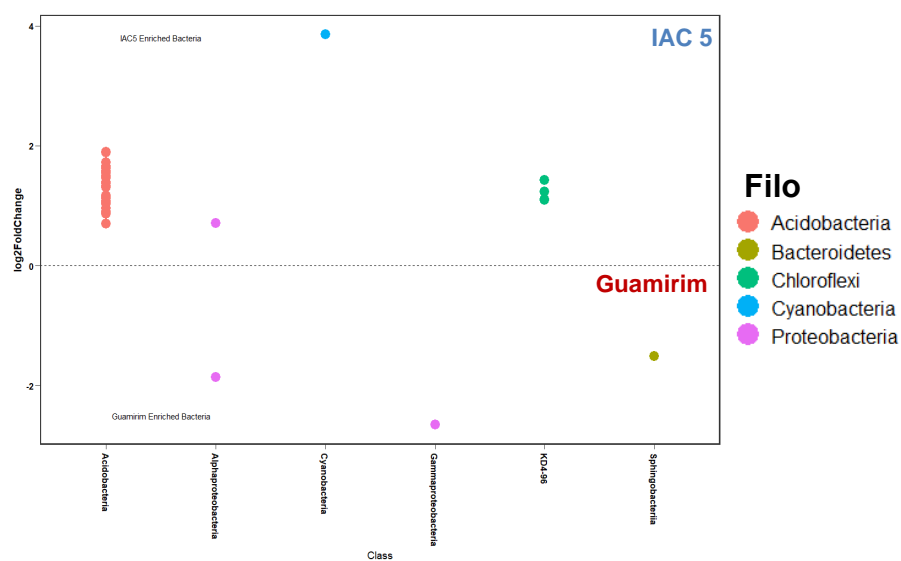
**Figura 4 - A. Análise de coordenadas principais restrita (CAP) para diferenças na comunidade rizosférica de genótipos de trigo ancestral e domesticados (BS = *bulk soil*, W1 = Iran, W2= Karakilcik, W3 = Pakintan, C1 = BH 1146, C2 = Frontana, C3 = IAC 5, C4 = Guamirim e C5 = Quartzo) (ROSSMANN et al., 2020) B. Índice de severidade da doença de genótipos de trigo causada por *Bipolaris sorokiniana*. Médias seguidas pela mesma letra não são**





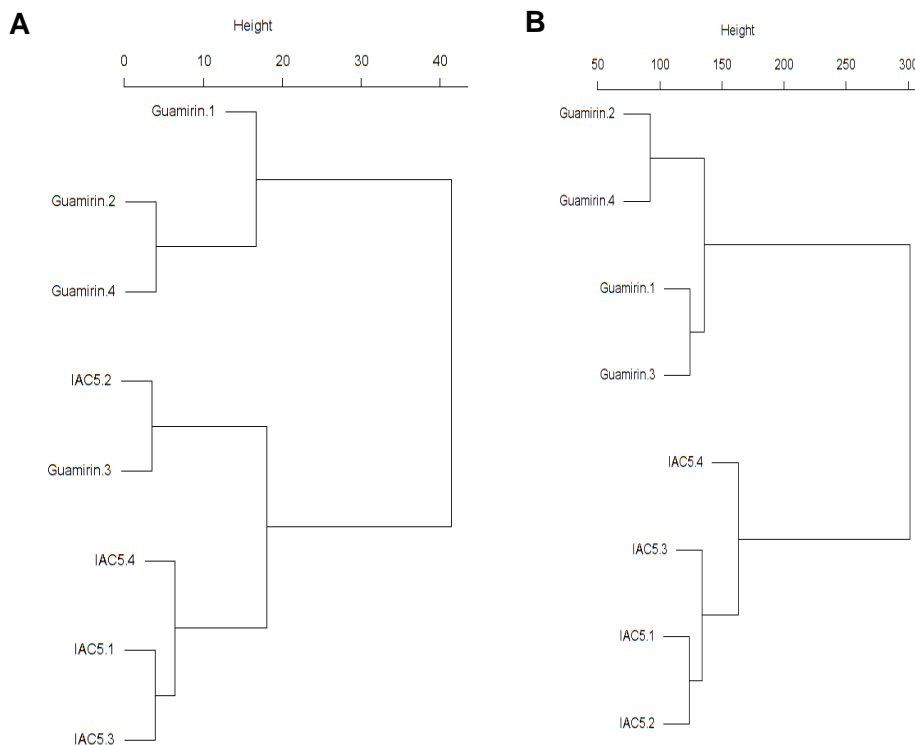
Quando as OTUs diferencialmente enriquecidas foram acessadas em ambos os genótipos contrastantes foi observado maior número de classes enriquecidas para o genótipo resistente IAC 5 (Figura 5).

**Figura 5 - Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) diferencialmente enriquecidas na rizosfera do genótipo Guamirim e IAC 5 obtidas pela análise diferencial (DESeq2). Os pontos representam as OTUs diferencialmente enriquecidas que estão em maior abundância em IAC 5 (resistente) (acima) e em Guamirim (suscetível) (abaixo). As OTUs estão demonstradas por classes no eixo das abcissas e coloridas de acordo com o filo que a OTU se origina ( $p < 0,05$ ;**



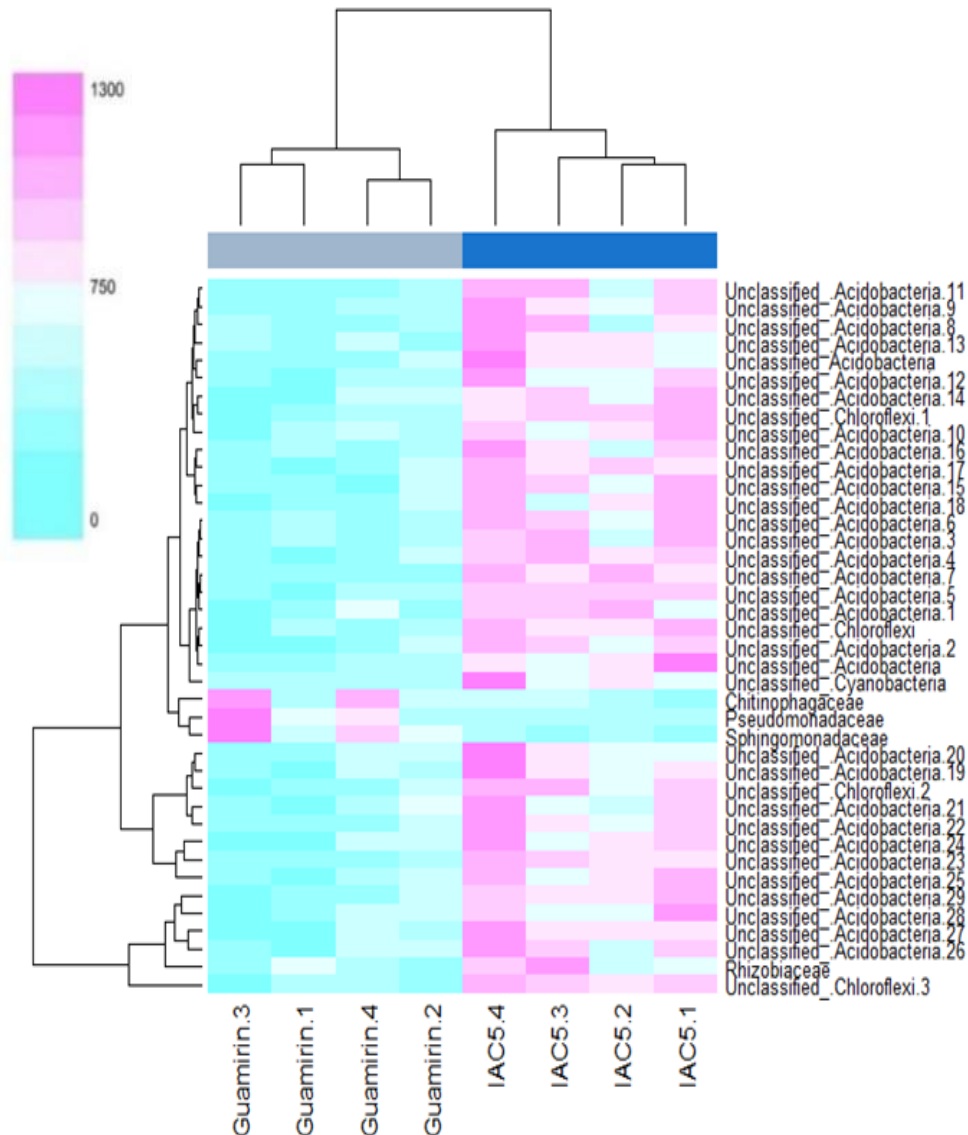
A análise de Cluster observada no dendrograma apontou a formação do agrupamento dos genótipos analisados, tanto entre os dois genótipos em relação ao progresso da doença (Figura 6A) quanto ao perfil taxonômico da rizosfera (Figura 6B).

**Figura 6 - Dendrograma de similaridade de cada uma das amostras de rizosfera A. Agrupamento diferencial dos genótipos selecionados de IAC 5 (resistente) e Guamirim (suscetível) e índice de severidade da doença. B. Agrupamento por enriquecimento diferencial entre as amostras. Para análise de similaridade entre as amostras rizosféricas dos genótipos de trigo foi utilizado o índice de correlação de Spearman e o método UPGMA**



Diferença significativa na abundância de OTUs, principalmente dos filos de Acidobacteria, Chloroflexi, Rhizobiaceae e Cyanobacteria no genótipo com o menor índice de severidade da doença IAC 5 (Figura 7A), pode ser observada no *heatmap*. Esse resultado sugere que o enriquecimento desses filos na rizosfera do genótipo IAC 5 pode estar associado à defesa da planta.

**Figura 7 - Heatmap da abundância absoluta de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) diferencialmente enriquecidas entre os genótipos contrastantes Guamirim (suscetível) e IAC 5 (resistente). O diagrama de cor no canto esquerdo superior indica o nível de abundância das OTUs.**

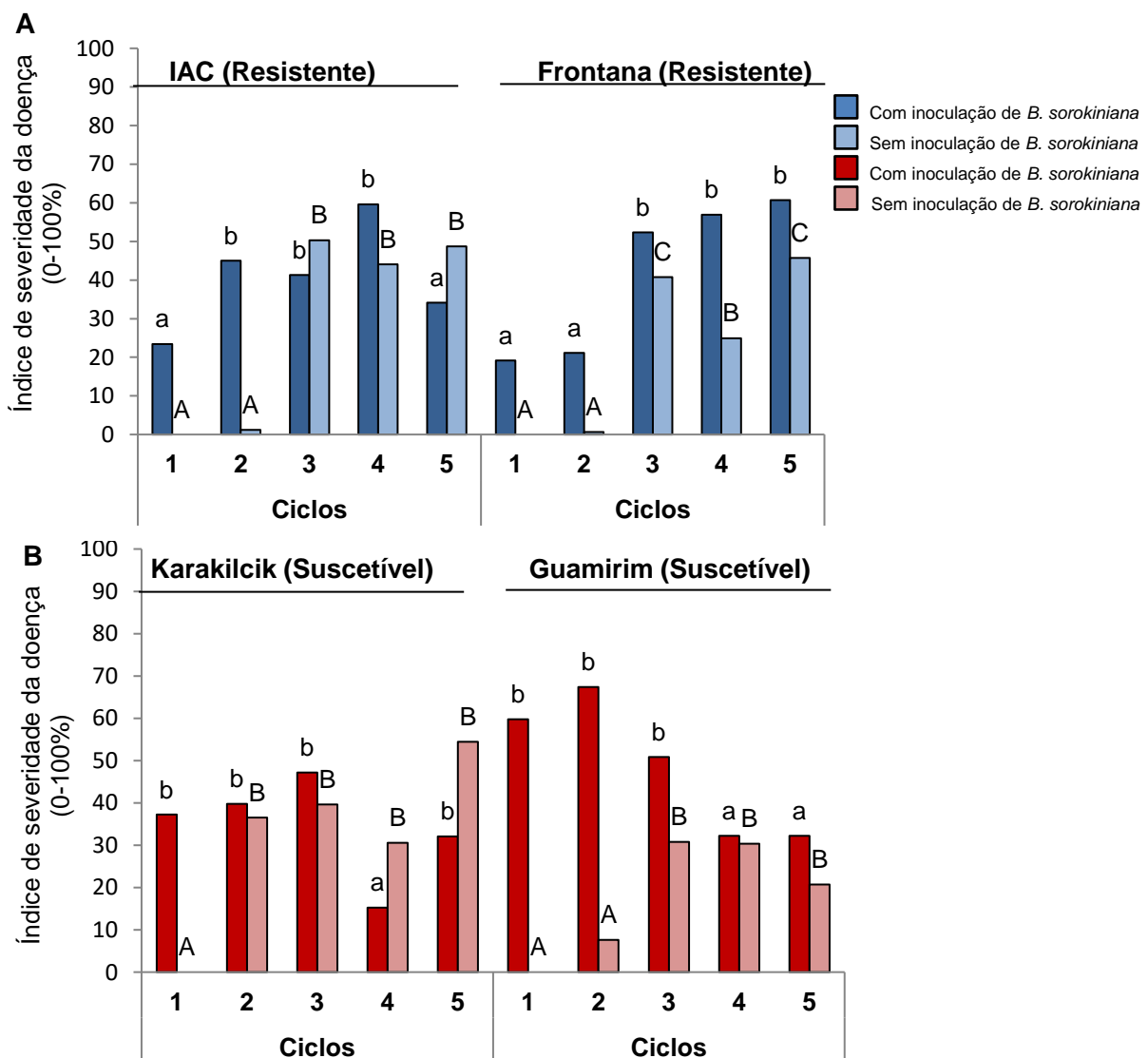


#### **4.2 Índice de severidade da doença (ISD) dos genótipos resistentes e suscetíveis a *Bipolaris sorokiniana* ao longo dos ciclos de cultivo**

Para avaliar o enriquecimento das comunidades bacterianas na rizosfera e sua iminente capacidade de proteção a *B. sorokiniana*, quatro genótipos contrastantes, i.e. dois suscetíveis e dois resistentes, foram selecionados e cultivados no sistema de monocultivo com e sem patógeno. Nos tratamentos com a inoculação do patógeno, foi observado o aumento do progresso da doença nos genótipos resistentes IAC 5 e

Frontana (Figura 8A) e supressão da doença ao longo dos ciclos nos genótipos susceptíveis Karakilcik e Guamirim (Figura 8B), sendo que o padrão foi mais evidente na supressão da doença foi observado no Guamirim. A mesma tendência da evolução da doença foi observada nos tratamentos sem a inoculação do patógeno, principalmente a partir do terceiro ciclo.

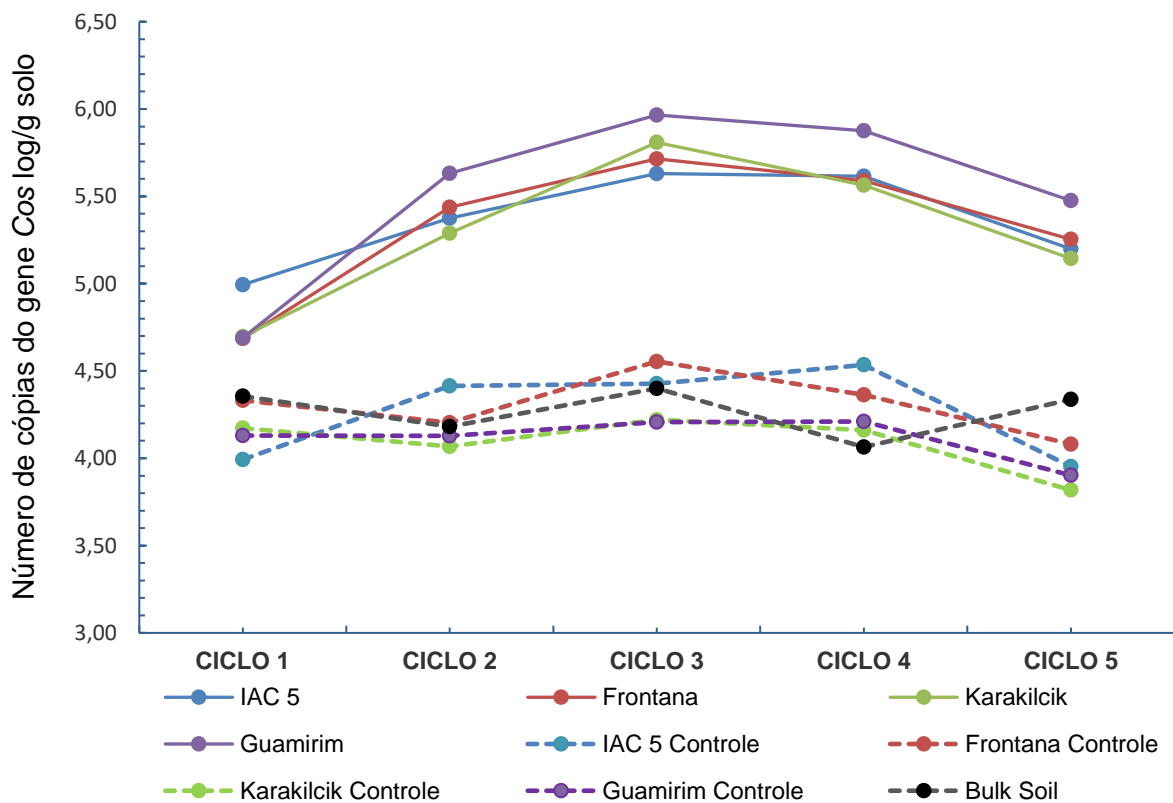
**Figura 8 - Índice de severidade da doença de genótipos de trigo contra *Bipolaris sorokiniana* em cinco ciclos de cultivo. A. Genótipos resistentes (Frontana e IAC 5). Colunas na cor azul escuro representam os tratamentos com patógeno e colunas na cor azul claro sem patógeno. B. Genótipos suscetíveis (Guamirim e Karakilcik). Colunas na cor vermelho escuro representam os tratamentos com patógeno e colunas na cor vermelho claro sem patógeno. As médias seguidas pela mesma letra nos genótipos (letras maiúsculas para comparação sem patógeno e letras minúsculas para comparação com**



### 4.3 Dinâmica do patógeno no solo

A análise de qPCR indicou a presença do patógeno *B. sorokiniana* nas amostras coletadas já no primeiro ciclo de cultivo, mesmo nos tratamentos onde não houve inoculação. O maior número de cópias de DNA (ng/ $\mu$ L) do patógeno foi observado na rizosfera dos genótipos inoculados com *B. sorokiniana* durante todos os ciclos quando comparado com as amostras dos tratamentos controle (sem inoculação) e do *bulk soil* (APÊNDICE A; Tabela 4;  $p < 0.05$ ). Foi possível observar também que a maior concentração de DNA do patógeno foi encontrado na rizosfera do genótipo Guamirim do segundo ao último ciclo de cultivo (Figura 9 A).

**Figura 9 - Número de cópias de DNA (ng/  $\mu$ L) do patógeno *Bipolaris sorokiniana* presente na rizosfera do trigo de genótipos resistentes (Frontana e IAC 5) e suscetíveis (Guamirim e Karakilcik). As linhas pontilhadas indicam os tratamentos controle, ou seja, sem a inoculação do patógeno.**



#### 4.4 Dinâmica da comunidade rizobacteriana de genótipos de trigo durante ciclos consecutivos de cultivo na presença de *Bipolaris sorokiniana*

Para observar a dinâmica da comunidade rizobacteriana de genótipos de trigo durante ciclos consecutivos de cultivo na presença de *B. sorokiniana* foi usada a técnica de sequenciamento genético do gene 16S rRNA que permitiu comparar a estrutura da comunidade microbiana na rizosfera dos genótipos de trigo. Depois das verificações de qualidade no programa FastQC, as *reads* de qualidade suficiente foram mantidas para análise posterior. A curva de rarefação (Apêndice A; Figura 26) indicou a adequação da amostragem e que o número de sequências obtidas, foi suficiente para representar a diversidade das comunidades bacterianas da rizosfera em cada amostra (ARMOUGOM; RAOULT, 2009; ROESCH et al., 2007). O perfil da comunidade bacteriana produziu um total de 10.270.419 sequencias detectadas (Apêndice A; Tabela 3).

