

GIOVANA DE SOUZA MAGNANI

**ANÁLISE DA BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS  
ENDOFÍTICAS DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR  
CULTIVADA NO NOROESTE DO PARANÁ**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica, Curso de Pós Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz

**Curitiba  
DEZ/2009**

Dedico esse trabalho ao meu filho Mateus e ao meu esposo Leonardo. O primeiro que me presenteia todas as manhãs e brinda todos os finais de tarde com o seu sorriso, carinho e encanto. Você e o seu papai fizeram nascer em mim os mais nobres sentimentos e me fizeram ver que posso muito mais do que eu imaginava.

## AGRADECIMENTOS

- À coordenação do curso de pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, em nome das professoras Leda Chubtasu e Maria Eugênia Duarte e posteriormente aos professores Miguel Nosedá e Leonardo Cruz, e ao colegiado desse Programa de Pós-graduação.

- À CAPES e ao CNPq.

- Ao Prof. Fabio de Oliveira Pedrosa, por permitir que eu trabalhasse em seu laboratório, pelo seu exemplo e pela análise desse trabalho.

- Aos meus orientadores professores Emanuel Maltempi de Souza e Leonardo Magalhães Cruz, pelas discussões, correções e por toda a atenção a mim dispensadas durante o Doutorado. Agradeço também pelo exemplo de pesquisadores sérios e competentes que vocês são para mim e para todos os seus alunos.

- Aos pesquisadores do Departamento de Fitotecnia do Setor de Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Prof. João Carlos Bernal, Prof. Edeuclaiton Davos, e Dr. Heroldo Weber. A esse último, por montar o experimento em Paranavaí e pelas coletas das plantas.

- Aos Funcionários e amigos D. Julieta, D. Roseli Prado e Valter Baura, funcionários e amigos queridos e em especial ao Valter pelas inúmeras reações de seqüenciamento corridas.

- À professora RoseAdele, pela amizade, pelas discussões nas reuniões de grupo e pelo empenho pessoal em me ajudar a construir as bibliotecas.

- À professora Maria Berenice, pela amizade e apoio, por sua dedicação ao laboratório e pela correção desse trabalho.

- À professora Cyntia Pichetch, pela amizade e incentivo ao meu trabalho e pela avaliação da tese.

- Aos amigos do grupo de discussão de Biodiversidade e Metagenômica, em especial ao Helisson, pelas discussões, trocas de experiências, por toda a paciência,

amizade e boa vontade a mim dedicadas. E, aos amigos Giovani, Rafael, Arnaldo e Vivian pelas discussões, pelo apoio e amizade.

- Aos colegas da sala 279, muitos passaram por lá...André Luiz, Marco Aurélio, Larissa (s), Ju Osaki e aos atuais Marco Antonio, Vivian, Fabi, Marina e Leandro. Obrigada pela amizade, pela paciência e pela torcida !!!!!

- Aos colegas da 275, Vânia, Giovana e Gus.

- Ao pessoal do Anexo: Michelle Sfeir, Tuca, Anelis, Arnaldo, Vivi, Stefania, Rafael Ioris, Daniela Seixas, Roseli Wassen, pelos empréstimos de cubas, fluxo, enzima, etc e por todo o carinho e amizade.

- Às amigas de coração, de luta, de lágrimas, e de muitos risos: Ju Inaba, Paty Castelen, Liziane, Tati Herrerias, Ana Helena, Fernanda Pacheco, Ana Claudia, Márcia Heidmann...Com vocês eu entendi que os frutos do doutorado não só os resultados mas também os fortes laços de amizade e companheirismo que aqui nascem e não se perdem jamais. Obrigada por tudo amigas. E aos meninos-irmãos de turma Marcelo Muller e Gustavo.

- Aos demais professores e amigos do Núcleo de Fixação de Nitrogênio, obrigada pelo carinho, pela torcida e pela amizade.

- Ao Prof. Humberto Madeira, por permitir que eu iniciasse os meus estudos de biologia molecular em seu laboratório e por incentivar o meu crescimento profissional.

- Aos meus pais, amados, dedicados, abençoados. Para fazer justiça à importância de vocês na minha vida e no meu trabalho, outra tese deveria ser escrita... em mais umas 100 páginas quem sabe eu conseguiria agradecer à altura do amor, da importância e da dedicação que vocês tiveram e tem comigo e com a minha família. Agradeço a Deus todos os dias por vocês existirem, por serem esses pais e avós tão doces, presentes e preocupados. Amo vocês.

