

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

Caracterização *in silico* e *in vitro* do potencial de uma comunidade bacteriana sintética para biocontrole de patógenos de milho

Patrícia Perina de Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção de título de Bacharel em Ciências Biológicas.
Orientadora: Maria Carolina Quecine Verdi

**Piracicaba - SP
2023**

SUMÁRIO**Sumário**

RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	5
1.1. RIZOSFERA E COMUNIDADE SINTÉTICA	5
1.2. AÇÃO DE ANTIBIOSE E CONTROLE BIOLÓGICO	6
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	8
3.2. ENSAIO DE ANTIBIOSE ENTRE RPCP DO CONSÓRCIO E PATÓGENOS DO MILHO	10
3.3. EXTRAÇÃO DE DNA, SEQUENCIAMENTO E MONTAGEM DOS GENOMAS DAS RPCP	11
3.4. ANOTAÇÃO <i>IN SILICO</i> DOS GENES RELACIONADOS A PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL E BIOSÍNTESE DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	11
4. CRONOGRAMA	12
5. REFERÊNCIAS.....	12

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DO POTENCIAL DE UMA COMUNIDADE BACTERIANA SINTÉTICA PARA BIOCONTROLE DE PATÓGENOS DE MILHO

As interações benéficas entre plantas e bactéria exercem importante papel nos processos fisiológicos das plantas, resultando em promoção do crescimento vegetal por mecanismos diretos e indiretos. Dentre as bactérias benéficas às plantas, destaca-se o papel das rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs), que estão presentes na porção de solo intimamente associada às raízes de plantas denominada rizosfera. As RPCPs podem ter ação antimicrobiana, promovendo o crescimento vegetal de maneira indireta através do controle de doenças, portanto, têm sido estudadas visando a obtenção de inoculantes que possam substituir agroquímicos para nutrição e defesa vegetal, tornando assim o cultivo mais sustentável. Sabe-se que a utilização das RPCPs em consórcios bacterianos sintéticos pode proporcionar efeito aumentado a promoção de crescimento vegetal. Para viabilizar esta solução biotecnológica, é necessário compreender a nível genético a ação destas bactérias no biocontrole de patógenos. Com isso, será possível desenvolver maneiras de otimizar a complexa interação das RPCPs com a planta e a sinergia com as comunidades microbianas que a habitam. O objetivo deste projeto é caracterizar *in silico* e *in vitro* o potencial de uma comunidade bacteriana sintética previamente definida visando o biocontrole de patógenos de milho. Para isso, é necessária uma análise *in silico* a partir do *draft* do genoma das linhagens bacterianas utilizadas para compreensão dos genes associados à promoção do crescimento da planta e à produção de metabólitos secundários que sejam potenciais antimicrobianos. Serão realizados ensaios *in vitro* de antibiose entre linhagens bacterianas e fungos patogênicos; Espera-se compreender o papel das RPCPs com elevado potencial como agentes de biocontrole de patógenos de milho para otimizar a aplicação da comunidade bacteriana sintética.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento de plantas; Comunidades sintéticas; Controle biológico; Metabólitos secundários.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. Rizosfera e comunidade sintética

O volume de solo associado às raízes das plantas possui alta concentração de microrganismos e elevada atividade microbiana, devido a presença dos exsudatos e outros compostos secretados pelas raízes. Este volume de solo é chamado de rizosfera e se divide em três porções: a raiz, o solo e os microrganismos (Hiltner, 1904 *apud* Compant et al., 2010). Alguns microrganismos da rizosfera podem ser neutros, deletérios ou benéficos em relação à saúde da planta (Welbaum et al., 2004 *apud* Compant et al., 2010). Dentre os microrganismos benéficos, é possível encontrar as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs), que são capazes de estimular o crescimento da planta, aumentar a produtividade, reduzir a susceptibilidade ao ataque de patógenos, além de atenuar os efeitos de estresses bióticos e abióticos, melhorando o *fitness* da planta no geral (Vacheron et al., 2013; Welbaum et al., 2010)