##### 4.4.1 Alpha Diversidade

A riqueza e diversidade foi inferida por meio da análise de diversidade  $\alpha$ , examinadas por índices Chao1, Shannon e de Simpson. Para valores de riqueza (Chao1) foram observadas diferenças significativas entre o *bulk soil* e todos os genótipos de trigo no terceiro ciclo de cultivo. No quarto ciclo os valores de riqueza do solo não cultivado (*bulk soil*) se mantiveram abaixo dos outros tratamentos, com exceção do genótipo Karakilcik (suscetível) que teve riqueza estatisticamente igual do *bulk soil* neste ciclo. Os valores de diversidade Shannon das amostras de rizosfera dos genótipos Frontana, Guamirim e IAC 5 foram maiores que os do genótipo Karakilcik (suscetível) e do *bulk soil* nos ciclos 1, 2, 4 e 5. Para o índice Simpson foi possível observar diversidade maior para Frontana (resistente), Guamirim (suscetível) e IAC 5 (resistente) nos dois primeiros ciclos. No terceiro ciclo Guamirim se agrupou com Karakilcik (suscetível) e *bulk soil* e no quarto ciclo não houve diferença de diversidade entre as amostras. (APÊNDICE A, Tabela 5).

Na comparação de valores de riqueza e diversidade entre os genótipos e seus respectivos controles dentro dos ciclos não ocorreu diferença estatística para os índices de diversidade e de riqueza na maioria dos ciclos, indicando que a comunidade



bacteriana dentro das amostras apresenta padrão de diversidade e riqueza similares no decorrer do tempo (Tabela 2).

**Tabela 2 - Índices de Alpha diversidade entre os tratamentos e controle dentro dos ciclos (índice de riqueza Chao 1, índice de diversidade Shannon e Simpson).**

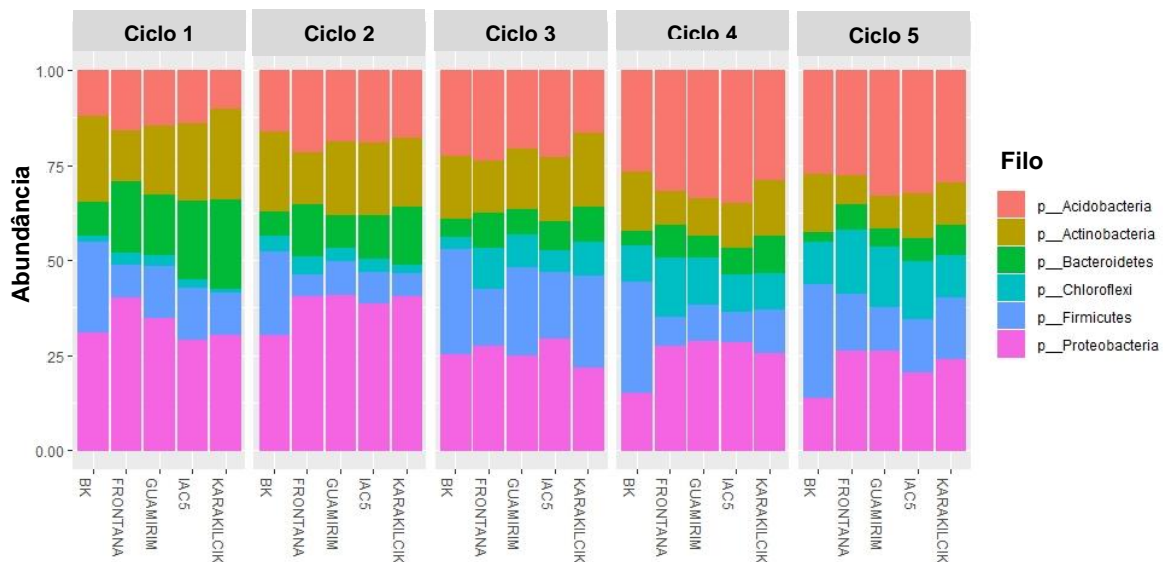
		Alpha diversidade			
Genótipo	Ciclo	Patógeno	Chao	Shannon	Simpson
<b>Frontana (resistente)</b>	1	Com Patógeno	13746.17 a	7.119395 a	0.9966684 a
		Sem Patógeno	10934.47 a	6.848173 b	0.9957021 b
	2	Com Patógeno	10872.46 a	7.249013 a	0.9975782 a
		Sem Patógeno	12687.57 a	7.234296 a	0.9974108 a
	3	Com Patógeno	7165.36 b	7.149051 a	0.9974572 a
		Sem Patógeno	7473.93 a	7.129485 a	0.9973906 a
	4	Com Patógeno	8882.50 a	7.229350 a	0.9975649 a
		Sem Patógeno	8831.45 a	7.118887 a	0.9967338 a
	5	Com Patógeno	7129.36 a	7.125028 a	0.9972531 a
		Sem Patógeno	7259.53 a	7.094872 a	0.9972266 a
<b>IAC 5 (resistente)</b>	1	Com Patógeno	13131.61 a	7.039474 a	0.9965664 a
		Sem Patógeno	10910.70 b	6.959476 a	0.9959742 a
	2	Com Patógeno	12288.50 a	7.214464 a	0.9973234 a
		Sem Patógeno	13265.39 a	7.211955 a	0.9972695 a
	3	Com Patógeno	6768.89 a	7.049739 a	0.9972646 a
		Sem Patógeno	6788.05 a	7.055442 a	0.9973299 a
	4	Com Patógeno	8347.02 a	7.122780 a	0.9973244 a
		Sem Patógeno	8343.44 a	7.097311 a	0.9970864 a
	5	Com Patógeno	8347.02 a	7.122780 a	0.9970718 a
		Sem Patógeno	8343.44 a	7.097311 a	0.9971194 a
<b>Guamirim (suscetível)</b>	1	Com Patógeno	12508.26 a	7.083673 a	0.9967516 a
		Sem Patógeno	12622.27 a	6.981333 a	0.9947858 a
	2	Com Patógeno	13786,99 a	7.307036 a	0.9975585 a
		Sem Patógeno	13854.19 a	7.373490 a	0.9976195 a
	3	Com Patógeno	7449.13 a	7.091684 a	0.9968433 a
		Sem Patógeno	6513.84 a	7.022980 a	0.9972552 a
	4	Com Patógeno	8665.93 a	7.126838 a	0.9971226 a
		Sem Patógeno	8060.25 a	7.081597 a	0.9971513 a
	5	Com Patógeno	6628.37 a	7.017343 a	0.9970981 a
		Sem Patógeno	6996.36 a	7.021516 a	0.9970687 a
<b>Karakilcik (suscetível)</b>	1	Com Patógeno	12886.13 a	6.897729 b	0.9958140 a
		Sem Patógeno	13214.40 a	7.062107 a	0.9963040 a
	2	Com Patógeno	11470.68 a	7.098593 b	0.9961826 a
		Sem Patógeno	11918.89 a	7.298382 a	0.9976610 a
	3	Com Patógeno	6759.67 a	6.931477 b	0.9972706 b
		Sem Patógeno	6887.69 a	7.066251 a	0.9965180 a
	4	Com Patógeno	6095.23 a	6.887591 a	0.9969905 a
		Sem Patógeno	7807,61 a	7.054485 a	0.9972110 a
	5	Com Patógeno	6310.52 a	6,910553 a	0.9967628 a
		Sem Patógeno	6955.83 a	7.020136 a	0.9969506 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott's a 5% de probabilidade.

Porém, no primeiro ciclo para o genótipo Frontana, os índices de diversidade Shannon e Simpson foram maiores nas parcelas inoculadas e para o índice de riqueza Chao1 no terceiro ciclo a riqueza foi maior no tratamento sem inoculação do patógeno. Em IAC 5 para esse mesmo índice ocorreu maior valor de riqueza para o tratamento com inoculação de patógeno no primeiro ciclo, tornando-se estatisticamente igual nos outros ciclos. Por fim, o genótipo que apresentou maior diferença estatística entre os tratamentos inoculados e seus controles foi Karakilcik para o índice Shannon onde até o terceiro ciclo manteve diversidade estatisticamente maior para a rizosfera sem inoculação de *B. sorokiniana*.

Na maioria dos genótipos, no decorrer dos ciclos de cultivo, a composição taxonômica apresentou aumento de abundância relativa principalmente para os filos bacterianos Acidobacteria, Choloroflexi, Firmicutes e redução para o filo Proteobacteria, assim como o filo Bacteroidetes (Figura 10).

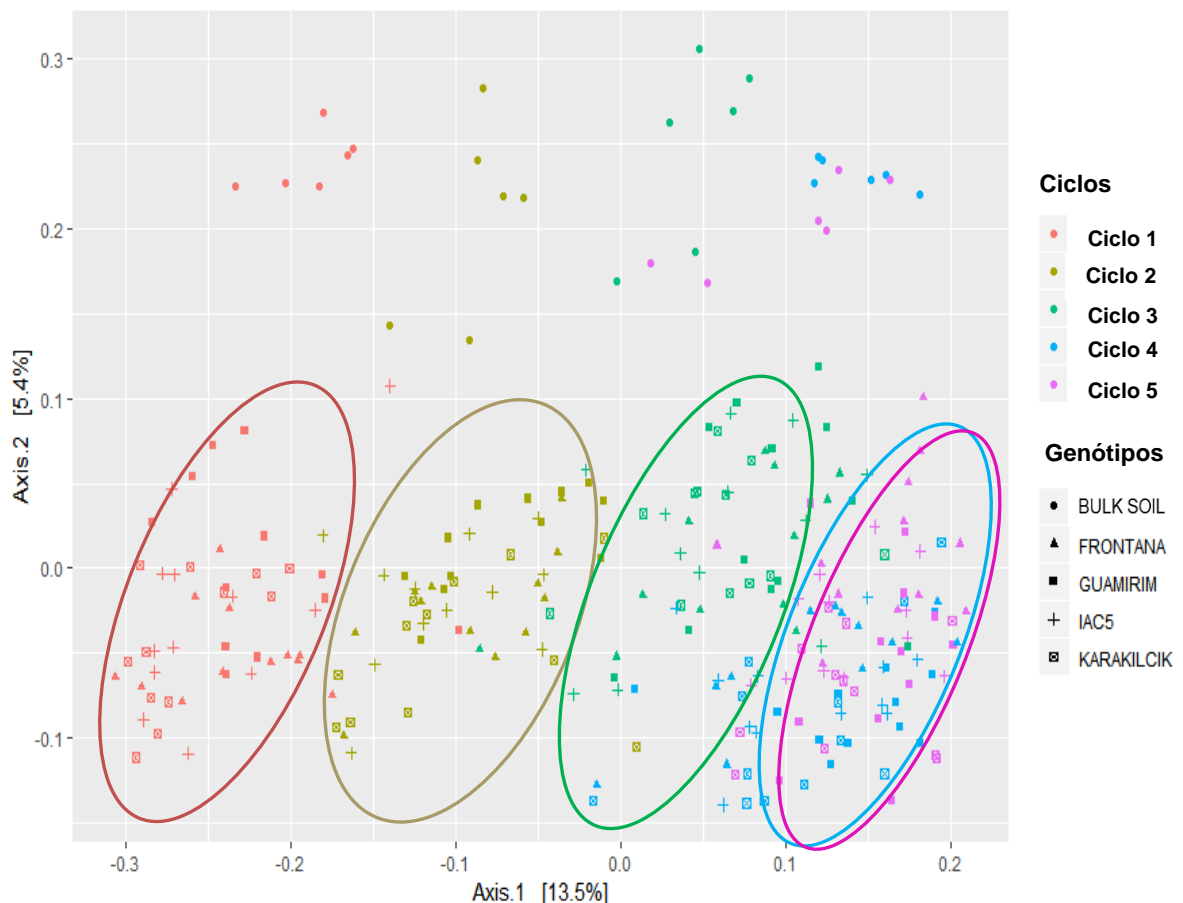
**Figura 10 - Abundância relativa dos filos rizobacterianos mais abundantes em amostras da rizosfera de trigo [4 genótipos sendo 2 resistentes (Frontana e IAC 5) e 2 suscetíveis (Guamirim e Karakilcik] e bulk soil coletadas em diferentes ciclos durante a indução da doença causada por *Bipolaris sorokiniana*.**



#### 4.4.2 Beta diversidade

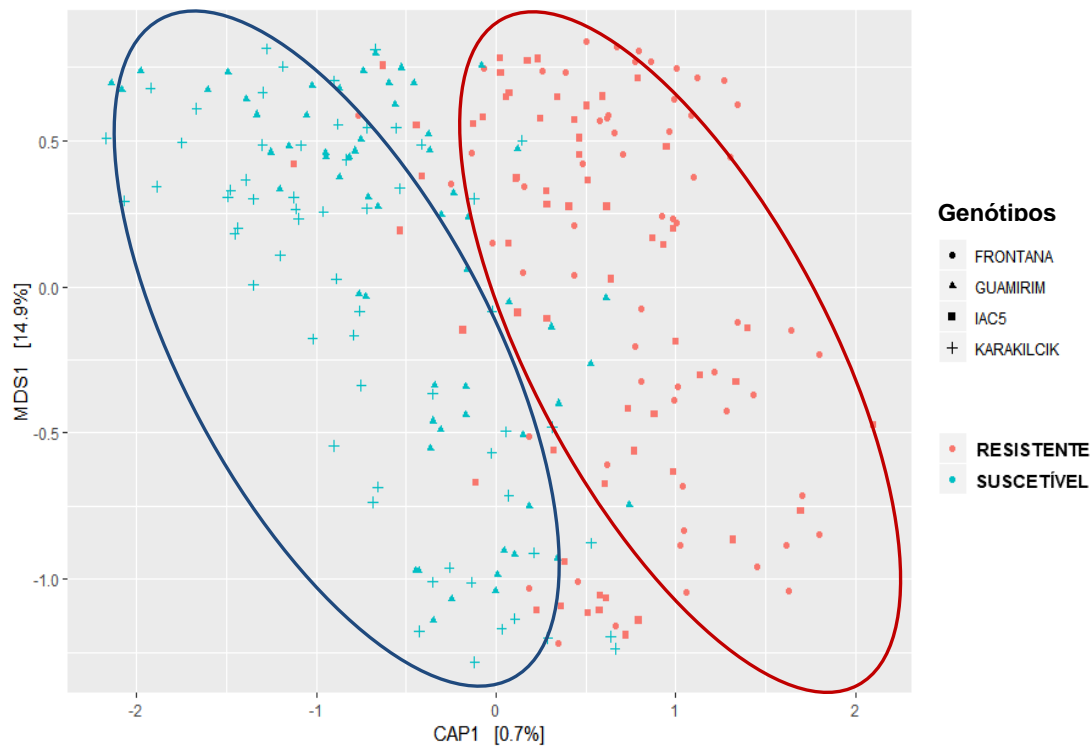
A  $\beta$ -diversidade foi avaliada usando análise de coordenadas principais (PCoA) e análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) em dissimilaridades de Bray-Curtis. A análise de PERMANOVA confirmou as diferenças marcantes entre os ciclos de cultivo ( $R^2 = 0,012$   $p < 0,001$ ) e impacto significativo dos genótipos de trigo na comunidade bacteriana ( $R^2 = 0,019$ ,  $p < 0,01$ ; APÊNDICE A; Tabela 5). Houve pronunciado efeito rizosférico *bulk soil* (Figura 11), evidenciando a diferença da composição taxonômica da comunidade bacteriana na rizosfera quando comparada ao *bulk soil*. A diferenciação entre as comunidades da rizosfera, quando os diferentes ciclos foram comparados, foi mais acentuada durante os três primeiros ciclos de cultivo, revelando um agrupamento homogêneo no quarto e quinto ciclo (Figura 11).

**Figura 11 - Análise de coordenadas principais (PCoA) de beta diversidade dos dados de amplificação do gene 16S rRNA da rizosfera de genótipos de trigo e coletadas em diferentes ciclos. Considerando 2 genótipos resistentes (Frontana e IAC 5) e 2 genótipos suscetíveis (Guamirim e Karakilcik com e sem patógeno e amostras de *bulk soil* em cinco ciclos.**



A análise de coordenadas principais restrita ao fator resistência/suscetibilidade exibiu um forte efeito do genótipo nas comunidades bacterianas apresentando um padrão de separação entre genótipos resistentes e suscetíveis (Figura 12).

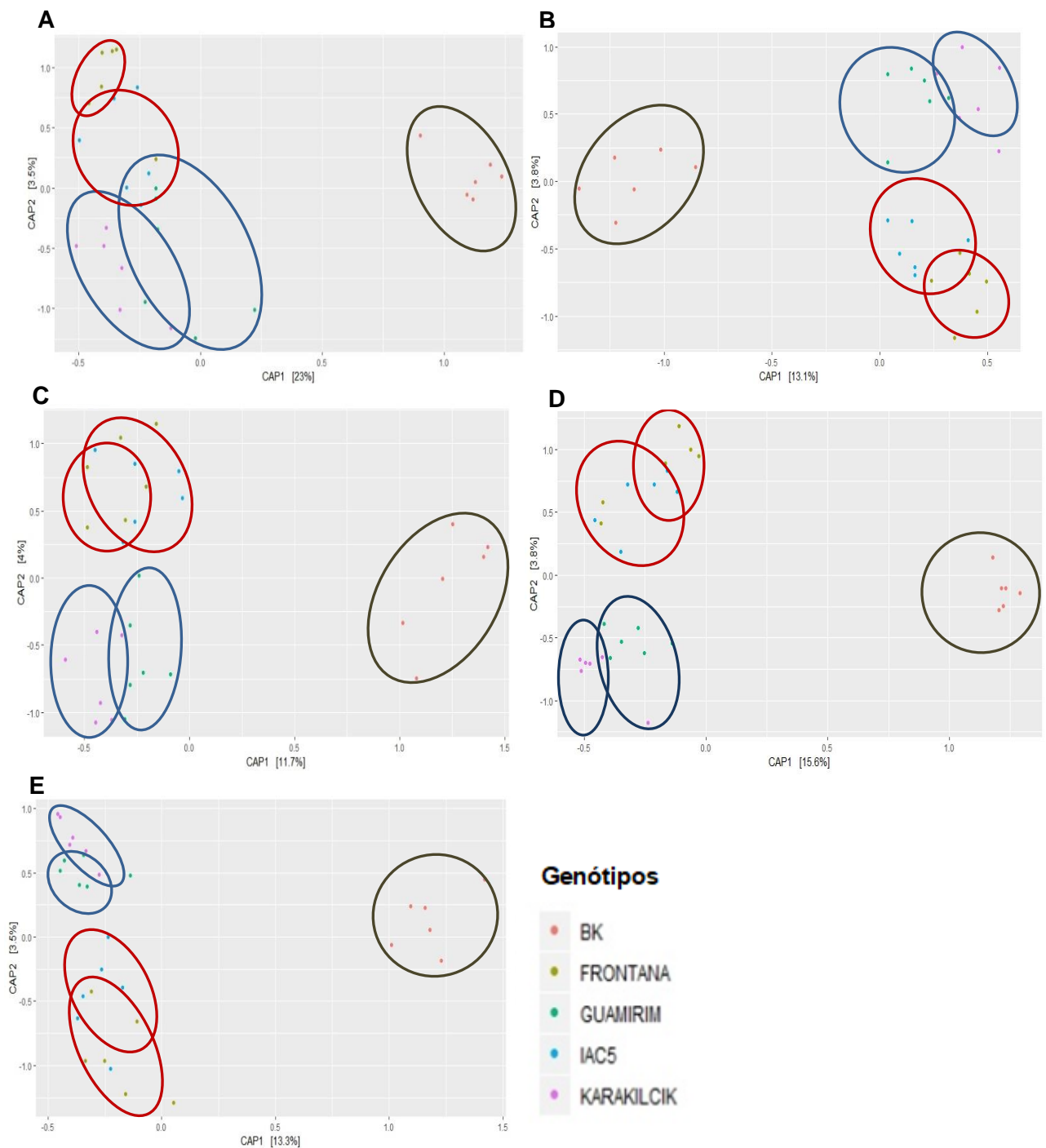
**Figura 12 - Análise de coordenadas principais restrita (CAP) dos dados de amplificação do gene 16S rRNA da rizosfera de genótipos de trigo coletadas em diferentes ciclos. Considerando 2 genótipos resistentes (Frontana e IAC 5) e 2 genótipos suscetíveis (Guamirim e Karakilcik com e sem patógeno em cinco ciclos).**



A comunidade rizobacteriana dos genótipos de trigo, observadas por meio da análise de coordenadas principais restrita ao genótipo (CAP), se comportou de forma distinta durante os ciclos de cultivo. Durante o primeiro ciclo a composição inicial da comunidade bacteriana do solo indicou tendência a agrupamento em dois grupos que corresponderam aos genótipos resistentes e suscetíveis e separação com o *bulk soil* (Figura 13A). Este comportamento foi confirmado no decorrer dos ciclos com separação clara entre a comunidade bacteriana dos genótipos resistentes e suscetíveis. Estes resultados indicam efeito rizosférico ao longo do experimento,

comprovando que a microbiota da raiz e do solo das plantas diferem acentuadamente em riqueza, composição e taxonomia.