- Aos meus irmãos queridos; a vida adulta, a nova família e os compromissos particulares tomam parte do nosso tempo, mas não desfazem a ligação que temos. Não

rompe o compromisso que espontaneamente assumimos um com o outro, de estarmos sempre ligados, torcendo um pelo outro, comemorando cada vitória pessoal como se fosse dos três. Obrigada pelo carinho, pelo apoio, pelas orações. Nem 10.000 km de distância vão romper isso. Amo vocês.

- Aos meus sogros e cunhados pelo apoio, pelas orações, pela torcida.

- Aos meus avós, pela torcida, carinho e orações constantes.

- Ao meu esposo e colaborador Leonardo, outra tese deveria ser escrita só para lhe agradecer...Você que foi que é o meu co-orientador, colaborador, amigo, super-pai, meu companheiro de dupla, tripla, quádrupla jornada... Obrigada pela dedicação, atenção, carinho e todo o amor dedicados a mim, a minha tese, ao nosso filho. Sem você nada seria possível, nada teria graça... Amo você.

- Ao meu filho, lindo, abençoado e amado. Obrigada por aceitar ficar com a vovó, ir para a escolinha, enquanto a mamãe trabalha. Você que mesmo antes de nascer já entendia de bactérias, clones e PCRs...Você é um anjinho na minha vida, um presente divino. Mamãe ama muito você e promete estar mais tranquila a partir de agora.

- A Deus, por me guiar e me abençoar. Obrigada por colocar todas essas pessoas no meu caminho e mostrar a importância de cada uma delas na minha vida através dos desafios e alegrias que surgiram durante esse período.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS .....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1 INTRODUÇÃO .....	15
1.1 BIODIVERSIDADE BACTERIANA .....	15
1.2 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS.....	18
1.3 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO.....	22
1.4 BACTÉRIAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR.....	24
1.5 MÉTODOS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA .....	25
1.5.1 GENES UTILIZADOS NA INFERÊNCIA FILOGENÉTICA .....	29
1.6 FILOGENIA DO DOMÍNIO BACTERIA .....	31
1.6.1 FILO PROTEOBACTERIA.....	34
1.6.1.1 CLASSE $\gamma$ -PROTEOBACTERIA .....	35
1.6.1.1.1 FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE.....	35
1.6.1.1.2 FAMÍLIA PSEUDOMONADACEAE.....	36
2 JUSTIFICATIVA.....	38
3 OBJETIVOS .....	39
3.1 OBJETIVO GERAL: .....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 ESTIRPE DE ESCHERICHIA COLI E PLASMÍDIO UTILIZADOS .....	40
4.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	40
4.2.1 ANTIBIÓTICOS .....	43
4.3 PLANTIO E COLETA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM PARANAÍ-PR.....	43
4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	48
4.5 EXTRAÇÃO DO DNA DE EXTRATOS DE COLMOS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	48

4.6 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS.....	49
4.7 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S RRNA A PARTIR DO DNA EXTRAÍDO DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	49
4.8 CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DOS GENES 16S RRNA.....	50
4.8.1 PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES .....	51
4.8.2 ELETROTRANSFORMAÇÃO BACTERIANA .....	51
4.8.3 COLETA DOS CLONES TRANSFORMANTES .....	52
4.8.4 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PLACAS DE 96 POÇOS .....	52
4.8.5 PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL EM COLUNA SEPHADEX G-50 .....	53
4.9 SEQUENCIAMENTO DE DNA PLASMIDIAL.....	54
4.10 ANÁLISES DE SEQUÊNCIA.....	55
4.10.1 PESQUISA DE HOMOLOGIA DE SEQUÊNCIA.....	57
4.10.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS .....	57
4.10.3 NOMENCLATURA DAS BIBLIOTECAS E DOS CLONES.....	58
4.11 ESTIMATIVAS DE DIVERSIDADE .....	59
4.11.1 COBERTURA DA BIBLIOTECA.....	59
4.11.2 CURVA DE RAREFAÇÃO E DO COLETOR .....	59
5 RESULTADOS .....	61
5.10 ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR POR MÉTODO INDEPENDENTE DE CULTIVO .....	61
5.10.1 COLETA DAS PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR VAR RB72454 .....	61
5.10.2 EXTRAÇÃO DE DNA DO MATERIAL VEGETAL .....	62
5.11 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S RRNA A PARTIR DO DNA EXTRAÍDO DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	64