A utilização de RPCPs como biofertilizantes e bioestimuladores na produção de grandes culturas é uma opção viável e sustentável (Bhardwaj et al., 2014), uma vez que estes organismos promovem o crescimento vegetal e um aumento no vigor da planta, tendo assim grande impacto na agricultura global (Compant et al., 2010; Khan et al., 2022; Welbaum et al., 2010). Em especial diante do cenário de crescente demanda de maiores produtividades sem aumento de áreas cultiváveis e com redução do uso de agroquímicos, cujos impactos negativos ao ambiente e a saúde humana já vem longamente sendo discutidos (FAO, 2020 *apud* Ferrarezi et al., 2022)

Muitas destas RPCPs quando utilizadas em condições de campo não conseguem se equiparar aos resultados obtidos em ambientes controlados. Isto pode ocorrer por diversos fatores, como problemas na aplicação das RPCP no campo e até inviabilidade dos inoculantes de competir com a microbiota já presente no solo (Smyth et al, 2011 *apud* Khan et al., 2022). Porém, outra razão da discrepância é a baixa performance das RPCP em condições naturais de solo e rizosfera quando aplicadas isoladamente (Van veen et al, 1997 *apud* Khan et al., 2022).

Os consórcios bacterianos sintéticos (CBS) são comunidades bacterianas compostas por diversas linhagens ou espécies conhecidas e desenvolvidas de forma a realizar atividades bem definidas, os organismos destes consórcios devem ser passíveis de cultivo *in vitro* havendo a possibilidade de se reproduzir este consórcio (Del Frari & Ferreira, 2021). O uso de CBS para inoculação de plantas é uma alternativa para aumentar o potencial da aplicação de inoculantes que apresentam diversos benefícios em comparação à aplicação isolada de RPCP (Khan et al., 2022).

Entretanto, o preparo destes consórcios depende da compatibilidade destes organismos de forma a apresentarem sinergia entre si, resultando em uma nutrição melhorada para a planta, promovendo assim o crescimento e o desenvolvimento desta em ambientes mais variáveis (Compant et al., 2010).

1.2. Ação de antibiose e controle biológico

As atividades benéficas das RPCPs para as plantas podem ser classificadas em diretas e indiretas. As primeiras se referem à promoção do crescimento das plantas através da biossíntese de fitormônios e a disponibilização de nutrientes, enquanto os mecanismos indiretos de promoção do crescimento se referem à indução de resistência a condições deletérias e a ação antagonista a outros microrganismos fitopatógenos, estando esta ação de antibiose diretamente associada a síntese de metabólitos secundários (SM) (Bach et al., 2016; Demain & Fang, 2000; Vacheron et al., 2013).

Os SM dos microrganismos são compostos auxiliares biossintetizados através de metabólitos primários, não sendo necessários ao crescimento normal da célula, mas beneficiando o organismo de diversas maneiras, como a aquisição de nutrientes, comunicação e inibição de outros organismos (Demain & Fang, 2000; Gross & Loper, 2009; Sharrar et al., 2020).

A antibiose consiste na produção natural de um agente antimicrobiano por um microrganismo, tendo um impacto no desenvolvimento e sobrevivência de outro microrganismo (Compant et al., 2005). Estes agentes antimicrobianos são usualmente os SM, como quitinases, ácido cianídrico, proteases, celulasas, entre outros (Quecine et al., 2016; Sharrar et al., 2020). Estes metabólitos resultam numa vantagem de *fitness* e de competitividade de um microrganismo sobre outro (Bach et al., 2016; Compant et al., 2005).