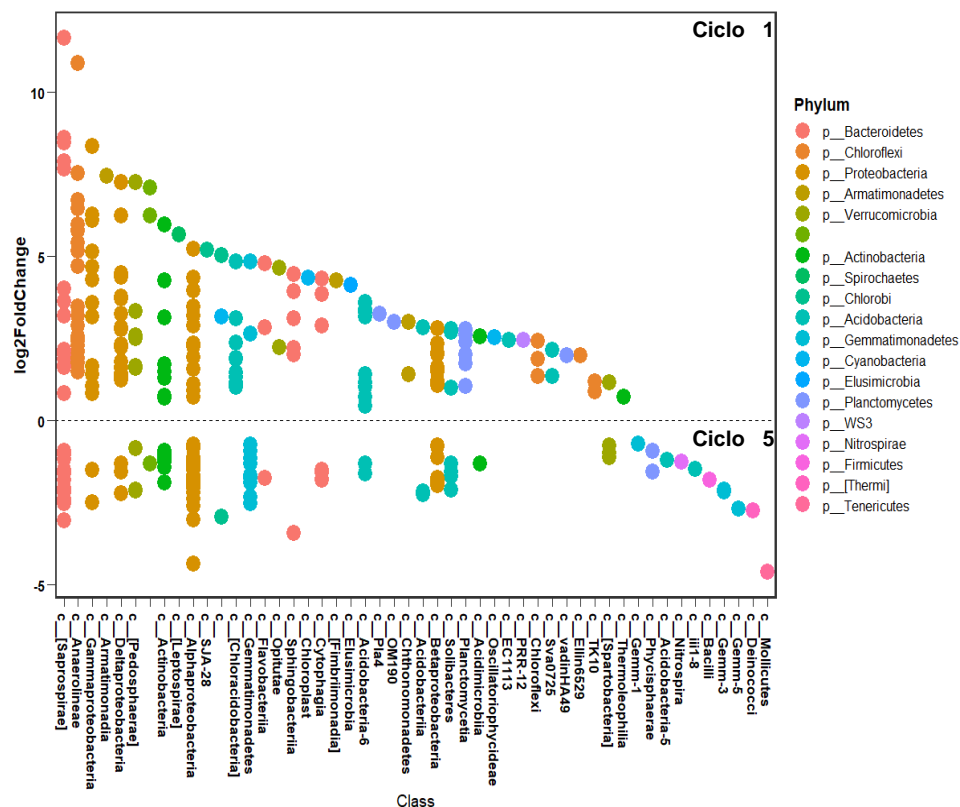
**Figura 13 - Análise de coordenadas principais restrita (CAP) da diversidade beta dos dados de amplificação 16S rRNA da comunidade bacteriana da rizosfera coletada em cada ciclo. Considerando 2 genótipos resistentes (Frontana e IAC 5) e 2 genótipos suscetíveis (Guamirim e Karakilcik com e sem patógeno em cinco ciclos e *bulk soil*). Círculo vermelho equivale a genótipos resistentes, Círculo azul equivale a genótipos suscetíveis e círculo marrom**



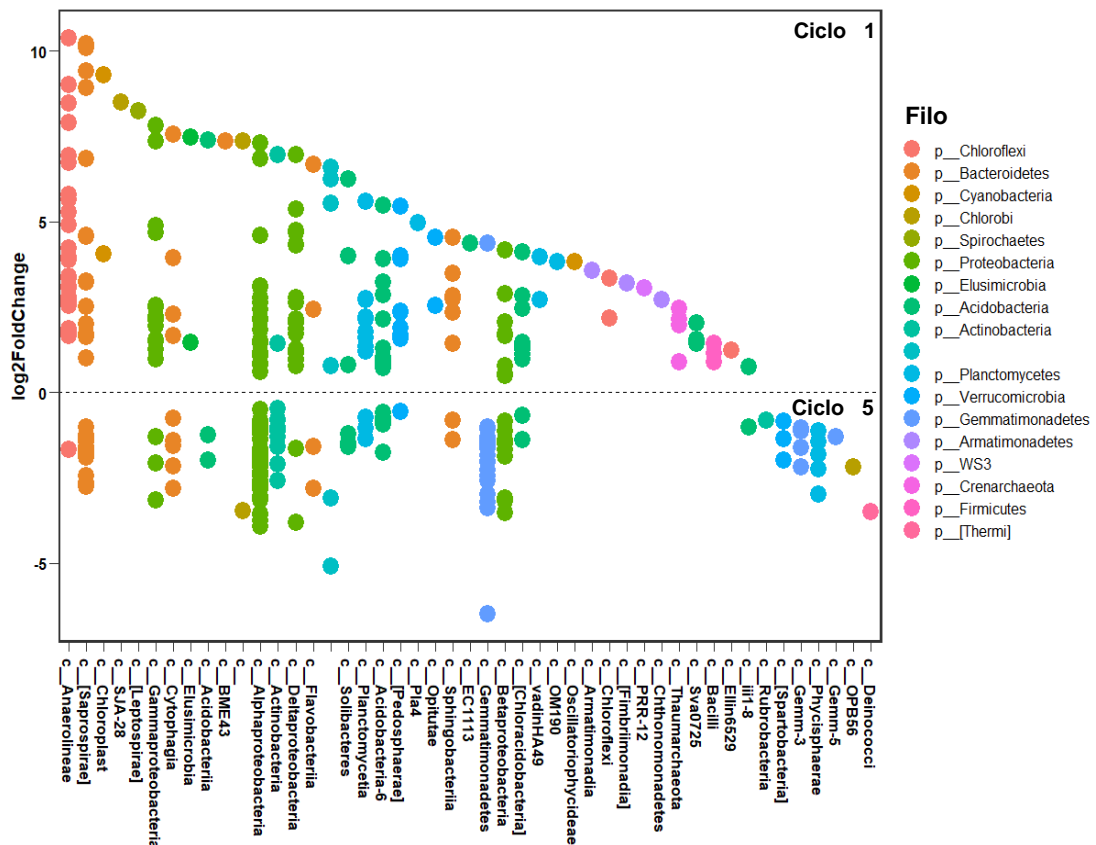
#### 4.5 Táxons diferencialmente enriquecidos na rizosfera dos genótipos de trigo

A análise diferencial foi utilizada para identificar as OTUs bacterianas diferencialmente enriquecidas na rizosfera dos genótipos Frontana e Guamirim, os mais contrastantes em relação a doença, escolhidos por apresentarem comportamento bem definido de aumento e redução da doença durante o monocultivo. A abordagem revelou a existência de correlação positiva de OTUs bacterianas diferencialmente enriquecidas na rizosfera dos genótipos com os ciclos de cultivo (Mantel  $r: 0,1901$ ;  $p < 0,0139$ ). Os resultados indicam uma redução no número de OTUs diferencialmente enriquecidas entre o primeiro e último ciclo na rizosfera dos genótipos Guamirim (Figura 14) e Frontana (Figura 15), com redução de aproximadamente 12 classes bacterianas no ciclo 5.

**Figura 14 - Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) diferencialmente enriquecidas entre os ciclos 1 e 5 na rizosfera do genótipo Guamirim (S) de acordo com a análise diferencial (DESeq2). Pontos representam OTUs diferencialmente enriquecidas que estão em maior abundância, agrupados por classe no eixo x e por filo no eixo y. ( $\log_2$  fold change  $\geq 1$  e  $p < 0,05$  calculado pelo teste WALD).**

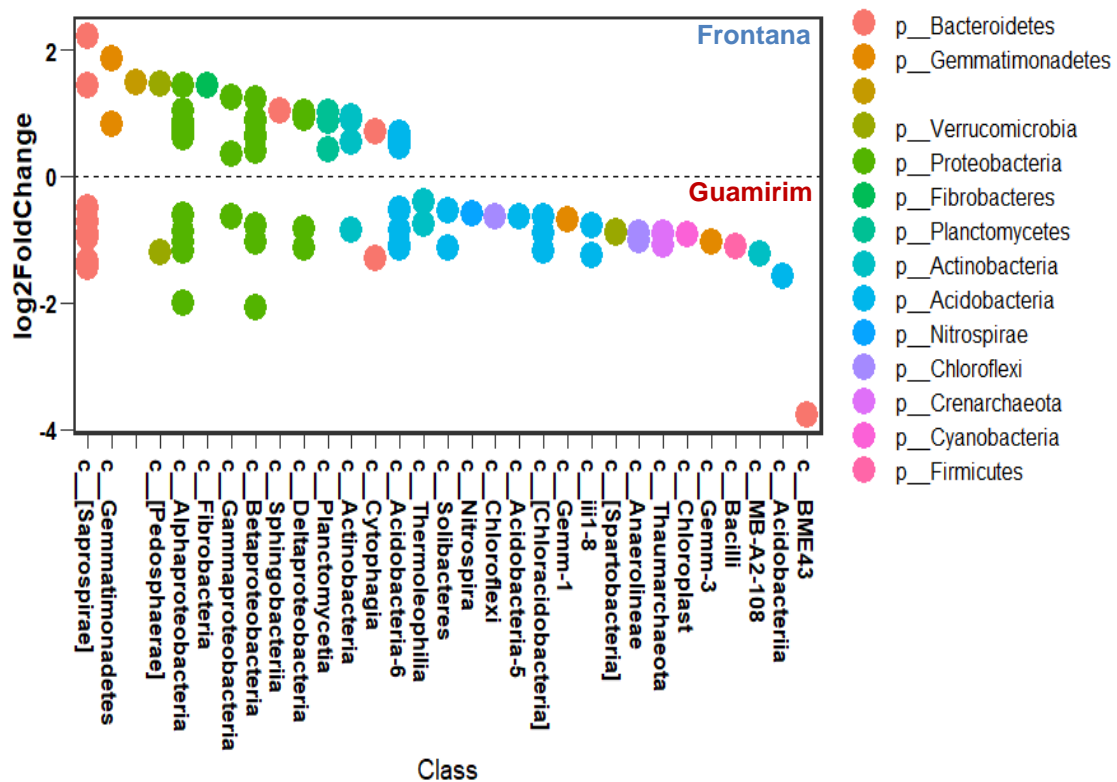


**Figura 15 - Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) diferencialmente enriquecidas entre os ciclos 1 e 5 na rizosfera do genótipo Frontana (R) de acordo com a análise diferencial (DESeq2). Pontos representam OTUs diferencialmente enriquecidas que estão em maior abundancia, agrupados por classe no eixo x e por filo no eixo y. ( $\log_2$  fold change  $\geq 1$  e  $p < 0,05$  calculado pelo teste WALD).**



Quando realizada a comparação entre os genótipos, considerando apenas o último ciclo de cultivo, um número maior de taxas significativamente enriquecidas foi observado na rizosfera do genótipo Guamirim (suscetível) (Figura 16). Foram contabilizados 10 filis bacterianos e 26 classes, dentre essas, 7 foram exclusivas na rizosfera deste genótipo e 8 classes pertencentes aos filis Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia e Acidobacteria foram compartilhadas entre os dois genótipos. Não foi relatado efeito da doença no enriquecimento de OTUs para o genótipo Guamirim (suscetível).

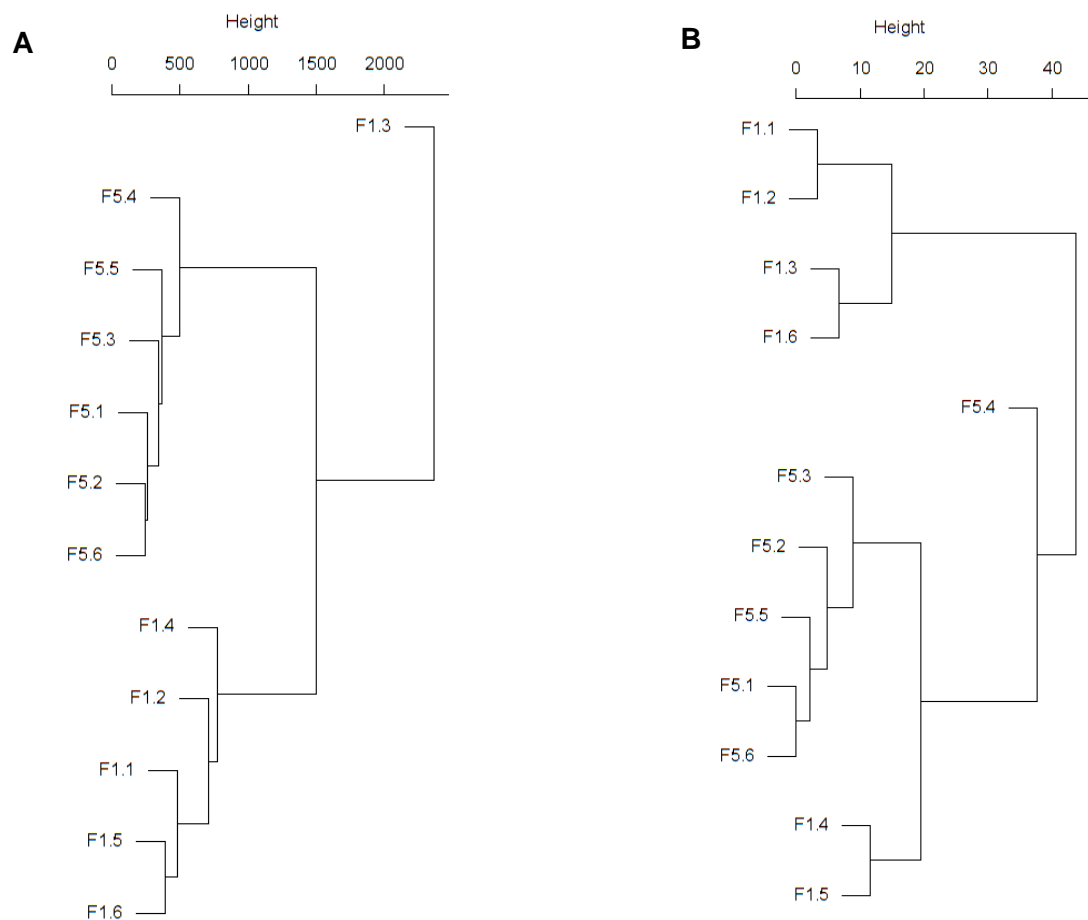
**Figura 16 - Unidades taxonômicas operacionais (OTUs) diferencialmente enriquecidas entre os genótipos Frontana e Guamirim de acordo com a análise diferencial (DESeq2) no último ciclo de cultivo. Pontos representam OTUs diferencialmente enriquecidas que estão em maior abundância, agrupados por classe no eixo x e por filo no eixo y. ( $\log_2$  fold change  $\geq 1$  e  $p < 0,05$  calculado pelo teste WALD).**



Em contrapartida, houve correlação positiva entre as OTUs diferencialmente enriquecidas e o ISD para o genótipo Frontana (resistente) (Mantel  $r: 0,3199$   $p < 0,0145$ ). As diferenças na composição das comunidades de táxons bacterianos rizosféricos e ISD amostrados nos ciclos 1 e 5 estão resumidas por dendrograma de similaridade. Para o perfil taxonômico foram observados dois clusters separando primeiro e quinto ciclo (Figura 17A). Em relação ao ISD não foi observado um agrupamento tão pronunciado das amostras do ciclo 1, porém a maioria das amostras do quinto ciclo se agruparam em um único cluster (Figura 17B).

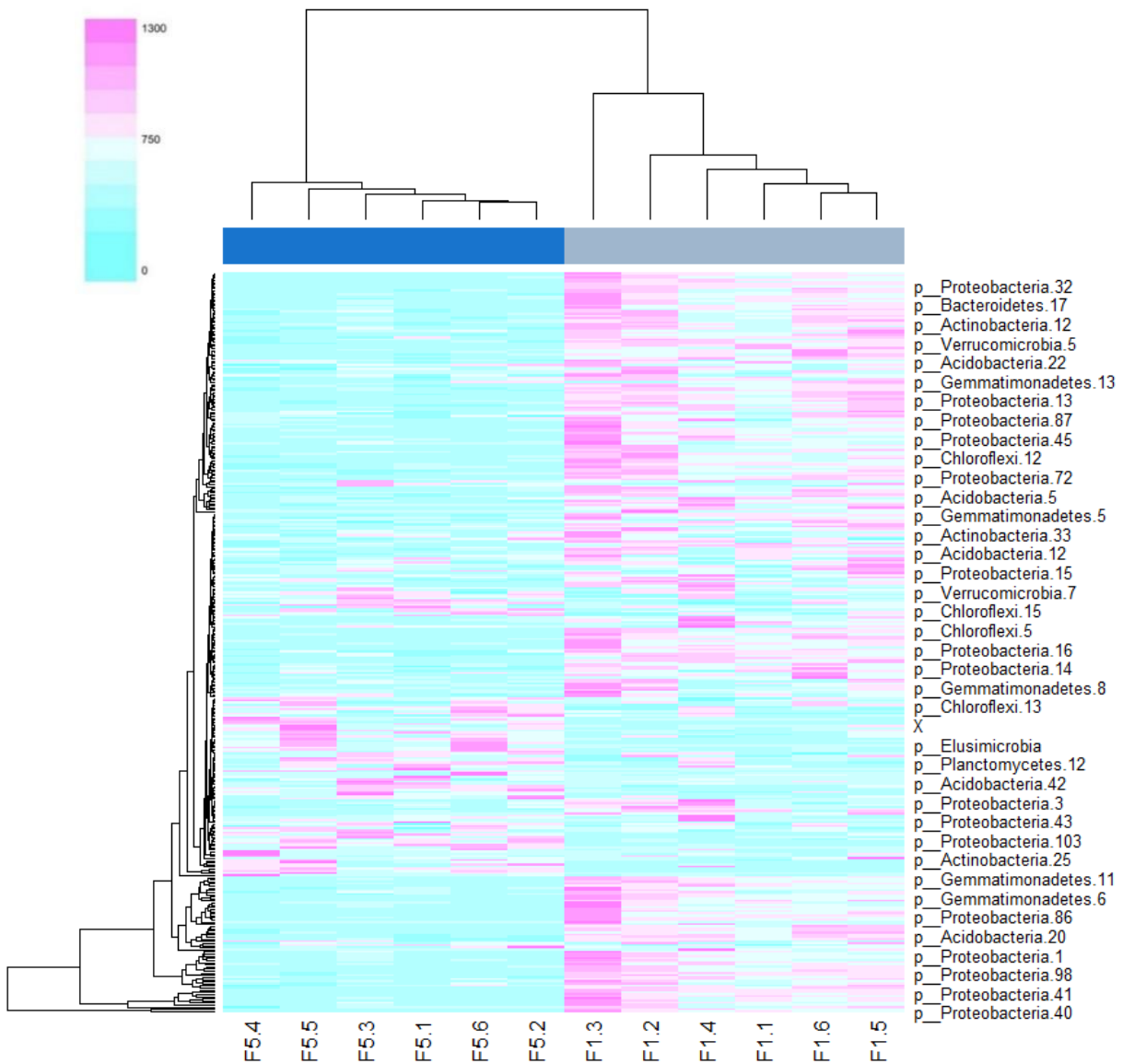


**Figura 17- Dendrograma de similaridade das amostras de rizosfera do genótipo Frontana nos ciclos 1 e 5 A. Agrupamento de acordo com a composição da comunidade bacteriana considerando as OTUs B. Agrupamento de acordo com o índice de severidade da doença A similaridade foi calculada utilizando-se o índice de correlação de Spearman e o método UPGMA. A letra indica o fenótipo (F = Frontana), o primeiro número indica o ciclo (ciclos 1 ou 5) e o segundo número indica a repetição (de 1 a 6), por exemplo, a amostra F1.1 significa a repetição 1, do ciclo 1 do genótipo Frontana.**



A abundância observada no heatmap revelou redução significativa nas frequências relativas dos filos bacterianos presentes na rizosfera do genótipo Frontana (resistente) do primeiro para o último ciclo, indicando que cultivos sucessivos associado a infecção do patógeno reduziu o número de OTUs diferencialmente enriquecidas no microbioma rizobacteriano dessas plantas (Figura 18). No último ciclo foram identificados OTUs diferencialmente enriquecidas, principalmente para os filos Verrumicrobia, Proteobacteria, Elusimicrobia, Acidobacteria e Planctomycetes.