Os microrganismos fitopatógenos são um problema crônico para a produção de alimento e para a estabilidade dos ecossistemas no mundo todo. O controle químico tem sido amplamente utilizado por produtores no mundo todo. Entretanto, o uso contínuo e crescente destes químicos pode resultar em resistências dos patógenos, causar problemas para o ecossistema terrestre e aquático, além de encarecer a produção (de Weger et al., 1995; Gerhardson, 2002). Neste sentido, a busca por métodos alternativos que sejam menos agressivos ao ambiente para controle de doenças tem aumentado nos últimos anos (Compant et al., 2005). Neste cenário, RPCP que apresentam mecanismos de antibiose contra patógenos podem ter um papel crucial no futuro das produções agrícolas. Estas bactérias têm sido muito estudadas atualmente como potenciais agentes de controle biológico de fitopatógenos, o que permitiria uma redução no uso de agroquímicos nas plantações (Bach et al., 2016; de Weger et al., 1995; Gerhardson, 2002; Whipps, 2001).

Para melhorar o desempenho das RPCP em condições de campo, é crucial compreender os mecanismos genéticos da interação antagônica destas com os patógenos, com a planta e com a comunidade microbiana que a habita. O entendimento sobre os diferentes modos de ação de cada cepa permite que sejam elaboradas estratégias de associação destes microrganismos visando complementaridade em consórcios bacterianos, melhorando assim o potencial desta ferramenta biotecnológica no controle biológico (Whipps, 2001).

Os SM são produzidos por *clusters* de genes biossintéticos, ou seja, um grupo de genes co-localizados que funcionam para a construção de moléculas complexas, as peptídeo não-ribossomais sintetases (NRPS) e as policetídeo sintases (PKS) são os principais grupos responsáveis pela codificação dos antibióticos e antifúngicos mais conhecidos e utilizados atualmente (Sharrar et al., 2020).

Compreender o papel dos genes responsáveis pela síntese dos metabólitos envolvidos na interação antagônica entre RPCPs e patógenos é de suma importância para alcançar os efeitos desejados no manejo biológico de doenças de plantas. Para tanto, no presente projeto serão utilizadas RPCP constituintes de uma comunidade bacteriana sintética previamente estabelecida para realizar análises *in vitro* de antibiose contra patógenos selecionados de milho. Além disso, visando compreender os mecanismos genéticos que governam as interações antagônicas entre RPCP e fungos patogênicos, será realizada uma busca *in silico* de genes relacionados à biossíntese de SM nos genomas das linhagens que apresentem antibiose *in vitro*.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto é avaliar as RPCP visando controle biológico de patógenos do milho, com potencial de serem usadas em comunidades bacterianas sintéticas para aplicação de culturas agrícolas.

Os objetivos específicos deste trabalho se baseiam em:

- Avaliação do potencial de RPCP de um consórcio bacteriano sintético para o controle biológico de patógenos do milho;
- Extração de DNA, sequenciamento e montagem dos genomas das RPCPs;
- Anotação *in silico* dos genes relacionados a promoção de crescimento vegetal e biossíntese de metabólitos secundários.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

As linhagens bacterianas utilizadas no consórcio foram previamente selecionadas com base em análise de dados metagenômicos que possibilitou identificar relações sinérgicas entre membros de uma comunidade nativa de solo cultivado com milho e a RPCP *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (Ferrarezi et al, 2023 *accepted*). Estas linhagens foram isoladas de diferentes plantas hospedeiras e algumas foram cedidas pela Embrapa Agrobiologia (Seropédica-RJ) (Tabela 1).

Tabela 1. Comunidade bacteriana sintética selecionada para análise do potencial de biocontrole de patógenos do milho

Linhagem	Identificação		
	taxonômica	Isolada de	Isolada em
BR 961	<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Leucaena</i> sp.	Mato Grosso do Sul
BR 11049	<i>Kocuria</i> sp.	<i>Triticum</i> sp.	Rio de Janeiro - Seropédica
BR 11178	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	<i>Zea mays</i>	Rio de Janeiro - Seropédica
BR 11882	<i>Methylobacterium</i> sp.	<i>Brachiaria decumbens</i>	Goiás - Santo Antônio de Goiás
BR 13874	<i>Dyella</i> sp.	<i>Saccharum</i> sp.	Rio de Janeiro - Seropédica
BR 13885	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Saccharum</i> sp.	Rio de Janeiro - Seropédica
BR 13914	<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Saccharum</i> sp.	Rio de Janeiro - Seropédica
BR 13934	<i>Pseudacidovorax</i> sp.	<i>Saccharum</i> sp.	Rio de Janeiro - Seropédica
BR 14205	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	<i>Saccharum sinense</i>	Rio de Janeiro - Seropédica
BR 14640	<i>Sphingobium</i> sp.	<i>Brachiaria humidicola</i>	Mato Grosso do Sul - Campo Grande
33.1	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Eucalyptus grandis</i>	-
CNM05	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Zea mays</i>	São Paulo - Piracicaba
CNM19	<i>Siphonobacter</i> sp.	<i>Zea mays</i>	São Paulo - Piracicaba

Este consórcio bacteriano será avaliado quanto à sua capacidade de inibição do crescimento de três patógenos de milho: *Fusarium verticillioides*, *Cercospora zea-maydis*, *Colletotrichum graminicola*, obtidos da coleção de fungos do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”. As linhagens dos patógenos utilizadas no teste serão crescidas em meio PDA (*potato dextrose agar*) (Tabela 2), verificadas quanto à pureza e incubadas por 24h a 28°C em *Biological Oxygen Demand* (BOD).

As linhagens bacterianas serão repicadas individualmente em meio LB (Luria Bertani) sólido (Tabela 3). Após a verificação da pureza das linhagens, estas serão crescidas em meio LB líquido, e o preparo dos inóculos bacterianos será realizado em solução PBS (*Phosphate-buffered saline*) (Tabela 4).

Tabela 2. Reagentes utilizados para o Meio PDA (Kasvi), utilizado no cultivo e manutenção dos patógenos de milho, pH final $5,6 \pm 0,2$ a 25°C.

MEIO PDA	
Reagentes	Quantidades
Dextrose	20g
Infusão de batatas (200g)	4g
Ágar bacteriológico	15g
Água destilada	1000mL

Tabela 3. Reagentes utilizados para o Meio LB, utilizado no cultivo das bactérias da comunidade sintética, pH final $7,0 \pm 0,2$ a 25°C. Marca Kasvi.

MEIO LB	
Reagentes	Quantidades
Triptona	10g
Extrato de levedura	5g
NaCl	5g
Água destilada	1000mL

Tabela 4. Reagentes utilizados para o tampão PBS, utilizado no preparo do inóculo bacteriano, pH final 7,4.

Solução tampão PBS	
Reagentes	Quantidades
NaCl	8g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,24g
Água destilada	1000ml

3.2. Ensaio de antibiose entre RPCP do consórcio e patógenos do milho

O ensaio será realizado em triplicata, considerando cada placa de Petri como uma repetição. Em cada placa de Petri com meio PDA, será aplicada uma gotícula de 20 µL de solução bacteriana ajustada para OD_{600nm} = 0,1 com PBS em uma extremidade, e no centro da placa será inoculado o patógeno em discos de 1 cm de diâmetro.

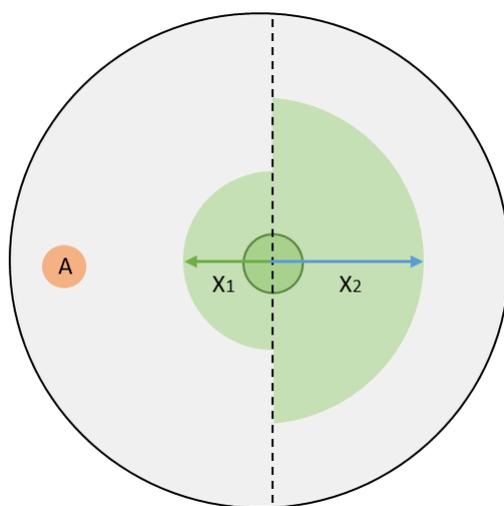


Figura 1. Plaqueamento do ensaio de antagonismo. (A) a bactéria inoculada, e no centro da placa o patógeno. (X₁) representa o crescimento radial com a inibição e (X₂) o crescimento radial sem inibição.