**Figura 18 - Heatmap da abundância absoluta de unidades taxonômicas operacionais (OTUs) diferencialmente enriquecidas entre os ciclos 1 e 5 na rizosfera do genótipo Frontana (resistente). O diagrama de cor no canto superior esquerdo indica o nível de abundância das unidades taxonômicas operacionais (OTUs).**



#### 4.6 Análise de *network* do microbioma da rizosfera

As análises de *networks* foram feitas em nível de OTUs, o que permitiu a exploração dos padrões de co-ocorrência de microrganismos no sistema de monocultivo com incidência de *B. sorokiniana*. Para essa análise, assim como na análise de DESeq2, foram selecionados os genótipos Guamirim (suscetível) e Frontana (resistente) que apresentaram os resultados mais expressivos de ISD. As características topológicas das *networks* construídas para as comunidades microbianas da rizosfera dos genótipos resistente e suscetível exibiram diferentes padrões em todos os ciclos (Tabela 3). A distância de rede média entre todos os pares de nós (comprimento médio do caminho) no genótipo resistente teve uma pequena redução do primeiro ciclo de 5,40 para 5,02 no último ciclo de cultivo, assim como o diâmetro da *network* sofreu uma redução de 16 para 11 no decorrer dos ciclos. Para a *networks* do microbioma da rizosfera do genótipo suscetível os valores de comprimento médio do caminho e do diâmetro da rede se mantiveram constantes, sendo que finalizando os ciclos a *network* apresentava diâmetro de 13 e comprimento médio do caminho de 5,27. O valor da modularidade da rede microbiana da rizosfera do genótipo Frontana (resistente) aumentou durante o período do experimento chegando ao valor de 3,46 no quinto ciclo, para o genótipo Guamirim (suscetível) a modularidade foi menor do que para Frontana durante os ciclos de cultivo finalizando com o valor de 1,55.

As *networks* microbianas da rizosfera do genótipo Frontana (resistente) apresentaram redução no número de conexões por nó de 13,74 para 10,81, diferente do genótipo suscetível, que teve uma pequena redução no valor de número de conexões por nó. O número de comunidades foi reduzido ao longo dos ciclos para o genótipo Frontana (resistente) e um aumento desses números foi observado para o genótipo Guamirim (suscetível), que manteve *networks* com índices quase sempre constantes.

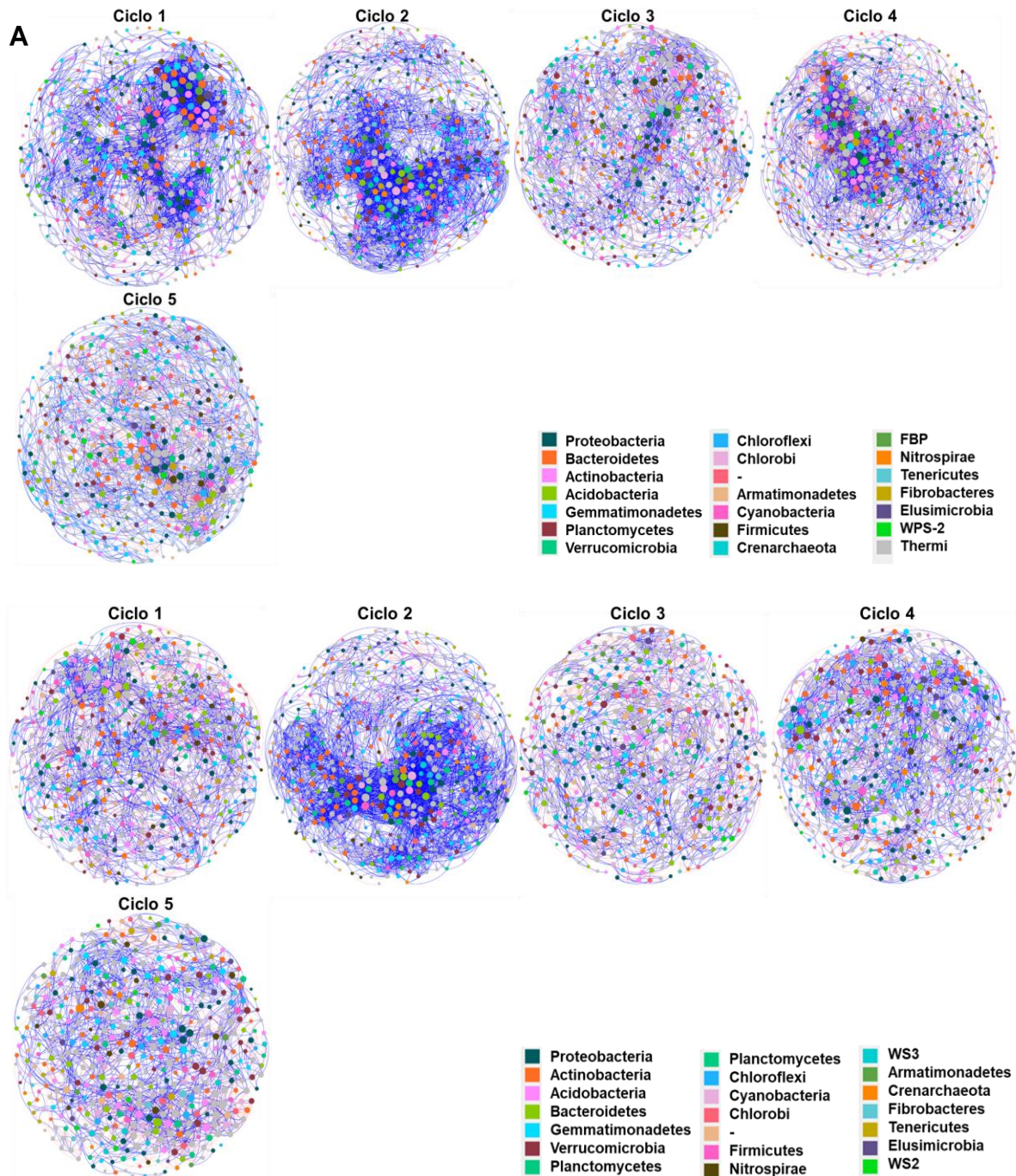
**Tabela 3 - Correlações e propriedades topológicas de *networks* da comunidade bacteriana da rizosfera de genótipos de trigo.**

<b>Genótipo</b>		<b>Frontana (resistente)</b>				
<b>Propriedades de <i>networks</i></b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	
<b>Número de nós</b>	3971	4425	3020	3875	3265	
<b>Número de arestas</b>	13746	15554	9854	13318	10818	
<b>Número de arestas positivas</b>	2887	3713	1567	1933	1556	
<b>Número de arestas negativas</b>	548	174	895	1395	1147	
<b>Modularidade</b>	0,82	0,61	1,97	2,78	3,46	
<b>Número de comunidades</b>	30	26	24	40	22	
<b>Diâmetro da rede</b>	16	14	12	14	11	
<b>Comprimento médio do caminho</b>	5,41	4,85	5,13	5,03	5,02	
<b>Conexões por nó</b>	13,74	15,55	9,84	13,31	10,81	
<b>Coefficiente de clusterização</b>	0,35	0,35	0,41	0,38	0,43	
<b>Genótipo</b>		<b>Guamirim (suscetível)</b>				
<b>Propriedades de <i>networks</i></b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	
<b>Número de nós</b>	3123	6717	2811	2996	2867	
<b>Número de arestas</b>	10334	24778	9026	9790	9246	
<b>Número de arestas positivas</b>	1690	6127	1329	1858	1555	
<b>Número de arestas negativas</b>	906	66	926	588	755	
<b>Modularidade</b>	1,70	0,55	2,78	1,06	1,55	
<b>Número de comunidades</b>	31	34	32	39	46	
<b>Diâmetro da rede</b>	12	12	11	12	13	
<b>Comprimento médio do caminho</b>	5,24	4,05	5,27	5,12	5,28	
<b>Conexões por nó</b>	10,38	24,77	9,02	9,78	9,24	
<b>Coefficiente de clusterização</b>	0,28	0,33	0,42	0,36	0,45	

Táxons microbianos (a nível de filo) com correlações positivas e negativas e estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,01$  (Software R Studio). Atributos das *networks* foram obtidas pelo programa Gephi 0.9.1

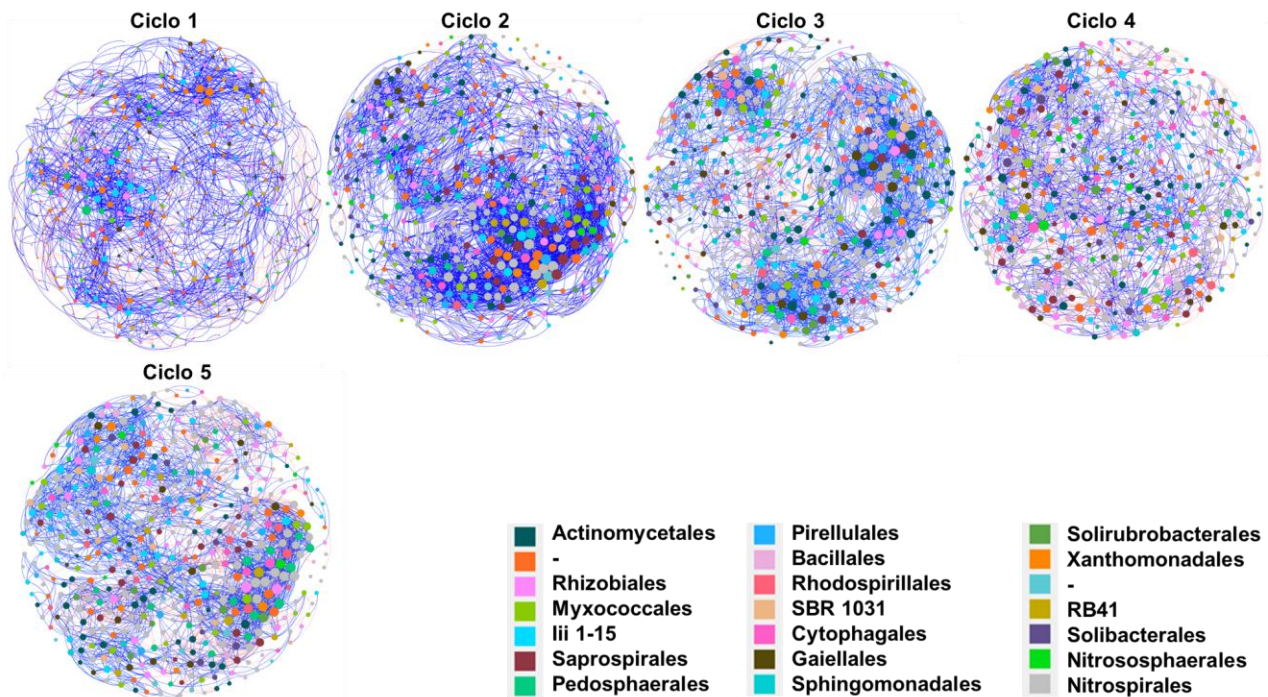
Baseado nos atributos das *networks* da comunidade microbiana foram identificados quatro filios bacterianos com mais interdependência de centralidade. Para o genótipo Frontana, OTUs pertencentes aos filios Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria e Verrumicrobia foram os nós com mais centralidade no primeiro ciclo, diferente do último ciclo onde OTUs dos filios Bacteroidetes, Firmicutes, Chloroflexi e Proteobacteria foram os nós com maior centralidade (Figura 19A). Para o genótipo Guamirim, no primeiro ciclo, foram encontrados também OTUs pertencentes aos filios Proteobacterias, Acidobacterias e Actinobacterias, diferenciando de Frontana no primeiro ciclo pela presença de OTUs do filo Bacteroidetes. No último ciclo, OTUs do filo Acidobacteria foram substituídas por OTUs do filo Armatinodales, sendo este o único filo que se diferenciou do primeiro ciclo em relação a centralidade dos nós (Figura 19B).

Figura 19 - Análise de co-ocorrência de redes de comunidades microbianas de rizosfera do genótipo de trigo A. Frontana (resistente) e B. Guamirim (suscetível) durante ciclos consecutivos de cultivo e com patógeno. Conexões somente para correlações positivas e negativas no intervalo de  $< -0,9$  (correlações negativas) a  $> 0,9$  (correlações positivas) e estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,01$ . O tamanho do nó é proporcional ao número de conexões que ele faz (grau). As cores representam os filos (com base no 16S rRNA).





**Figura 20 - Análise de co-ocorrência de redes de comunidades microbianas de rizosfera do genótipo de trigo *bulk soil* durante ciclos consecutivos de cultivo e com patógeno. Conexões somente para correlações positivas e negativas no intervalo de  $< -0,9$  (correlações negativas) a  $> 0,9$  (correlações positivas) e estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,01$ . O tamanho do nó é proporcional ao número de conexões que ele faz (grau). As cores representam os filos (com base no 16S rRNA).**

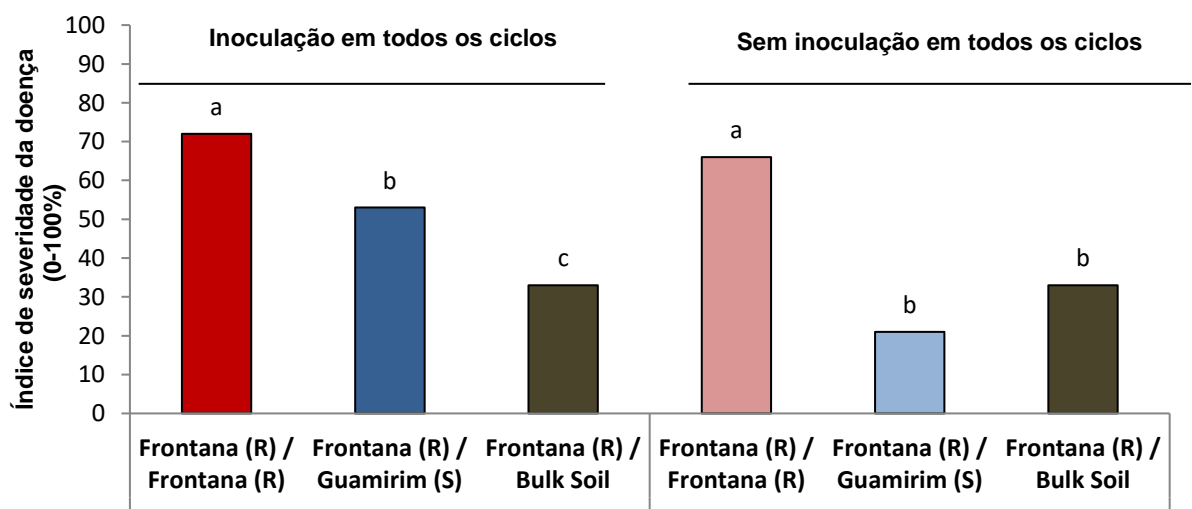


#### **4.7 Ensaio de troca de solo (prova de conceito) - índice de severidade da doença do genótipo Frontana cultivado em diferentes solos obtidos nos ensaios de ciclos**

No bioensaio em ciclos foi possível observar por meio das do progresso da doença, do enriquecimento e diversidade da comunidade bacteriana e do número de cópias de DNA do patógeno no solo uma possível indução de supressividade ao patógeno na rizosfera do genótipo Guamirim (suscetível). Desta forma, foi investigado se o microbioma pode causar efeito protetor em outra planta por meio do enriquecimento da comunidade bacteriana da rizosfera nos ciclos. Para isso, foi realizado o cultivo genótipo Frontana no solo enriquecido com seu microbioma e no seu controle (sem patógeno), no solo enriquecido com o microbioma do genótipo Guamirim e também

no seu controle (sem patógeno) e no *bulk soil* (solo não cultivado e sem inoculação). Todos os solos usados neste experimento foram originados do ensaio anterior e todos os tratamentos foram inoculados com *B. sorokinina*, até mesmo os tratamentos controles, que anteriormente foram cultivados sem a inoculação do patógeno. Os resultados deste ensaio indicaram o efeito do microbioma sobre a severidade da doença. Quando o genótipo Frontana (resistente) foi cultivado no seu próprio solo, caracterizando um sexto ciclo de cultivo, houve um aumento significativo no índice de severidade da doença nas parcelas inoculadas com *B. sorokinina* (ISD = 72%;  $p = 0,000085$ ) e também no controle inoculado somente no ensaio de troca (IDS = 66%;  $p = 0,00056$ ). Em contraste, o genótipo Frontana (resistente) cultivado no solo do genótipo Guamirim (suscetível) apresentou incidência da doença significativamente menor (ISD = 53%;  $p = 0,000085$ ), bem como para seu controle inoculado (IDS = 30%;  $p = 0,00056562$ ) se igualando estatisticamente com o tratamento Frontana (resistente) plantado no *bulk soil* onde anteriormente não havia sido feito nenhum cultivo e inoculação.

**Figura 21 - Índice de severidade da doença no genótipo Frontana (R) em solo previamente cultivado com Frontana (barra na cor vermelho escuro), Frontana (resistente) em solo previamente cultivado o genótipo Guamirim (S) (barra na cor azul escuro), Frontana (resistente) em solo não cultivado durante os ciclos bulk soil (barra na cor marrom escuro). Índice de severidade da doença nos tratamentos controle (sem patógeno durante os ciclos) no genótipo Frontana (resistente) em solo previamente cultivado com Frontana (barra na cor vermelho claro), Frontana (resistente) em solo previamente cultivado como genótipo Guamirim (suscetível) (barra na cor azul claro).**



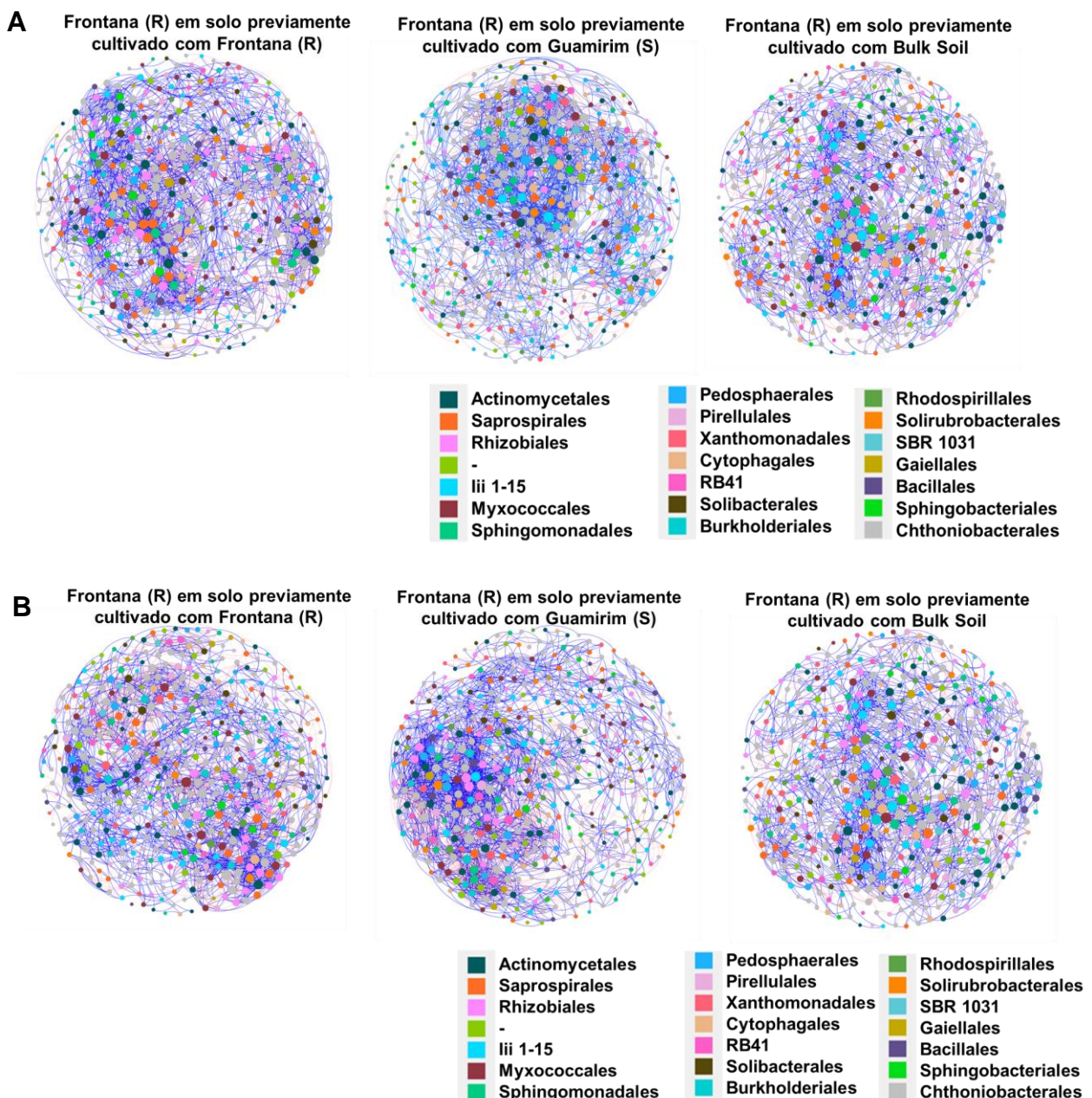
#### 4.7.1 Estrutura de *networks* do microbioma da rizosfera

Dentre os tratamentos, o Frontana (resistente) - Guamirim (suscetível) apresentou a menor modularidade e o maior número de comunidades e diâmetro de rede. No tratamento Frontana – Frontana foi observado um número mais baixo de comunidades e no Frontana – *bulk soil* o menor diâmetro de rede, números de nós e arestas e de conexões de nó. O comprimento médio do caminho foi similar para todas as amostras avaliadas neste experimento (APÊNDICE A; Tabela 6).