O índice de crescimento do patógeno será calculado a partir das medidas de crescimento radial do fungo em direção a colônia bacteriana (x₁) versus o crescimento radial no sentido perpendicular à colônia bacteriana (x₂), de acordo com a fórmula: $(1 - (x_1/x_2)) \times 100$, adaptado de Quecine et al (2016). O tempo de avaliação irá variar conforme o tempo de crescimento do fungo nas placas de controle, nas quais não haverá inoculação de bactéria na extremidade da placa.

3.3. Extração de DNA, sequenciamento e montagem dos genomas das RPCP

As linhagens serão cultivadas em 50 mL de meio LB líquido sob agitação constante (150 rpm) por 24 horas a 28 °C. Após o crescimento, as células serão centrifugadas por 10 minutos a 10.000 g e o sobrenadante será descartado. Amostras de DNA serão extraídas utilizando o kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen®) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de DNA extraídas serão analisadas em gel de agarose (1%) e as concentrações determinadas em espectrofotômetro BioDrop µLITE (Biochrom).

O sequenciamento dos genomas das RPCP será realizado em parceria com a empresa Onsite Genomics e o sequenciamento utilizando-se a plataforma MinION (Oxford Nanopore; Jain et al., 2016). Os dados resultantes serão submetidos a chamada de leituras (*reads calling*) com o software *Genetic Understanding Perspective Preview sYstem* (GUPPY; staff.aist.go.jp/yutaka.ueno/guppy/), controle de qualidade com FastQC, mapeamento contra um genoma de referência e montagem com o software Minimap2, e polimento de montagem com as ferramentas Racon (github.com/lbcb-sci/racon; Vaser et al., 2017) e Medaka (github.com/nanoporetech/medaka). As montagens genômicas serão avaliadas quanto a parâmetros de qualidade com as ferramentas *Quality Assessment Tool for Genome Assemblies Tool* (QUAST; Gurevich et al., 2013) e *Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs* (BUSCO; Simão et al., 2015)

3.4. Anotação *in silico* dos genes relacionados a promoção de crescimento vegetal e biossíntese de metabólitos secundários

Os genomas bacterianos serão preditos e anotados com a ferramenta Prokka (Seemann, 2014). A ferramenta PGPT-Pred, disponível na plataforma PLABase (PLant-associated BActeria web resource) (plabase.informatik.uni-tuebingen.de/pb/plabase.php; Patz et al., 2021), será utilizada para anotação dos genes relacionados às vias de promoção de crescimento vegetal. A ferramenta antiSMASH (antismash.secondarymetabolites.org/; Blin et al., 2021) será utilizada para anotação dos cluster gênicos responsáveis pela biossíntese dos metabólitos secundários das linhagens utilizadas para o teste de antibiose, cujos resultados foram positivos para a inibição do crescimento dos patógenos.

4. CRONOGRAMA

Meses	1º	2º	3º	4º	5º	6º
Atividade						
Manutenção dos microrganismos	X	X	X			
Ensaio de antibiose <i>in vitro</i>	X	X				
Análise dos resultados		X	X			
Análises <i>in silico</i>			X	X		
Análise estatística				X	X	X
Escrita do trabalho					X	X

5. REFERÊNCIAS

- Bach, E., Seger, G. D. dos S., Fernandes, G. de C., Lisboa, B. B., & Passaglia, L. M. P. (2016). Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied Soil Ecology*, *99*, 141–149. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2015.11.002>
- Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., Van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic acids research*, *49*(W1), W29–W35. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB335>
- Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(5), 669–678. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2009.11.024>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, *71*(9), 4951–4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- de Weger, L. A., van der Bij, A. J., Dekkers, L. C., Simons, M., Wijffelman, C. A., & Lugtenberg, B. J. J. (1995). Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonads. *FEMS Microbiology Ecology*, *17*(4), 221–227. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.1995.TB00146.X>
- Del Frari, G., & Ferreira, R. B. (2021). Microbial Blends: Terminology Overview and Introduction of the Neologism “Skopobiota”. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 1745. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.659592/BIBTEX>
- Demain, A. L., & Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, *69*, 1–39. https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1/COVER