Para identificar os filós com mais interdependência de centralidade novamente foi usado o atributo Betweenness Centrality que revela quais são os microrganismos “chaves” dentro das *networks* avaliadas. Neste caso, onde houve a troca de solo, os filós Proteobacteria e Bacteroidetes foram os filós presentes em todos os tratamentos (Figura 22A e 22B). Na *network* de Frontana (resistente) – Frontana (resistente), as famílias com maior centralidade de nós foi Xanthomonadaceae, Flavobacteriaceae, Chitinophagaceae e Nocardiodaceae (Figura 22A). Na *network* da rizosfera de Frontana (resistente) – Guamirim (suscetível) as famílias com mais centralidade entre as forças foram Bacillaceae, SJA – 101, Rhodospirillaceae e a família Chitinophagaceae (Figura 22A).



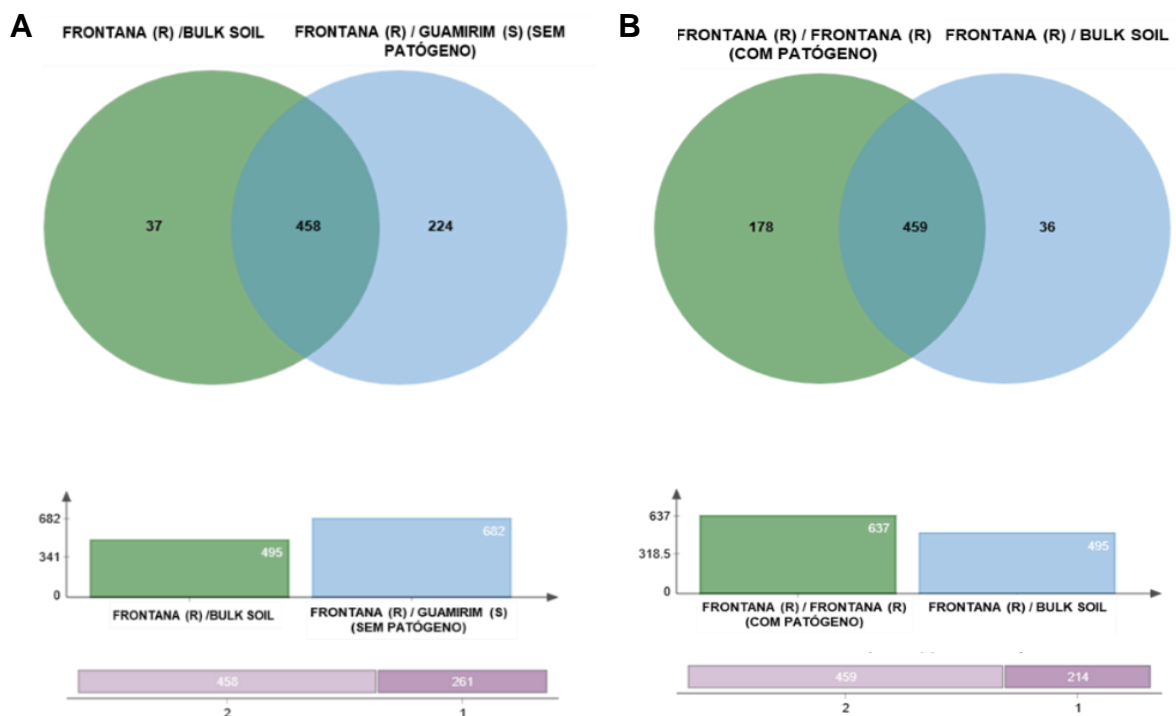
**Figura 22 - Análise de co-ocorrência de redes de comunidades microbianas de rizosfera do genótipo de trigo A. Frontana (resistente) cultivado nos solos de Guamirim (suscetível) (com patógeno), Frontana (resistente) (com patógeno) e bulk Soil (inoculado somente neste ciclo) inoculados patógeno em todos os ciclos B. Frontana (resistente) cultivado nos solos de Guamirim (suscetível) (sem patógeno), Frontana (resistente) (sem patógeno) e *bulk soil* (inoculado e cultivado somente neste ciclo) inoculados apenas neste ciclo. Conexões somente para correlações positivas e negativas estatisticamente significativa a nível de  $p < 0,01$ . O tamanho do nó é proporcional ao número de conexões que ele faz (grau). As cores representam os filos (com base no 16S rRNA).**



#### 4.7.2 Análise de metabólitos do solo

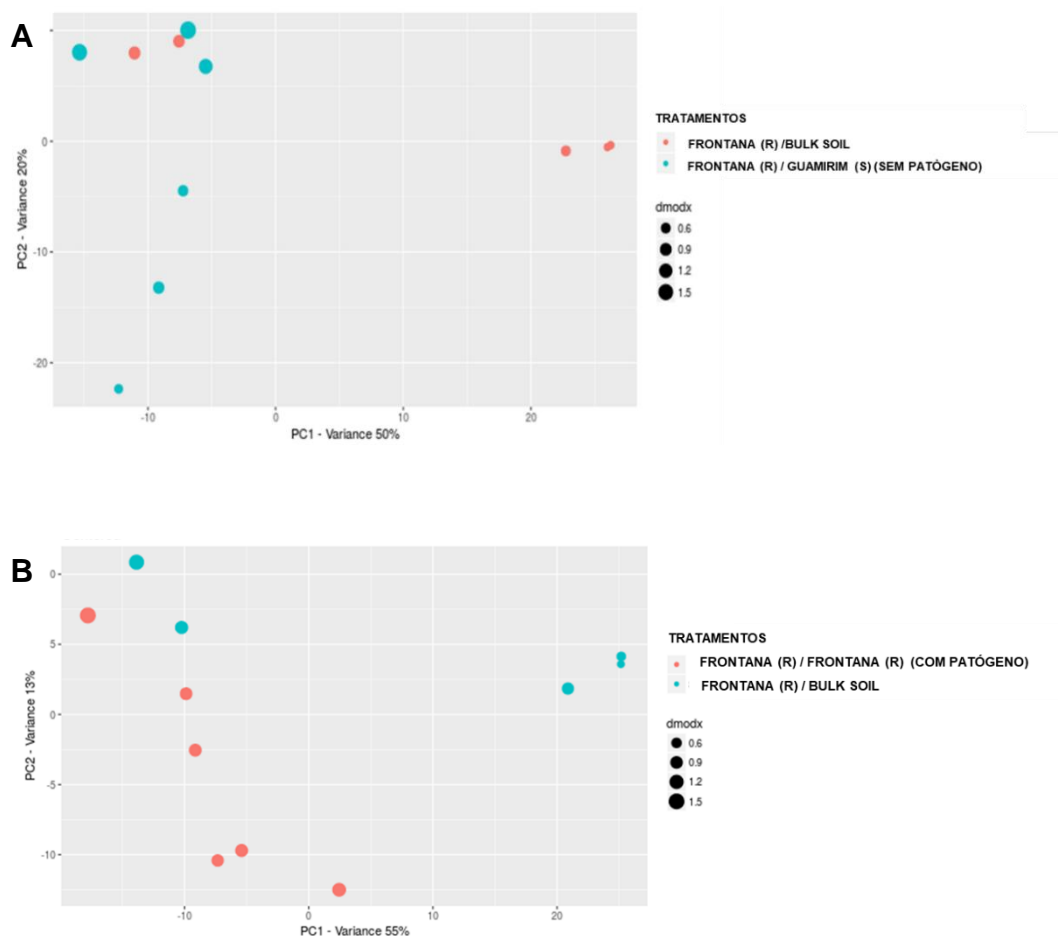
Nas análises de metabólitos, foi observado um número maior de metabólitos totais na rizosfera de plantas inoculadas com o patógeno. Esse resultado indica que em um primeiro momento, a presença do patógeno estimula a maior produção de metabólitos exclusivos (Figura 23). Quando Frontana (resistente) é cultivado no solo enriquecido com a sua própria rizosfera inoculada em todos os experimentos, o número de metabólitos exclusivos é maior do que do *bulk soil* cultivado e inoculado apenas neste ensaio, porém, menor do que no tratamento Frontana cultivado no solo enriquecido com microbioma do genótipo Guamirim (suscetível) sem inoculação do patógeno durante os ciclos (Figura 23B).

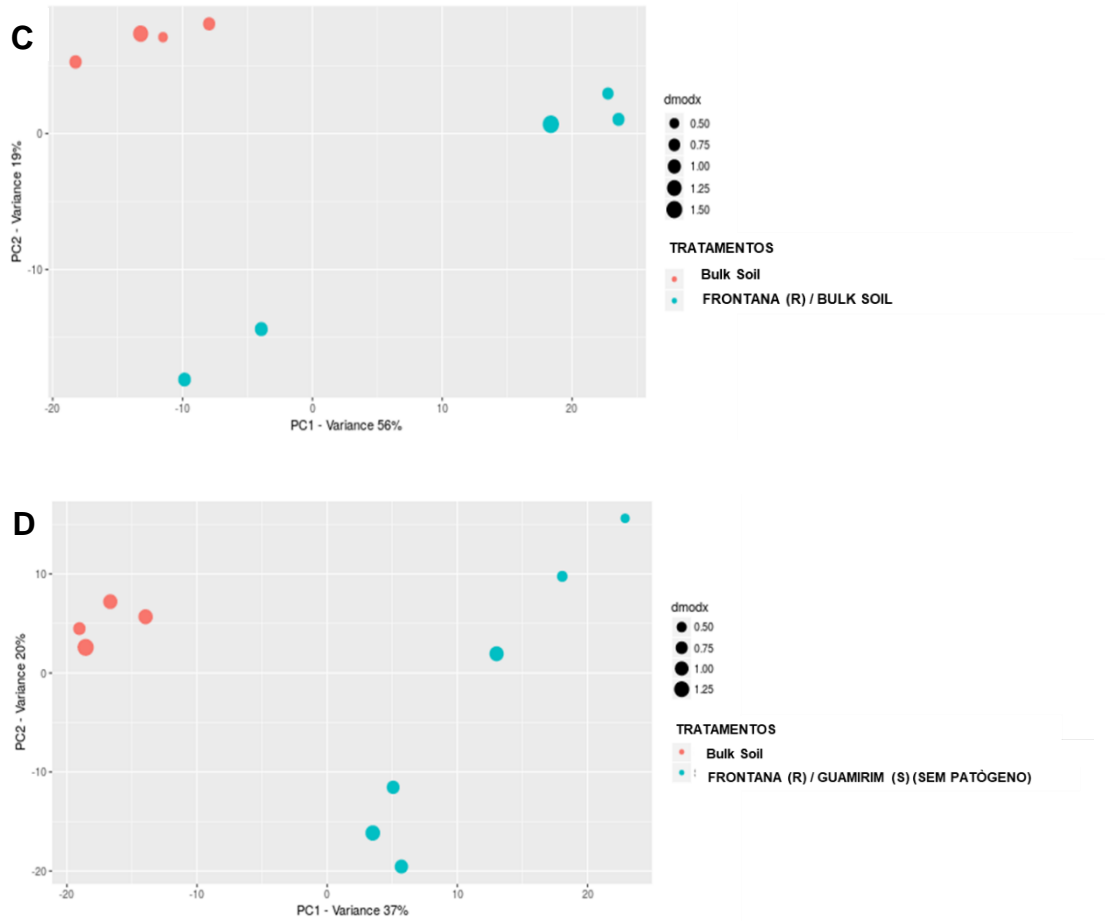
**Figura 23 - Diagrama de Venn representando graficamente os metabólitos compartilhados e exclusivos na rizosfera do trigo na parte superior das figuras e representação gráfica do número total de metabolitos observados em cada tratamento na parte inferior das figuras A. Frontana (resistente) em solo previamente cultivado o genótipo Guamirim (S) (sem patógeno), Frontana (resistente) em solo não cultivado durante os ciclos bulk soil. B. Genótipo Frontana (R) em solo previamente cultivado com Frontana (R) (com patógeno) e Frontana (resistente) em solo não cultivado durante os ciclos bulk soil.**



Do ponto de vista químico, ocorreu uma separação entre os tratamentos e o *bulk soil* nas análises de metabólitos. Os padrões gerais de metabólitos das plantas foram distintos daqueles das plantas inoculadas com o patógeno em todos os ciclos e com o *bulk soil* como demonstrado por sua separação na análise de componentes principais (Figura 25A-D).

**Figura 24 - Análise componente principal (PCA) de metabólitos totais do solo. A. Comparação entre Frontana (resistente) em solo não cultivado durante os ciclos *bulk soil* e Frontana (resistente) em solo previamente cultivado o genótipo Guamirim (S) (sem patógeno) B. Comparação entre Frontana (resistente) em solo não cultivado durante os ciclos *bulk soil* e Genótipo Frontana (R) em solo previamente cultivado com Frontana (R) (com patógeno) C. Solo não cultivado durante os ciclos *bulk soil* e Frontana (resistente) em solo não cultivado durante os ciclos *bulk soil* D. Solo não cultivado durante os ciclos *bulk soil* e Frontana (resistente) em solo previamente cultivado o genótipo Guamirim (S) (sem patógeno)**





## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Comparação da comunidade bacteriana rizosférica de genótipos de trigo resistentes e suscetíveis a *Bipolaris sorokiniana*

Vários fatores bióticos e abióticos como o estágio de desenvolvimento da planta (CHAPARRO; BADRI; VIVANCO, 2014; MICALLEF et al., 2009), as interações microbianas, o pH do solo e o teor de carbono podem moldar a diversidade bacteriana e a abundância na rizosfera (ANDREW et al., 2012; LAUBER et al., 2009; MARQUES et al., 2014; QIAO et al., 2017; WEI et al., 2015). Porém, o solo e o genótipo das plantas estão entre os principais determinantes da estrutura bacteriana da rizosfera (GRAYSTON et al., 1998; LIESACK et al., 1997; MICALLEF et al., 2009). Muitas pesquisas avaliam a diferenciação do microbioma da rizosfera entre as espécies de plantas (PEIFFER et al., 2013; ZARRAONAINDIA et al., 2015) e entre cultivares de uma mesma espécie (PÉREZ-JARAMILLO et al., 2017; WEINERT et al., 2011). Para plantas de trigo, por exemplo, por meio de isolamento direto foi observado uma variação significativa entre gêneros bacterianos associados à rizosfera de genótipos s e ancestrais (GERMIDA; SICILIANO, 2001). Nesta mesma linha de raciocínio utilizando técnicas independentes de cultivo, foi possível observar recrutamento diferencial de microrganismos entre materiais crioulos e domesticados de trigo principalmente em solo agrícola (ROSSMANN et al., 2020). No presente trabalho, assim como na literatura, a composição bacteriana rizosférica, observada por meio de sequenciamento genético do gene 16S rRNA, apresentou diferença entre os genótipos de trigo em relação a estruturação da comunidade de bactérias na rizosfera (Figura 4A). Quando essas plantas foram infectadas com o patógeno *B. sorokiniana*, foi possível observar que a reestruturação da comunidade bacteriana na rizosfera resultou separação de grupos dos genótipos resistentes e suscetíveis (Figura 4B). As plantas crioulas se reuniram entre as mais suscetíveis ao patógenos. Porém, o maior e o menor índice de severidade da doença foram observados para cultivares domesticadas (Figura 3A). Investigando a correlação entre a estrutura bacteriana e o índice de severidade da doença ficou constatado que no nível de filo ocorreu maior abundância de táxons bacterianos no genótipo resistente, composto em grande parte

por Acidobacteria. Recentemente, em pesquisa realizada com diferentes cultivares de feijão, a abundância de rizobactérias foi correlacionada positivamente com a resistência a *Fusarium oxysporum* (MENDES et al., 2017). Investigações como estas fornecem evidências de que a comunidade da rizosfera pode ter sido selecionada de acordo com o nível de resistência a doenças (KWAK et al., 2018; MENDES et al., 2017). As comunidades bacterianas de plantas resistentes e suscetíveis tem um estruturação diferencial e isso pode ter papel crucial no processo de defesa contra patógenos do solo (KWAK et al., 2018; MENDES et al., 2011; PÉREZ-JARAMILLO et al., 2017), os resultados obtidos neste ensaio reafirmam a ideia já proposta em outro estudo de que o melhoramento de plantas, inadvertidamente, pode ter modificado a composição do microbioma da rizosfera. Em consequência, impactou a frequência da comunidade microbiana e influenciou as características benéficas para o desenvolvimento das plantas ou na proteção contra o patógeno (MENDES et al., 2017). As observações do presente estudo oferecerem progresso em direção a seleção de genótipos que melhoram seletivamente a comunidade microbiana benéfica no solo.

## **5.2 Indução de supressividade com sucessivos ciclos de cultivo de genótipos de trigo resistentes e susceptíveis a *Bipolaris sorokiniana***

As plantas co-evoluíram com microrganismos do solo como forma de lidar com estresse biótico e abiótico (LEMANCEAU et al., 2017a). Compreender o microbioma da rizosfera é promissor para a promoção de uma agricultura mais sustentável, principalmente pelo potencial natural das plantas em recrutar microrganismos benéficos que atuam direta e indiretamente contra patógenos (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012; MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013). Para investigar o efeito das interações dos microbianas na proteção dos genótipos avaliados neste estudo, primeiramente foi feita a análise de progressão da doença nas plantas de trigo resistentes e suscetíveis em monocultivo. Nas plantas do genótipo resistente (Frontana) foi contabilizado inicialmente um nível menor de danos causado pelo fungo (Figura 8A). O aumento da porcentagem de doença a partir do terceiro ciclo sinalizou a capacidade do patógeno em superar a resistência da planta no sistema de monocultivo (Figura 8A). A cultivar Frontana é fonte de resistência à giberela na espiga e apresenta resistência Tipo I, definida como resistência à infecção inicial (SINGH,

1995). Esses genótipos de trigo podem não apresentar mecanismos funcionais que afete o progresso da doença (DEUNER et al., 2015). É possível que o atraso no estabelecimento inicial da infecção nesse genótipo causou uma desaceleração na evolução da doença nas plantas resistentes em relação às plantas suscetíveis, porém, após alguns ciclos a progressão da doença avançou de forma análoga a do genótipo Guamirim nos primeiros ciclos.

Em contrapartida, no solo do genótipo Guamirim em um primeiro momento, o fungo *B. sorokinina* se estabeleceu, aumentou o número de cópias de seu DNA e causou um surto da doença por um determinado período e declinou posteriormente no ciclo 3 (Figura 8B). Esses resultados indicam características correspondente a de um solo supressivo a fitopatógenos. Nos solos supressivos o desenvolvimento de doenças é suprimido, mesmo na presença do patógeno virulento e do hospedeiro suscetível (BAKER; COOK, 1974). Para alguns patógenos fúngicos, a supressão específica da doença é tipicamente induzida no campo durante o cultivo contínuo da planta hospedeira suscetível, seguida por um surto da doença (POSTMA; SCHEPER; SCHILDER, 2010; RAAIJMAKERS; MAZZOLA, 2016), além de ser de origem microbiana (CHA et al., 2016; CHAPELLE et al., 2016; WELLER et al., 2002). Portanto, avaliar as mudanças temporais associadas ao microbioma é importante para verificar sua relação com a redução da doença, o que também poderá se tornar uma estratégia útil para identificação de microrganismos envolvidos na supressão (JAMES; BECKER, 2007)

### **5.2.1 Dinâmica da comunidade de rizobactérias em genótipos de trigo resistentes e suscetíveis na presença de *Bipolaris sorokiniana***

A estabilidade dos sistemas ecológicos e de suas comunidades é impactada por distúrbios ou perturbações que atuam localmente e influenciam na estabilidade e diversidade das comunidades biológicas (PIANKA, 1982). Comunidades de organismos que apresentam diferenças em suas características tem uma possibilidade maior de ser composto por alguma organismo que consegue sobreviver em ecossistemas diversos sob alguma perturbação ambiental (MCNAUGHTON, 1977; PIMM, 1984), ou seja, a biodiversidade propicia resistência à perturbação (TILMAN; DOWNING, 1994)

Neste estudo, a diversidade da comunidade bacteriana na rizosfera dos genótipos aumentou em relação ao solo não cultivado (*bulk soil*) (Tabela 2). Por outro lado, diferente dos outros tratamentos e em um número considerável de ciclos, o genótipo Karakilcik seguiu a tendência de menor diversidade observada para o *bulk soil* (Tabela 2). Esse comportamento também foi observado em comparação feita entre essa planta crioula com seu respectivo controle (sem patógeno). Neste caso, a diversidade da comunidade rizobacteriana onde ocorreu inoculação com o patógeno permanece menor até o terceiro ciclo. Os resultados sugerem que na planta crioula, o patógeno tem impacto substancial na diversidade microbiana, não sendo capaz de restabelecer seu microbioma tão prontamente quanto nas outras plantas. Isso indica que essas plantas não são tão eficientes no recrutamento do microbioma da rizosfera como os genótipos domesticados. Sistemas que receberam perturbações intermediárias periodicamente tendem a apresentar uma diversidade mais alta do que ecossistemas estáveis. As espécies dominantes e oportunistas reduzem a abundância e o número de indivíduos de cada espécie, isso leva a uma equitabilidade, gerando uma comunidade mais diversa (HUSTON, 1979; JOSEPH H. CONNELL, 1978). Connell et al. (1978) propõe que em ambientes “equilibrados” ou submetidos à perturbações muito fortes, a diversidade pode se tornar baixa em consequência à persistência de competidores superiores ou espécies colonizadoras ágeis.

Neste trabalho, usando a análise de beta diversidade foi possível visualizar uma separação clara na estrutura da comunidade microbiana da rizosfera nos primeiros ciclos (Figura 11). Além disso, uma fração significativa da estruturação da comunidade rizobacteriana pode ser atribuída aos genótipos e aos ciclos de cultivo. As diferenças na composição do microbioma rizobacteriano associados a plantas resistentes e suscetíveis persistiram durante todos os ciclos de cultivo (Figura 12). Existem evidências que os exsudatos radiculares afetam seletivamente os táxons bacterianos (SHI et al., 2011), inibindo ou estimulando seletivamente algumas espécies bacterianas e fúngicas (LI et al., 2014). É possível que as diferenças em relação à composição química dos exsudatos radiculares dos genótipos de trigo possam ter contribuído para a estruturação diferenciada da microbiota, bem como, as plantas podem ter moldado o microbioma da rizosfera para recrutar microrganismos específicos contra o patógeno (MENDES et al., 2017, 2011).



Outro fator que pode ter influenciado o recrutamento diferenciado das rizobactérias foi o sistema de cultivo sucessivo. Os microrganismos são sensíveis ao monocultivo, por isso ele é um fator que impacta a composição das comunidades microbianas no solo, incluindo a comunidade microbiana da rizosfera (BRESOLIN et al., 2010; GÓMEZ EXPÓSITO, 2017; LUA; ZHANGA; CHENA, 2017). Neste sistema, a microbiota do solo é continuamente exposta às raízes das plantas hospedeiras que naturalmente recrutam grupos microbianos especiais para proteção contra patógenos habitantes do solo (COOK, 2006). Diferentes combinações de abundância de espécies podem resultar da soma entre fatores ambientais e o limite de tolerância das espécies (GLEASON, 1926). Neste estudo, em uma visualização geral, foi identificado em todos os genótipos no decorrer dos ciclos a redução do nível de abundância na rizosfera do filo Proteobacteria e o aumento para os filoss Acidobacteria, Chloroflexi e Firmicutes (Figura 10). Em outro estudo com trigo em monocultivo, esses mesmos táxons, juntamente com outros, foram prevalentes na fase de supressão, bem como grupos de proteobactérias foram reduzidos neste mesmo estágio (SANGUIN et al., 2009).

Para os genótipos contrastantes Frontana (resistente) e Guamirim (suscetível), o número de táxons diferencialmente enriquecidos identificados após cinco ciclos de cultivo foi reduzido na rizosfera dos dois cultivares (Figuras 14 e 15). Porém, foi identificado maior enriquecimento de táxons bacterianos na rizosfera das plantas suscetíveis (Guamirim), bem como foram encontradas mais OTUs exclusivas em sua rizosfera (Figura 15). Os filoss Acidobacteria e Proteobacteria representaram o maior número de OTUs enriquecidas na rizosfera deste genótipo. Membros destes filoss estão entre as bactérias mais abundantes no solo (EICHORST; KUSKE; SCHMIDT, 2011). É provável que exista uma interação ecológica entre Acidobacteria e Proteobacteria, já que elas frequentemente são observadas intimamente associadas entre si no ambiente, bem como podem influenciar na posição um do outro na comunidade (KIELAK et al., 2016). A maior parte das classes exclusivas foram pertencentes a Acidobacteria. Poucas informações sobre as atividades e ecologia estão disponíveis para este filo, o que pode ser atribuída a dificuldade no cultivo e à baixa disponibilidade em coleções de culturas bacterianas (EICHORST; KUSKE; SCHMIDT, 2011; LEE; KA; CHO, 2008). Apesar disso, membros do filo Acidobacteria podem estar envolvidos com a supressão de doença (LIU et al., 2016) e sua

diversidade nas características metabólicas, tornam este filo potencialmente importante na ciclagem de nutrientes do solo (KIELAK et al., 2016; WARD et al., 2009). Não houve efeito da doença no enriquecimento diferencial de táxons na rizosfera do genótipo Guamirim, sugerindo que essas plantas podem apresentar uma estrutura rizobacteriana mais estável às perturbações causadas por patógenos habitantes do solo. Em contraste, o enriquecimento diferencial de OTUs na rizosfera do Frontana (resistente) foi correlacionado positivamente com a doença, reduzindo drasticamente as frequências relativas de cada filo neste solo no último ciclo. Estudos sugerem que as perdas de biodiversidade podem gerar uma possível degradação da resistência contra a invasão (KENNEDY et al., 2002).

Esses resultados são consistentes com a ideia de que eventos associados a surto da doença podem levar a um acúmulo de microrganismos que causam um declínio do patógeno (JAMES; BECKER, 2007). Neste trabalho, os resultados indicam que a soma das variáveis estudadas causou impacto sobre os táxons microbianos dominantes. O enriquecimento de táxons bacterianos pode ter causado impacto positivo direto na resistência à invasão da comunidade da rizosfera, como observado em outro trabalho (WEI et al., 2015). Além disso, a pressão de cultivo exercida no solo, acompanhado da presença de um patógeno, é um fator importante que leva a alteração significativa na população de microrganismos na rizosfera, como relatado em estudos com beterraba sacarina sob o ataque de *R. solani* e no trigo na presença do fungo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* causador do mal do pé do trigo (GÓMEZ EXPÓSITO, 2017; SCHREINER et al., 2010). Os resultados indicam s rizobactérias influenciam o processo de defesa das plantas. Além disso, o sistema de manejo e o genótipo da planta tem influência significativa na composição desses microbiomas. Nesta perspectiva, trabalhos como este são importantes para definição de estratégias de cultivo e manejo que possam elevar o nível de interações benéficas entre as plantas e os microrganismos.

Esses resultados evidenciam que é preciso incentivar o uso de novas abordagens para manejar doenças de plantas no campo, com enfoque em uma visão mais ampla do controle de doenças a partir do gerenciamento da composição do microbioma com um todo e não somente considerando o fitopatógeno (KWAK et al., 2018; WEI et al., 2019). Para isso, é necessário compreender como os microrganismos interagem com seus hospedeiros e entre si em ambientes naturais para que ocorra a implementação

eficiente da proteção de doenças mediada pelo microbioma (VANNIER; AGLER; HACQUARD, 2019)

### **5.2.2 Padrões de co-ocorrência do microbioma da rizosfera de trigos resistentes e suscetíveis a *B. sorokiniana* em sistema de monocultivo**

O ecossistema microbiano existe como uma rede dinâmica de interações entre microrganismos que gera uma complexa rede de metabolismos interconectados (FAUST; RAES, 2012). A co-ocorrência dentro das redes de interações pode ter uma influência positiva, negativa ou ser neutra sobre as espécies envolvidas. Quando o patógeno consegue ultrapassar a barreira de defesa, ele pode invadir a rede microbiana e afetar de forma negativa o desenvolvimento da planta (VAN DER HEIJDEN; HARTMANN, 2016). Assim, a identificação dos atributos da comunidade subjacente que interage com a alta diversidade de espécies no solo pode explicar a resistência da comunidade bacteriana às invasões de patógenos (WEI et al., 2015).

Nesse trabalho, a visualização da estrutura da comunidade da rizosfera, por meio da análise de *network*, permitiu observar em sistemas onde há a presença do patógeno por meio de inoculação a comunidade bacteriana se torna mais complexa, modular e com maior número de conexões (Figura 19A e B). Alguns autores consideram que a modularidade pode ter ação de conter o impacto das perturbações dentro de compartimentos (KOKKORIS et al., 2010) e que a alta conectividade dentro das comunidades de rizosfera pode diminuir o sucesso da invasão de patógenos quando a competição por recursos for eficiente (CASE, 1990; KENNEDY et al., 2002; VAN ELSAS et al., 2012). O aumento na complexidade da *network* do genótipo resistente (Frontana) foi ainda maior em relação ao genótipo suscetível (Guamirim) como já observado em outro estudo com feijão resistente e suscetível ao patógeno *Fusarium oxysporum* (MENDES et al., 2017). No genótipo resistente (Frontana) foi observado que o número de interações positivas reduziu no decorrer dos ciclos enquanto as relações negativas aumentaram até o momento em que o número de interações positivas e negativas praticamente se igualaram (Tabela 3). Para o genótipo suscetível (Guamirim) os números de interações positivas sempre foram maiores que das negativas. As interações positivas podem ocorrer devido à produção de moléculas usadas pelo próprio microrganismo e outros microrganismos do

ambiente, co-colonização, sobreposição de nicho ou outras razões, enquanto a negativa pode resultar de amensalismo, interação presa-predador, competição dentre outros (FAUST; RAES, 2012). Apesar do genótipo resistente (Frontana) apresentar uma rede mais conectada (Tabela 3), foi observado que o patógeno ainda obteve sucesso na invasão. Neste caso, a alta conectividade pode ter favorecido a invasão de patógenos por meio da competição intensa por recursos entre membros das próprias comunidades benéficas da rizosfera do que entre elas e os patógeno invasor (WEI et al., 2015). Para reduzir o sucesso da invasão do patógeno, a alta conectividade dentro das comunidades da rizosfera deve gerar um consumo geralmente mais eficiente de recursos e, conseqüentemente, a um aumento da concorrência (CASE, 1990; KENNEDY et al., 2002; VAN ELSAS et al., 2012).

Potencialmente existem espécies chave que desempenham um papel fundamental dentro destas redes microbianas, pois podem interagir com muitos outros táxons microbianos, além de ter um efeito regulador sobre seu ambiente e outros membros da comunidade (VAN DER HEIJDEN; HARTMANN, 2016). Com os dados dos atributos topológicos, é possível identificar quais as espécies que possuem posições topológicas importantes na *network* (TOJU et al., 2018). A centralidade da rede, atributo que permite acessar esses táxons, identificou para Frontana (resistente) famílias importantes no controle de patógenos habitantes do solo como *Streptomyceae* e *Bacillaceae* (Figura 19A). Para o genótipo Guamirim o destaque foi para família *Bradyrhizobiaceae* (Figura 19B), composta por importantes microrganismos fixadores de nitrogênio (SOUZA et al., 2014) e para as *Pseudonocardiaceae* onde são microrganismos conhecidos por serem importantes produtores de antibióticos (LAZZARINI et al., 2000). Interações antagônicas entre microrganismos podem produzir compostos químicos como antibióticos que podem afetar a biota no solo, incluindo patógenos (GARBEVA et al., 2011; VAN DER VOORT et al., 2016). As bactérias podem inibir e impedir a invasão em seus nichos por meio de competição por interferência, liberando toxinas ou antibióticos, que criam zonas inóspitas para os concorrentes (STUBBENDIECK; STRAIGHT, 2016). Neste caso, se o invasor for particularmente sensível às toxinas produzidas pela comunidade

residente, espera-se interferência no processo de competição mediada por antibióticos que restrinjam as invasões (THORPE et al., 2009).

Em uma visualização geral, a análise de *network* fornece caracterização de táxons com associações diretas importantes na supressão de doenças ou expressão de resistência de hospedeiros vegetais (POUDEL et al., 2016). Sumarizando, os resultados de *network* deste estudo indicaram que sob pressão de cultivo e na presença do patógeno, ocorreu uma maior reestruturação da rede da comunidade bacteriana rizosférica no genótipo resistente, tornando a sua rede mais complexa (Tabela 3). Para o genótipo suscetível Guamirim foi possível observar menores oscilações nos valores dos atributos topológicos, mantendo sua rede estável com poucas alterações, sugerindo que a comunidade bacteriana neste genótipo pode estar mais adaptada a perturbações ambientais. Os efeitos das interações sobre a estabilidade da rede microbiana têm potencial de elevar a resistência à invasão do patógeno (McCANN, 2000). A maior diversidade pode aumentar a funcionalidade das comunidades, por exemplo, pode gerar maior resistência às invasões, pois algumas interações tróficas estabilizam interações competitivas dominantes na comunidade (PAINE, 1984). Neste trabalho a análise de *network* forneceu informações adicionais sobre a ecologia da comunidade microbiana que não podem ser obtidas pelas abordagens analíticas tradicionais (FREILICH et al., 2010). O conjunto de dados observados nesta pesquisa poderá ser base de futuras investigações sobre possíveis aplicações ecológicas da co-ocorrência, como por exemplo, descrever a ampla gama de interações benéficas entre microrganismos.

### **5.3 Manipulação do microbioma da rizosfera de trigo para indução de supressão ao patógeno de solo *Bipolaris sorokiniana***

A supressividade pode estar relacionada a microrganismos específicos ou consórcios microbianos que inibem o crescimento e a atividade de patógenos habitantes do solo (MENDES et al., 2011; WELLER et al., 2002). Numerosas pesquisas demonstraram que a supressão específica a patógenos radiculares em solos supressivos de doenças é de origem microbiana (CHA et al., 2016; CHAPELLE et al., 2016; WELLER et al., 2002). A manipulação direta ou indireta das comunidades microbianas rizosféricas pode melhorar a saúde e a produtividade das culturas

agrícolas (BENDER; WAGG; VAN DER HEIJDEN, 2016; BERG; SMALLA, 2009; COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; SINGH; GILL; TUTEJA, 2011).

Nesta perspectiva, trabalhos recentes sugerem que a proteção das plantas poderia ser transferida para a próxima geração de plantas via transplante de solo (KWAK et al., 2018; WEI et al., 2019). Para investigar essa afirmação foi realizado um ensaio de prova de conceito com troca de solo. Foi observada a proteção das plantas pela comunidade microbiana por meio da redução da doença nas plantas do genótipo Frontana (resistente) cultivadas no solo enriquecido com o microbioma de Guamirim (suscetível), Guamirim (suscetível) controle e também no *bulk soil* (Figura 21). Estudos relataram a redução de doença por meio do cultivo de plantas em solos considerados supressivos (KWAK et al., 2018; MENDES et al 2011), revelando a ocorrência de supressão natural devido a alta abundância de diversos táxons ou grupos funcionais de microrganismos correspondentes à proteção contra doenças (CHAPELLE et al., 2016; MENDES et al. 2011). Neste estudo, a visualização da comunidade por meio da rede de co-ocorrência (*network*) indicou para o tratamento Frontana (resistente) – Frontana (resistente) a presença de bactérias fitopatogênicas (*Xanthomonadaceae*) e também famílias de grupos taxonômicos associados com a rizosfera de plantas doentes (*Flavobacteriaceae*) (Figura 22A) (YIN et al., 2013). Em contrapartida, no genótipo Frontana (resistente) – Guamirim (suscetível), principalmente famílias citadas por seu papel potencial na proteção contra patógenos habitantes do solo (*Chitinophagacea*) e famílias formadas por espécies bacterianas com diferentes funções metabólicas (*Rhodospirillaceae*) (BALDANI et al., 2014).

#### **5.4 Exsudação de metabólitos na rizosfera durante a infecção do patógeno**

A produção de metabólitos antimicrobianos tem papel importante na capacidade adaptativa dos microrganismos (BERLEMAN; KIRBY, 2009). A competição entre espécies, por exemplo, é frequentemente mediada por metabólitos bioativos sintetizados pelos organismos competidores (STUBBENDIECK; STRAIGHT, 2016). Foi observada a produção de uma maior quantidade de metabólitos exclusivos na rizosfera que no *bulk soil*, e quando comparadas as rizosferas com a inoculação do patógeno, o maior número de metabólitos foi observado no tratamento onde o patógeno foi introduzido pela primeira vez (Figura 23). Na presença do patógeno, o

aumento da diversidade do perfil de exsudatos pode ser crucial para a supressão de doenças, pois pode aumentar a produção de metabólitos antifúngicos (JOUSSET et al., 2014). Diversas pesquisas indicam que metabólitos, incluindo antibióticos, enzimas e voláteis, que são produzidos por bactérias do solo e de plantas, são essenciais na supressão de fitopatógenos vegetais (HAAS; DÉFAGO, 2005; LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009; RAAIJMAKERS; VLAMI; DE SOUZA, 2002). Evidências mostram que o perfil de exsudação das plantas é importante e também pode mudar rapidamente em resposta à infecção por patógenos e iniciar a síntese de metabólitos defensivos para suprimir os patógenos (LANOUE et al., 2010). No presente estudo, a análise de metabólitos totais foi realizada de forma preliminar com a intenção de observar a influência inicial das variáveis estudadas sobre a produção metabólica do solo. Desta forma, o próximo passo seria a identificação das substâncias encontradas na rizosfera e o seu potencial no processo de defesa contra patógenos. Os resultados metabolômicos desta pesquisa vão ao encontro com outras observações anteriores para composição da microbiota da rizosfera e padrões de co-ocorrência que indicaram a presença de famílias produtoras de antibióticos na rizosfera do genótipo Guamirim (Figura). Esses resultados reforçam a hipótese do trabalho de que genótipos de trigo suscetíveis e resistentes ao patógeno *B. sorokiniana* recrutam um microbioma distinto e que isso teria impacto no processo de defesa da planta contra patógenos.

## 6 CONCLUSÃO

A análise do microbioma da rizosfera de genótipos contrastantes de trigo revela que:

- A estruturação da comunidade bacteriana é distinta entre as plantas resistentes e suscetíveis;
- A planta resistente responde em um primeiro momento de forma mais eficiente a infecção do patógeno. Com a evolução dos ciclos de cultivo a resistência é perdida e o índice de severidade da doença aumenta;
- A longo prazo, a planta suscetível Guamirim se torna mais eficiente em relação ao combate ao patógeno permitindo a indução da supressão da doença ao longo dos ciclos;
- O efeito protetor do microbioma da rizosfera do genótipo Guamirim sobre a severidade da doença no genótipo com maior progressão da doença foi verificado; e
- O perfil de exsudação das plantas mudou em resposta à infecção causada pelo patógeno e pode estar ocorrendo a síntese de metabólitos defensivos para suprimir os patógenos.

Com a evolução do conhecimento sobre as interações entre microrganismos x plantas será possível estabelecer estratégias de gestão de comunidades microbianas que sejam supressoras de doenças por meio de:

- Seleção de plantas que recrutam e mantêm microbioma benéficos;
- Gerenciamento e projeção do microbioma para elevar a produtividade das culturas;
- Uso de marcadores moleculares das plantas no melhoramento genético; e
- Construção de novas funções por meio da manipulação da biologia sintética e o uso de probiótico para manipulação do microbioma e suas atividades de maneira preventiva.



## REFERÊNCIAS

- ABBASI, P. A.; CONN, K. L.; LAZAROVITS, G. Suppression of Rhizoctonia and Pythium damping-off of radish and cucumber seedlings by addition of fish emulsion to peat mix or soil. **Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie**, v. 26, n. 2, p. 177–187, 2004.
- ALABOUVETTE, C. Fusarium wilt suppressive soils: an example of disease-suppressive soils. **Australasian Plant Pathology**, v. 28, n. 1, p. 57, 1999.
- ANDERSON, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**, v. 26, n. 1, p. 32–46, 2001.
- ANDREW, D. R. et al. Abiotic factors shape microbial diversity in sonoran desert soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 21, p. 7527–7537, 2012.
- ANDREWS, J. H. Biological Control in the Phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v. 30, n. 1, p. 603–635, 1992.
- ARAUJO, R. et al. Decoding wheat endosphere – rhizosphere microbiomes in rhizoctonia solani – infested soils challenged by streptomyces biocontrol agents. v. 10, n. 1038, p. 1–13, 2019.
- ARMOUGOM, F.; RAOULT, D. Exploring microbial diversity using 16S rRNA High-throughput methods. **Journal of Computer Science & Systems Biology**, v. 02, n. 01, p. 074–092, 2009.
- ARONESTY, E. ea-utils : Command-line tools for processing biological sequencing data. **Expression Analysis, Durham**, p. 2, 2011.
- ARSENEAULT, T.; GOYER, C.; FILION, M. *Pseudomonas fluorescens* LBUM223 Increases Potato Yield and Reduces Common Scab Symptoms in the Field. **Phytopathology**, v. 105, n. 10, p. 1311–1317, 2015.
- BADRI, D. V et al. Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of *Arabidopsis* to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 7, p. 4502–4512, 2013.
- BAIS, H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 233–266, jun. 2006.
- BAKER, K.; COOK, R. J. Biological control of plant pathogens. **San Francisco: W.H. Freeman and Company**, p. 433, 1974.
- BAKKER, M. G. et al. Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. **Plant and Soil**, v. 360, n. 1–2, p. 1–13, 2012.
- BALDANI, I. et al. The family *Rhodospirillaceae*. In: ROSENBERG, E. et al. (Eds.). . **The Prokaryotes**. Springer, 2014. p. 533–618.
- BASTIAN, M.; HEYMANN, S.; JACOMY, M. Gephi: An Open Source Software for

Exploring and Manipulating Networks. **Third International AAAI Conference on Weblogs and Social Media**, p. 361–362, 2009.