- Ferrarezi, J. A., Carvalho-Estrada, P. de A., Batista, B. D., Aniceto, R. M., Tschoeke, B. A. P., Andrade, P. A. de M., Lopes, B. de M., Bonatelli, M. L., Odisi, E. J., Azevedo, J. L., & Quecine, M. C. (2022). Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria from the Brazilian Amazon on the bacterial community associated with maize in field. *Applied Soil Ecology*, *170*, 104297. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2021.104297>
- Gerhardson, B. (2002). Biological substitutes for pesticides. *Trends in biotechnology*, *20*(8), 338–343. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02021-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02021-8)
- Gross, H., & Loper, J. E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural product reports*, *26*(11), 1408–1446. <https://doi.org/10.1039/B817075B>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *29*(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTT086>
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., & Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology* *2016 17:1*, *17*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13059-016-1103-0>
- Khan, M. Y., Nadeem, S. M., Sohaib, M., Waqas, M. R., Alotaibi, F., Ali, L., Zahir, Z. A., & Al-Barakah, F. N. I. (2022). Potential of plant growth promoting bacterial consortium for improving the growth and yield of wheat under saline conditions. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 3604. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.958522/BIBTEX>
- Patz, S., Gautam, A., Becker, M., Ruppel, S., Rodríguez-Palenzuela, P., & Huson, DH. (2021). PLABase: A comprehensive web resource for analyzing the plant growth-promoting potential of plant-associated bacteria. *bioRxiv*, 2021.12.13.472471. <https://doi.org/10.1101/2021.12.13.472471>
- Quecine, M. C., Kidarsa, T. A., Goebel, N. C., Shaffer, B. T., Henkels, M. D., Zabriskie, T. M., & Loper, J. E. (2016). An Interspecies Signaling System Mediated by Fusaric Acid Has Parallel Effects on Antifungal Metabolite Production by *Pseudomonas protegens* Strain Pf-5 and Antibiosis of *Fusarium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(5), 1372. <https://doi.org/10.1128/AEM.02574-15>
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU153>
- Sharrar, A. M., Crits-Christoph, A., Méheust, R., Diamond, S., Starr, E. P., & Banfield, J. F. (2020). Bacterial secondary metabolite biosynthetic potential in soil varies with phylum, depth, and vegetation type. *mBio*, *11*(3), 1–17. https://doi.org/10.1128/MBIO.00416-20/SUPPL_FILE/MBIO.00416-20-ST004.XLSX
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, *31*(19), 3210–3212. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTV351>
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moëne-Loccoz, Y., Muller, D., Legendre, L., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, *4*(SEP). <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>
- Vaser, R., Sović, I., Nagarajan, N., & Šikić, M. (2017). Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. *Genome research*, *27*(5), 737–746. <https://doi.org/10.1101/GR.214270.116>
- Welbaum, G. E., Sturz, A. V., Dong, Z., & Nowak, J. (2010). Managing Soil Microorganisms to Improve Productivity of Agro-Ecosystems. <https://doi.org/10.1080/07352680490433295>, *23*(2), 175–193. <https://doi.org/10.1080/07352680490433295>
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, *52*(Spec Issue), 487–511. https://doi.org/10.1093/JEXBOT/52.SUPPL_1.487

Piracicaba, 28 de Maio de 2023

Maria Carolina Quecine Verdi
Maria Carolina Quecine Verdi
Orientadora

Patrícia Perina de Oliveira
Patrícia Perina de Oliveira
Graduanda



COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP

CERTIFICAÇÃO DE DOCENTE

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

Piracicaba, 26 de maio de 2022.

Prof^a. Dr^a. Wanessa Melchert Mattos
Presidente da CEAP/ESALQ/USP