BATEMAN, G. L. The contribution of ground-level inoculum of *Fusarium culmorum* to ear blight of winter wheat. **Plant Pathology**, v. 54, n. 3, p. 299–307, 2005.

BENDER, S. F.; WAGG, C.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. An underground revolution: Biodiversity and soil ecological engineering for agricultural sustainability. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 31, n. 6, p. 440–452, 2016.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Benjamini-1995 **Journal of the Royal Statistical Society B**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.

BERENDSEN, R. L. et al. Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium. **ISME Journal**, v. 12, n. 6, p. 1496–1507, 2018.

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. et al. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. v. 68, n. 7, p. 3328–3338, 2002.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 11–18, 2009.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, n. 1, p. 1–13, 2009.

BERLEMAN, J. E.; KIRBY, J. R. Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 5, p. 942–957, 2009.

BETTIOL, W. et al. Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 2009.p. 183–205.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. In: MICHEREFF, F.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.). **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco., 2005. p. 125–152.

BLOEMBERG, G. V; LUGTENBERG, B. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current opinion in plant biology**, v. 4, n. 4, p. 343–50, 2001.

BÖHM, H. et al. Immune receptor complexes at the plant cell surface. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 20, p. 47–54, 2014.

BONANOMI, G. et al. Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. **Journal of Plant Pathology**, v. 89, n. 3, p. 311–324, 2007.

- BOUFFAUD, M. L. et al. Root microbiome relates to plant host evolution in maize and other Poaceae. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 2804–2814, 2014.
- BOUWMAN, A. F.; BEUSEN, A. H. W.; BILLEN, G. Human alteration of the global nitrogen and phosphorus soil balances for the period 1970-2050. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 23, p. 1–16, 2009.
- BRESOLIN, J. D. et al. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 391–403, 2010.
- BRUEHL, G. W. **Soilborne plant pathogens**. Macmillan Publishing Company, 1987.
- BULGARELLI, D. et al. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 807–838, 2013.
- BULGARELLI, D. et al. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. p. 392–403, 2015a.
- BULGARELLI, D. et al. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. **Cell Host and Microbe**, v. 17, n. 3, p. 392–403, 2015b.
- CALVO, P. et al. Effect of microbial-based inoculants on nutrient concentrations and early root morphology of corn (*Zea mays*). **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 180, n. 5, p. 56–70, 2017.
- CAO, Y. et al. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots. **Biology and Fertility of Soils**, v. 47, n. 5, p. 495–506, 2011.
- CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335–6, 2010.
- CARRIÓN, V. J. et al. Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. **Science**, v. 366, p. 606–612, 2019.
- CASE, T. J. Invasion resistance arises in strongly interacting species-rich model competition communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 24, p. 9610–4, 1990.
- CHA, J. et al. Microbial and biochemical basis of a *Fusarium* wilt-suppressive soil. v. 10, p. 119–129, 2016.
- CHANDRASHEKARA, C. et al. Suppressive Soils in Plant Disease Management. In: SINGH, V. K.; SINGH, Y.; SINGH, A. (Eds.). **Eco-friendly Innovative Approaches in Plant Disease Management**. International Book Distributors, 2012. p. 241–256.
- CHAPARRO, J. M. et al. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 5, p. 489–499, 2012.
- CHAPARRO, J. M.; BADRI, D. V.; VIVANCO, J. M. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. **The ISME Journal**, v. 8, n. 4, p. 790–803, 2014.
- CHAPELLE, E. et al. Fungal invasion of the rhizosphere microbiome. **ISME Journal**,

v. 10, n. 1, p. 265–268, 2016.

COMPANT, S. et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951–4959, 2005.

COMPANT, S. et al. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of advanced research**, v. 19, p. 29–37, 2019.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669–678, 2010.

COOK, R. J. Toward cropping systems that enhance productivity and sustainability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 49, p. 18389–94, 2006.

COYTE, K. Z.; SCHLUTER, J.; FOSTER, K. R. The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. **Science**, v. 350, n. 6261, p. 663–666, 2015.

CROTEAU, G. .; ZIBILSKE, L. . Influence of papermill processing residuals on saprophytic growth and disease caused by *Rhizoctonia solani*. **Applied Soil Ecology**, v. 10, n. 1–2, p. 103–115, 1998.

CSARDI G, N. T. The igraph software package for complex network research. **InterJournal**, v. Complex Sy, p. 1695, 2006.

CUNHA, G.R.; BACALTCHUK, B.; BISOTTO, V. Trigo, 500 Anos no Brasil. **Embrapa**, 1999.

DEUNER, C. C. et al. Resistência de cultivares de trigo à giberela mediante inoculação artificial em espiguetas. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 3, p. 202–206, 2015.

DINI-ANDREOTE, F. et al. Dynamics of bacterial community succession in a salt marsh chronosequence: evidences for temporal niche partitioning. **The ISME Journal**, v. 8, n. 10, p. 1989–2001, 2014.

DIXON, P. VEGAN, A package of R functions for community ecology. **Journal of Vegetation Science**, v. 14, n. 6, p. 927–930, 2013.

DO AMARAL, F. P. et al. Differential growth responses of *Brachypodium distachyon* genotypes to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 689–697, 2016.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of *Diazotrophs* in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107–149, 2003.

DOORNBOS, R. F.; LOON, L. C. VAN. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere . A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n. 1, p. 227–243, 2012.

- DUFFY, B. K.; SIMON, A.; WELLER, D. M. Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent *pseudomonads* for control of take-all on wheat. **Phytopathology**, v. 86, n. 2, p. 188–194, 1996.
- EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.
- EICHORST, S. A.; KUSKE, C. R.; SCHMIDT, T. M. Influence of plant polymers on the distribution and cultivation of bacteria in the phylum Acidobacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 2, p. 586–96, 2011.
- EL-HASSAN, S. A.; GOWEN, S. R. Formulation and delivery of the bacterial antagonist *Bacillus subtilis* for management of lentil vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. **Journal of Phytopathology**, v. 154, n. 3, p. 148–155, 2006.
- ELAD, Y. et al. The biochar effect: plant resistance to biotic stresses. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 50, n. 3, p. 335–349, 2012.
- EMMERT, E. A. .; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v. 171, n. 1, p. 1–9, 1999.
- FARRAR, K.; BRYANT, D.; COPE-SELBY, N. Understanding and engineering beneficial plant-microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 9, p. 1193–1206, 2014.
- FAUST, K.; RAES, J. Microbial interactions: From networks to models. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 538–550, 2012.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes: An R Package for ANOVA and Experimental DesignsR package version 1.1.2**, 2013.
- FIGUEROA, M.; HAMMOND-KOSACK, K. E.; SOLOMON, P. S. A review of plant diseases—a field perspective. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, p. 1523–1536, 2017.
- FINKEL, O. M. et al. Understanding and exploiting plant beneficial microbes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 38, p. 155–163, 2017.
- FOSTER, R. C. The Ultrastructure of the Rhizoplane and Rhizosphere. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 211–234, 1986.
- FREILICH, S. et al. The large-scale organization of the bacterial network of ecological co-occurrence interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 12, p. 3857–3868, 2010.
- GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high toxicity in soil. **Science**, v. 309, n. 5739, p. 1387–1390, 2005.
- GARBEVA, P. et al. Fungistasis and general soil biostasis – A new synthesis. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 3, p. 469–477, 2011.
- GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease

suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, n. 1, p. 243–270, 2004.

GERMIDA, J.; SICILIANO, S. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, n. 5, p. 410–415, 2001.

GHANY, T.M. Fungal leaf spot of maize: pathogen isolation, identification and host biochemical characterization, **Mycopath**, v.10, p. 41–49, 2013.

GLEASON, H. A. The individualistic concept of the plant association. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 53, n. 1, p. 7–26, 1926.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria : Mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012.

GOMES, N. C. M. et al. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize ( *Zea mays* ) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, v. 232, p. 167–180, 2001.

GÓMEZ EXPÓSITO, R. **Microbiome dynamics of disease suppressive soils**. Wageningen Universit, 2017.

GOPAL, M.; GUPTA, A. Microbiome selection could spur next-generation plant breeding strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1971, 2016.

GRAYSTON, S. J. et al. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 369–378, 1998.

GRUNERT, O. et al. Tomato plants rather than fertilizers drive microbial community structure in horticultural growing media. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent pseudomonads*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 307–319, 2005.

HACQUARD, S. et al. Interplay between innate immunity and the plant microbiota. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, n. 1, p. 565–589, 2017.

HAICHAR, F. EL Z. et al. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal**, v. 2, n. 12, p. 1221–1230, 2008.

HARTMAN, K. et al. Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2018.

HENRY, G.; THONART, P.; ONGENA, M. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v.6, p. 257-26, 2012.

HETZLER, J. et al. Interaction between *Cochliobolus sativus* and wheat cultivars. In: SAUNDERS, D. A. (Ed.) Proc. Int. Conf. On Wheat for Non-Traditional Warmer Areas. 1991. p.146-164

HEUN, M. et al. Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. **Science**, v.278, p.1312–1314, 1997.

HOREVAJ, P.; MILUS, E. A.; BLUHM, B. H. A real-time qPCR assay to quantify *Fusarium graminearum* biomass in wheat kernels. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 2, p. 396–406, 2011.

HORNE, M. Inter-relationships between *Bipolaris sorokiniana* isolates involved in spot blotch, common root rot and black point in winter cereals. 2015.

HUSTON, M. A General Hypothesis of Species Diversity *The American Naturalist*. **The University of Chicago Press** **The American Society of Naturalists**, v. 113, n.1, 81-101, 1979.

JAMES, J.; BECKER, J. O. Identifying microorganisms involved in specific pathogen suppression in soil. **Annual Review of Phytopathology**, v. 45, n. 1, p. 153–172, 2007.

JANVIER, C. et al. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 1–23, 2007.

JETIYANON, K. Defensive-related enzyme response in plants treated with a mixture of *Bacillus* strains (IN937a and IN937b) against different pathogens. **Biological Control**, v. 42, n. 2, p. 178–185, 2007.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.

JOSEPH H. CONNELL. Diversity in tropical rain forests and coral reefs. **Science**, v. 199, n. 4345, p. 1302–1310, 1978.

JOUSSET, A. et al. Biodiversity and species identity shape the antifungal activity of bacterial communities *Ecology*. **Wiley Ecological Society of America**, v. 95, n.5, 2014.

KANAAN, H.; MEDINA, S.; RAVIV, M. The Effects of Soil Solarization and Compost on Soil Suppressiveness against *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Melonis*. **Compost Science & Utilization**, v. 25, n. 3, p. 206–210, 2017.

KATIYAR, V.; GOEL, R. Siderophore mediated plant growth promotion at low temperature by mutant of fluorescent pseudomonad. **Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 3, p. 239–244, 2004.

KENNEDY, T. A. et al. Biodiversity as a barrier to ecological invasion. **Nature**, v. 417, n. 6889, p. 636–638, 2002.

KIELAK, A. M. et al. The ecology of *Acidobacteria*: Moving beyond genes and genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n.744, p. 1–16, 2016.

KIERS, E. T. et al. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. **Science**, v. 333, n. 6044, p. 880–882, 2011.

KIM, D. S.; COOK, R. J.; WELLER, D. M. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. **Phytopathology**, v. 87, n. 5, p. 551–558, 1997.

KLEIN, E.; KATAN, J.; GAMLIEL, A. Soil suppressiveness to fusarium disease

following organic amendments and solarization. **Plant Disease**, v. 95, n. 9, p. 1116–1123, 2011.

KLEIN, E.; KATAN, J.; GAMLIEL, A. Soil suppressiveness to *Meloidogyne javanica* as induced by organic amendments and solarization in greenhouse crops. **Crop Protection**, v. 39, p. 26–32, 2012.

KOKKORIS, G. D. et al. Variability in interaction strength and implications for biodiversity. **Journal of Animal Ecology**, v. 71, n. 2, p. 362–371, 2010.

KUMAR, M.; ASHRAF, S. Role of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent of fungal plant pathogens. In: **Probiotics and Plant Health**. Springer Singapore, 2017. p. 497–506.

KUMAR, S. et al. Mendelization and fine mapping of a bread wheat spot blotch disease resistance QTL. **Molecular Breeding**, v. 35, p. 1-10, 2015.

KWAK, M. J. et al. Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1100–1116, 2018.

LAKSHMANAN, V.; SELVARAJ, G.; BAIS, H. P. Functional soil microbiome: belowground solutions to an aboveground problem. **Plant Physiology**, v. 166, n. 2, p. 689–700, 2014.

LANOUE, A. et al. De novo biosynthesis of defense root exudates in response to *Fusarium* attack in barley. **New Phytologist**, v. 185, n. 2, p. 577–588, 2010.

LARKIN, R. P.; GRIFFIN, T. S. Control of soilborne potato diseases using *Brassica* green manures. **Crop Protection**, v. 26, n. 7, p. 1067–1077, 2007.

LAUBER, C. L. et al. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5111–20, 2009.

LAZZARINI, A. et al. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 78, p. 399–400, 2000.

LEE, S.-H.; KA, J.-O.; CHO, J.-C. Members of the phylum *Acidobacteria* are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, n. 2, p. 263–269, 2008.

LEFF, J. W. et al. Plant domestication and the assembly of bacterial and fungal communities associated with strains of the common sunflower, *Helianthus annuus*. v. 214, p. 412–423, 2016.

LEMANCEAU, P. et al. Plant communication with associated microbiota in the spermosphere, rhizosphere and phyllosphere. **Advances in Botanical Research**, v. 82, p. 101–133, 2017a.

LEMANCEAU, P. et al. Let the Core Microbiota Be Functional. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 7, p. 583–595, 2017b.

LEON, A. E.; ROSELL, C. M. De tales harinas, tales panes: granos, harinas e productos de panificación en Iberoamerica. **Córdoba:Hugo Baez**, 2007. 480 p.



- LI, L. et al. Diversity enhances agricultural productivity via rhizosphere phosphorus facilitation on phosphorus-deficient soils. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 27, p. 11192–11196, 2007.
- LIESACK, W. et al. Microbial diversity in soil: The need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: ELSAS, J.; TREVORS, J.; WELLINGTON, E. (Eds.). **Modern Soil Microbiology**. p. 375–439.
- LIU, X. et al. Using community analysis to explore bacterial indicators for disease suppression of tobacco bacterial wilt. **Scientific Reports**, v. 6, n. 36773 p. 1–11, 2016.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014.
- LUA, Q.; ZHANGA, J.; CHENA, L. Impact of monoculture of poplar on the rhizosphere microbial communities over time. **Pedosphere**, v. 0160, 2017.
- LU P. et al. Fine genetic mapping of spot blotch resistance gene Sb3 in wheat (*Triticum aestivum*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, p. 577–589, 2015.
- LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 541–556, 2009.
- MANGHWARA, H. et al. Expression analysis of defense related genes in wheat and maize against *Bipolaris sorokiniana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 103, p. 36-46, 2018.
- MARILLEY, L.; ARAGNO, M. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. **Applied Soil Ecology**, v. 13, n. 1999, p. 127–136, 2007.
- MARQUES, J. M. et al. Plant age and genotype affect the bacterial community composition in the tuber rhizosphere of field-grown sweet potato plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 88, n. 2, p. 424–435, 2014.
- MARSCHNER, P. et al. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 11, p. 1437–1445, 2001.
- MATUSINSKY, P. et al. Species-specific detection of *Bipolaris sorokiniana* from wheat and barley tissues. **Crop Protection**, v. 29, n. 11, p. 1325–1330, 2010.
- MAVRODI, D. V. et al. Long-term irrigation affects the dynamics and activity of the wheat rhizosphere microbiome. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1–15, 2018.
- MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 565–572, 2004.
- MAZZOLA, M. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 81, n. 1–4, p. 557–564, 2002.

- MAZZOLA, M. Manipulation of rhizosphere bacterial communities to induce suppressive soils. **Journal of nematology**, v. 39, n. 3, p. 213–20, 2007.
- MAZZOLA, M.; GU, Y.-H. Wheat genotype-specific induction of soil microbial communities suppressive to disease incited by *Rhizoctonia solani* anastomosis group (AG)-5 and AG-8. **Phytopathology**, v. 92, n. 12, p. 1300–1307, 2002.
- MCCANN, K. S. The diversity–stability debate. **Nature**, v. 405, n. 6783, p. 228–233, 2000.
- MCMILLAN, V. E.; GUTTERIDGE, R. J.; HAMMOND-KOSACK, K. E. Identifying variation in resistance to the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. tritici, between different ancestral and modern wheat species. **BMC plant biology**, v. 14, p. 212, 2014.
- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–11, 2013.
- MCNAUGHTON, S. J. Diversity and stability of ecological communities: a comment on the role of empiricism in ecology. **The American Naturalist**, v. 111, n. 979, p. 515–525, 1977.
- MEHTA, Y.R. Manejo Integrado de Enfermedades del Trigo. **Centro de Investigación Agrícola Tropical (CIAT)**, 1993, 314 p.
- MEHTA, Y.R. et al. Integrated management of major wheat diseases in Brazil: an example for the Southern Cone region of Latin America. **Crop Protection**, v.11, p.517-524, 1992.
- MENDES, L. W. et al. Influence of resistance breeding in common bean on rhizosphere microbiome composition and function. **ISME Journal**, v. 12, n. 1, p. 212–224, 2017.
- MENDES, R. et al. Deciphering the rhizosphere microbiome. v. 332, p. 1097–1100, 2011.
- MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. v. 37, p. 634–663, 2013.
- MICALLEF, S. A. et al. Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 6, p. 1729–1742, 2009.
- MITSUBOSHI, M. et al. Evaluation of suppressiveness of soils exhibiting soil-borne disease suppression after long-term application of organic amendments by the co-cultivation method of pathogenic *Fusarium oxysporum* and indigenous soil microorganisms. **Microbes and Environments**, v. 33, n. 1, p. 58–65, 2018.
- NESBITT, M. Where was einkorn wheat domesticated? Trends in Plant **Science** v.3, p. 1360–1385, 1998.
- NEUMANN, G. Root exudates and nutrient cycling. In: MARSCHNER, P.; RENGEL,

- Z. (Eds.). **Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems. Soil Biology**. 2007, p. 123–157.
- NEWMAN, M. E. J. Modularity and community structure in networks. v. 103, n. 23, p. 8577–8582, 2006.
- NICAISE V., ROUX M.; ZIPFEL C. Recent advances in PAMP-Triggered Immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. **Plant Physiology**, v. 150, p. 1638-1647, 2009.
- NORTHEN, T. L. S. AND T. R. Untargeted soil metabolomics using liquid chromatography–mass spectrometry and gaschromatography–mass spectrometry. In: BAIDOO, E. K. **Microbial Metabolomics**. . 2018, p. 97–109.
- OKSANEN, A. J. et al. **Vegan: Community Ecology Package**., 2016.
- PAINE, R. T. Ecological determinism in the competition for space: the robert h. macarthur award lecture. **Ecology**, v. 65, n. 5, p. 1339–1348, 1984.
- PEIFFER, J. A. et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 16, p. 6548–6553, 2013.
- PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; DE VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 187–193, 2011.
- PÉREZ-JARAMILLO, J. E. et al. Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* to genotypic and root phenotypic traits. **ISME Journal**, v. 11, n. 10, p. 2244–2257, 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, n. 6, p. 635–644, 2015.
- PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789–799, 2013.
- PIANKA, E. R. **Ecologia evolutiva**. Omega, 1982, pp 365.
- PIETERSE, C. M. J. et al. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. **Symbioses**, v. 35, n. 1–3, p. 39–54, 2003.
- PIMENTEL, D. et al. Environmental and Economic Costs of Soil Erosion and Conservation Benefits. **Science**, v. 267, n. 5201, p. 1117–1123, 1995.
- PIMM, S. L. The complexity and stability of ecosystems. **Nature**, v. 307, n. 5949, p. 321–326, 1984.
- POSTMA, J.; SCHEPER, R. W. A.; SCHILDER, M. T. Effect of successive *cauliflower* plantings and *Rhizoctonia solani* AG 2-1 inoculations on disease suppressiveness of a suppressive and a conducive soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 804–812, 2010.
- PRETTY, J.; BHARUCHA, Z. P. Sustainable intensification in agricultural systems.

**Annals of Botany**, v. 114, n. 8, p. 1571–1596, 2014.

PROULX, S. R.; PROMISLOW, D. E. L.; PHILLIPS, P. C. Network thinking in ecology and evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, n. 6 SPEC. ISS., p. 345–353, 2005.

QIAO, Q. et al. The variation in the rhizosphere microbiome of cotton with soil type, genotype and developmental stage. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

QIU, Z. et al. New frontiers in agriculture productivity: Optimised microbial inoculants and in situ microbiome engineering. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 6, p. 1–11, 2019.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 590–596, 2013.

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

RAAIJMAKERS, J. M.; VLAMI, M.; DE SOUZA, J. T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1, p. 537–547, 2002.

RAIS, A. et al. Plant growth promoting rhizobacteria suppress blast disease caused by *Pyricularia oryzae* and increase grain yield of rice. **BioControl**, v. 61, n. 6, p. 769–780, 2016.

RAIS, A. et al. *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–17, 2017.

REIS, E.M.; CASA, R.T. Doenças do Trigo. In: KIMATI, H.; AMORIM, L; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de Fitopatologia**. v. 2. p. 631-638, 2005.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; MEDEIROS C. A. Diagnose, patometria e controle de doenças de cereais de inverno. 2001, 94 p.

REIS, E.M.; SILVA, C.L.; CASA, R.T.; MEDEIROS, C.A. Decomposição dos restos culturais do trigo e sobrevivência saprofítica de *Bipolaris sorokiniana*. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.62-64, 1998.

REIS, E.M.; FERNANDES, J.M.C.; PICCININI, E.C. Estratégias para o controle de doenças do trigo. **Documentos Embrapa-CNPTrigo**, Passo Fundo, 1988. 50p.

ROESCH, L. F. W. et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, v. 1, n. 4, p. 283–290, 2007.

RONALD, P. C.; SHIRASU, K. Front-runners in plant-microbe interactions. **Current**

**Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 4, p. 345–348, 2012.

ROSENZWEIG, N. et al. Microbial Communities Associated with Potato Common Scab-suppressive soil determined by pyrosequencing analyses. **Plant Disease**, v. 96, n. 5, p. 718–725, 2012.

ROSSMANN, M. et al. Multitrophic interactions in the rhizosphere microbiome of wheat: from bacteria and fungi to protists. **FEMS**, v.96, n. 4, p. 1-14, 2020.

ROVIRA, A.; WILDERMUTH, G. The nature and mechanisms of suppression. In: ASHER, M.; SHIPTON, P. (Eds.). **Biology and Control of Take-all**. 1981,, p. 538.

RUDRAPPA, T.; BAIS, H. P. Genetics, novel weapons and rhizospheric microcosmal signaling in the invasion of *Phragmites australis*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 1, p. 1–5, 2008.

SANGUIN, H. et al. Rhizosphere bacterial communities associated with disease suppressiveness stages of take-all decline in wheat monoculture. **New Phytologist**, v. 184, n. 3, p. 694–707, 2009.

SANTOYO, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M. DEL C.; GOVINDAPPA, M. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 8, p. 855–872, 2012.

SARWAR, A. et al. Biological control of potato common scab with rare isatropolone c compound produced by plant growth promoting *Streptomyces* A1RT. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–10, 2018.

SCHLAEPPI, K.; BULGARELLI, D. The plant microbiome at work. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 3, p. 212–217, 2015.

SCHREINER, K. et al. Comparison of barley succession and take-all disease as environmental factors shaping the rhizobacterial community during take-all decline. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 14, p. 4703–12, 2010.

SCHULZ-BOHM, K. et al. Calling from distance: attraction of soil bacteria by plant root volatiles. **The ISME Journal**, v. 12, n. 5, p. 1252–1262, 2018.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n. 3, p. 507, 1974.

SHAPOSHNIKOV, A. I. et al. Comparative characteristics of root systems and root exudation of synthetic, landrace and modern wheat varieties. **Agricultural Biology**, v. 51, n. 1, p. 68–78, 2016.

SHI, S. et al. Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 77, n. 3, p. 600–610, 1 set. 2011.

SIEGEL-HERTZ, K. et al. Comparative microbiome analysis of a *Fusarium* wilt suppressive soil and a *Fusarium* wilt conducive soil from the Châteaurenard region. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–16, 2018.

SILVA, J. C. P. DA; MEDEIROS, F. H. V. DE; CAMPOS, V. P. Building soil

- suppressiveness against plant-parasitic nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 5, p. 423–445, 2018.
- SINGH, B. K. et al. Unravelling rhizosphere-microbial interactions: opportunities and limitations. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 8, p. 386–93, 2004.
- SINGH, B. K.; TRIVEDI, P. Microbiome and the future for food and nutrient security. **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 50–53, 2017.
- SINGH, L. P.; GILL, S. S.; TUTEJA, N. Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 2, p. 175–91, 2011.
- SINGH, R. P. Genetic analysis of resistance to scab in spring wheat cultivar frontana. **Plant Disease**, v. 79, n. 3, p. 238–240, 1995.
- SINGH, R. P. et al. Disease impact on wheat yield potential and prospects of genetic control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 54, p. 303–322, 2016.
- SINGH, P. K. et al. Development and characterization of the 4th CSISA-spot blotch nursery of bread wheat. **European Journal of Plant Pathology**, v. 143, p. 595–605, 2015.
- SOUZA, J. A. M. et al. The family *Bradyrhizobiaceae*. In: ROSENBERG, E. et al. (Eds.). **The Prokaryotes**. Springer, 2014. p. 135–154.
- SRIVASTAVA, R. et al. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, *fluorescent Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici for the management of tomato wilt. **Biological Control**, v. 53, n. 1, p. 24–31, 2010.
- STEINBERG, C. et al. Soil suppressiveness to plant diseases. **Modern Soil Microbiology, Second Edition**, p. 455–478, 2006.
- STIRLING, G. R. et al. Organic inputs, tillage and rotation practices influence soil health and suppressiveness to soilborne pests and pathogens of ginger. **Australasian Plant Pathology**, v. 41, n. 1, p. 99–112, 2012.
- STOCKWELL, V. O. et al. Mechanistically compatible mixtures of bacterial antagonists improve biological control of fire blight of pear. **Phytopathology**, v. 101, n. 1, p. 113–123, 2011.
- STUBBENDIECK, R. M.; STRAIGHT, P. D. Multifaceted interfaces of bacterial competition. **Journal of bacteriology**, v. 198, n. 16, p. 2145–55, 2016.
- THORPE, A. S. et al. Root exudate is allelopathic in invaded community but not in native community: Field evidence for the novel weapons hypothesis. **Journal of Ecology**. **97: 641-645.**, p. 641–645, 2009.
- TIKHONOVICH, I. A.; PROVOROV, N. A. Microbiology is the basis of sustainable agriculture: an opinion. **Annals of Applied Biology**, v. 159, n. 2, p. 155–168, 2011.
- TILMAN, D.; DOWNING, J. A. Biodiversity and stability in grasslands. **Nature**, v. 367, n. 6461, p. 363–365, 1994.

TOJU, H. et al. Core microbiomes for sustainable agroecosystems. **Nature Plants**, v. 4, p. 247–257, 2018.

UNNO, Y. et al. Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 396–404, 2005.

United States Department of Agriculture - USDA Foreign Agricultural Service.  
Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/commodities>>. Acesso em: 06 jul. 2020.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; HARTMANN, M. Networking in the plant microbiome. **PLoS Biology**, v. 14, n. 2, p. 1–9, 2016.

VAN DER VOORT, M. et al. Impact of soil heat on reassembly of bacterial communities in the rhizosphere microbiome and plant disease suppression. **Ecology Letters**, v. 19, n. 4, p. 375–382, 2016.

VAN ELSAS, J. D. et al. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 4, p. 1159–1164, 2012.

VAN WEES, S. C.; VAN DER ENT, S.; PIETERSE, C. M. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 4, p. 443–448, 2008.

VANNIER, N.; AGLER, M.; HACQUARD, S. Microbiota-mediated disease resistance in plants. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 6, p. 1–7, 2019.

WARD, N. L. et al. Three genomes from the phylum *Acidobacteria* provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2046–2056, 2009.

WARDLE, D. A. et al. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. **Science**, v. 304, p. 1629–1633, 2004.

WEI, Z. et al. Trophic network architecture of root-associated bacterial communities determines pathogen invasion and plant health. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–9, 2015.

WEI, Z. et al. Initial soil microbiome composition and functioning predetermine future plant health. **Science Advances**, v. 5, n. 9, p. eaaw0759, 2019.

WEINERT, N. et al. PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: many common and few cultivar-dependent taxa. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 75, n. 3, p. 497–506, 2011.

WELLER, D. M. et al. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 309–348, 2002.

WERNER, G. D. A. et al. Evolution of microbial markets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 4, p. 1237–1244, 2014.

- WEYENS, N. et al. Exploiting plant–microbe partnerships to improve biomass production and remediation. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 10, p. 591–598, 2009.
- WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1, p. 357–364, 2002.
- WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. suppl 1, p. 487–511, 2001.
- WICKHAM, H. ggplot2: Elegant graphics for data analysis. **Hadley WickhamSpringer**, 2009.
- WINTERMANS, P. C. A.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Natural genetic variation in Arabidopsis for responsiveness to plant growth-promoting rhizobacteria. **Plant molecular biology**, v. 90, n. 6, p. 623–34, 2016.
- YIN, C. et al. role of bacterial communities in the natural suppression of *Rhizoctonia solani* bare patch disease of wheat ( *Triticum aestivum* L .). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 23, p. 7428–7438, 2013.
- ZAK, D. R. et al. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: Are there any links? **Ecology**, v. 84, n. 8, p. 2042–2050, 2003.
- ZARRAONAINDIA, I. et al. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. **mBio**, v. 6, n. 2, p. e02527-14, 2015.
- ZORNER, P.; FARMER, S.; ALIBEK, K. Quantifying crop rhizosphere microbiome ecology: the next frontier in enhancing the commercial utility of agricultural microbes. **Industrial biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 116–119, 2018.



## APÊNDICE A - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

**Tabela 1 - Estatística básica de análise de qualidade FastQc**

Medida	Valor
Nome do arquivo	fastqjoin.join.fastq
Tipo do arquivo	Conventional base calls
Codificação	Sanger / Illumina 1.9
Total de sequências	10270419
Sequências sinalizadas como baixa qualidade	0
Comprimento da sequência	251-496
%GC	53

**Figura 1 - Índice de qualidade em todas as bases (Sanger / Illumina 1.9 encoding)**

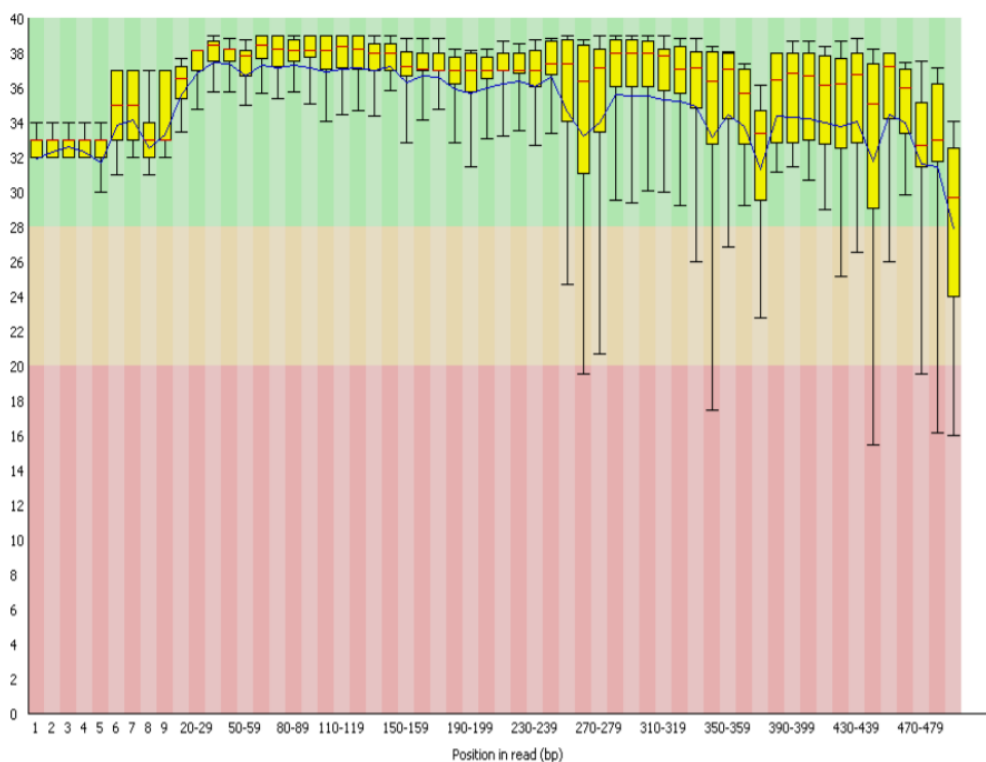


Figura 2 - Curvas de rarefações para chao1 (número de OTUs observadas)

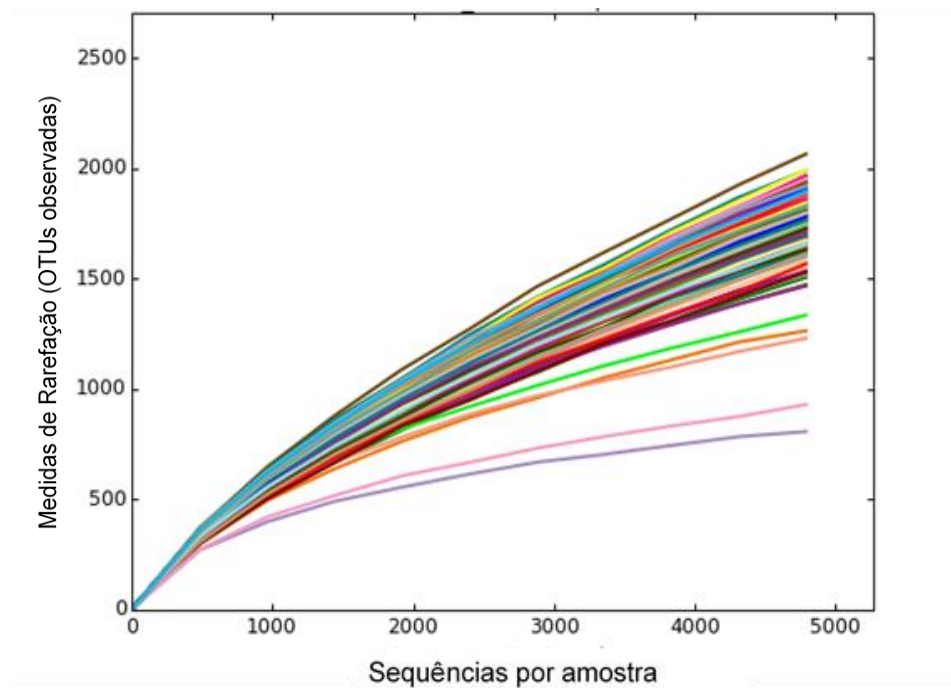


Tabela 2 - Número de cópias de DNA (ng/  $\mu$ L) do patógeno *Bipolaris sorokiniana* presente na rizosfera do trigo de genótipos resistentes e suscetíveis.

Genótipo	Ciclos				
	1	2	3	4	5
IAC 5	5,08 a	5,23 a	5,53 a	5,55 a	5,19 a
Frontana	4,63 b	5,52 a	5,81 a	5,57 a	5,20 a
Karakilcik	4,62 b	5,29 a	5,71 a	5,62 a	5,19 a
Guamirim	4,65 b	5,58 a	5,97 a	5,86 a	5,39 a
IAC 5 Controle	3,98 c	4,30 b	4,49 b	4,52 b	4,01 b
Frontana Controle	3,34 c	4,23 b	4,55 b	4,45 b	4,17 b
Karakilcik Controle	4,16 c	4,18 b	4,21 b	4,21 c	3,78 b
Guamirim Controle	4,15 c	4,17 b	4,21 b	4,19 c	3,86 b
<i>Bulk soil</i>	3,98 c	4,10 b	4,46 b	4,09 c	4,31 b
<b><i>p</i> &lt; 0.05</b>	1,41E-03	1,14E-04	4,78E-05	1,06E-08	6,15E-04

**Tabela 3 - Índices de Alpha diversidade entre os tratamentos e controle dentro dos ciclos (índice de riqueza Chao 1, índice de diversidade Shannon e Simpson).**

CHAO1					
GENÓTIPOS	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5
Frontana	13746,17 a	10872,46 a	7165,36 a	8882,50 a	7129,36 a
Guamirim	12508,26 a	13786,99 a	7449,13 a	8665,93 a	6628,37 a
Iac 5	13131,61 a	12288,50 a	6768,89 a	8347,02 a	7142,89 a
Karakilcik	12886,13 a	11470,68 a	6759,67 a	6095,23 b	6310,52 a
<i>Bulk soil</i>	14396,46 a	12215,38 a	4074,51 b	6567,59 b	5742,09 a
SHENNON					
GENÓTIPOS	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5
Frontana	7,11 a	7,24 a	7,14 a	7,22 a	7,12 a
Guamirim	7,08 a	7,30 a	7,09 a	7,12 a	7,01 a
Iac 5	7,03 a	7,21 a	7,04 a	7,12 a	7,03 a
Karakilcik	6,89 b	7,09 b	6,93 a	6,88 b	6,91 b
<i>Bulk soil</i>	7,02 b	7,13 b	6,63 b	6,99 b	6,76 b
SIMPSON					
GENÓTIPOS	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5
Frontana	0,996684 a	0,997578 a	0,997583 a	0,997564 a	0,997253 a
Guamirim	0,996751 a	0,997558 a	0,996843 b	0,997122 a	0,997071 a
Iac 5	0,996566 a	0,997323 a	0,997264 a	0,997324 a	0,997071 a
Karakilcik	0,995840 b	0,996182 b	0,996518 b	0,996990 a	0,996762 a
<i>Bulk soil</i>	0,995431 b	0,996278 b	0,996198 b	0,996699 a	0,995719 b

**Tabela 4 - Análise multivariada permutacional de variância, mostrando a contribuição ( $R^2$ ) e a significância ( $p$ ) de cada fator acessado neste estudo na comunitária da rizosfera**

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F.Model	$R^2$	$p$
ISD	1	0,101	0,101	0,713	0,002	0,76
Ciclos	1	0,431	0,431	3,03	0,012	<b>0,02</b>
Genótipo	3	0,545	0,181	1,276	0,015	0,07
ISD*Ciclo	1	0,111	0,11	0,777	0,003	0,59
ISD*Genótipo	3	0,489	0,163	1,146	0,014	0,2
Ciclos*Genótipo	3	0,689	0,229	1,612	0,019	<b>0,04</b>
ISD*Ciclo*Genótipo	3	0,411	0,136	0,962	0,011	0,45
Resíduo	224	31,875	0,142		0,919	
Total	239	34,652			1	

**Tabela 5 - Correlações e propriedades topológicas de *networks* da comunidade bacteriana da rizosfera de genótipos de trigo.**

Genótipos	Troca de Solo (Com patógenos em todos os ciclos)			Troca de Solo (Sem patógenos em todos os ciclos)		
	Frontana - Guamirim	Frontana - Frontana	Frontana - <i>Bulk soil</i>	Frontana - Guamirim	Frontana - Frontana	Frontana - <i>Bulk soil</i>
<b>Número de nós</b>	3293	3582	2975	3592	3240	2975
<b>Número de arestas</b>	10942	12098	9706	12150	10734	9706
<b>Número de arestas positivas</b>	2096	1790	1622	1958	2019	1622
<b>Número de arestas negativas</b>	940	1096	803	776	1004	803
<b>Modularidade</b>	1,22	1,56	1,58	1,37	1,57	1,58
<b>Número de comunidades</b>	39	32	36	36	30	36
<b>Diâmetro da rede</b>	13	12	11	12	11	11
<b>Comprimento médio do caminho</b>	5,17	5,09	5,23	5,19	5,03	5,23
<b>Conexões por nó</b>	10,94	12,09	9,70	12,44	10,73	9,70
<b>Coefficiente de clusterização</b>	0,34	0,44	0,43	0,41	0,41	0,43