5.12 CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DO GENE 16S RRNA AMPLIFICADO DE DNA EXTRAÍDO DE TECIDO DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	67
5.13 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL PARA SEQUENCIAMENTO .....	70
5.14 SEQUENCIAMENTO DAS BIBLIOTECAS DO GENE 16S RRNA.....	73
5.15 ESTATÍSTICAS DE SEQUENCIAMENTO .....	73
5.15.1 ANÁLISES DE QUALIDADE .....	77
5.16 COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS OBTIDAS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PRESENTES NA CANA DE AÇÚCAR COM BANCO DE DADOS ....	81
5.16.1 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE 16S RRNA DA AMOSTRA CA01 .....	81
5.16.1.1 ANÁLISE PELO PROGRAMA BLASTN .....	81
5.16.2 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S RRNA DA AMOSTRA CA22.....	85
5.16.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S RRNA DA AMOSTRA CA23.....	90
5.16.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S RRNA DA AMOSTRA CA62.....	91
5.16.5 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S RRNA DA AMOSTRA CA63.....	91
5.17 ANÁLISES FILOGENÉTICAS DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR OBTIDAS POR MÉTODO INDEPENDENTE DE CULTIVO .....	92
5.18 ESTIMATIVAS DE DIVERSIDADE .....	101
5.18.1 COBERTURA DA BIBLIOTECA.....	101
5.19 CURVA DE RAREFAÇÃO E CURVA DO COLETOR.....	101
5.20 ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR POR MÉTODO DEPENDENTE DE CULTIVO.....	104



5.20.1 ISOLAMENTO E CONTAGEM DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM CANA-DE-AÇÚCAR RB-72454 (AMOSTRA CA01).....	108
6 DISCUSSÃO.....	109
7 CONCLUSÕES.....	114
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	115
9 ANEXOS.....	128
10 ÍNDICE DOS ANEXOS .....	129

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 ÁRVORE FILOGENÉTICA REPRESENTANDO OS TRÊS DOMÍNIOS DA VIDA PROPOSTOS POR WOESE E COLABORADORES (1990).....	17
FIGURA 2 ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA MOLÉCULA DE 16S rRNA da bactéria <i>Escherichia coli</i> .....	30
FIGURA 3 ÁRVORE FILOGENÉTICA DO DOMÍNIO BACTERIA (KELLER E ZANGLER, 2004).....	33
FIGURA 4 VISTA DOS BLOCOS.....	45
FIGURA 5 VISTA DAS FILEIRAS DO BLOCO QUE NÃO RECEBEU ADUBAÇÃO.....	45
FIGURA 6 ETAPAS PARA DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	46
FIGURA 7 FLUXOGRAMA DAS ANÁLISES DE SEQUÊNCIA PARCIAIS DO GENE 16S rRNA .....	56
FIGURA 8 DNA EXTRAÍDO DAS AMOSTRAS DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	63
FIGURA 9 PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 27f-1492r DO GENE 16S rRNA DE EXTRATOS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	65
FIGURA 10 PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZANDO O PAR 27f-16S805r DE DNA EXTRAÍDO DE TECIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	66
FIGURA 11 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE PRODUTOS DE RESTRIÇÃO COM <i>EcoRI</i> DOS CLONES DE BIBLIOTECA CA22 DE 16S rRNA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	69
FIGURA 12 DNA PLASMIDIAL PURIFICADO PARA SEQUENCIAMENTO DA BIBLIOTECA CA22.....	71
FIGURA 13 DNA PLASMIDIAL DA BIBLIOTECA CA22 PURIFICADO POR GEL FILTRAÇÃO EM SEPHADEX G-50.....	72
FIGURA 14 DISTRIBUIÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE SEQUÊNCIA .....	78
FIGURA 15 DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS SEQUÊNCIAS COM VALOR DE PHRED >20 .....	79

FIGURA 16 DISTRIBUIÇÃO SEQUÊNCIAS DE ACORDO COM VALOR PHRED DE QUALIDADE .....	80
FIGURA 17 ALINHAMENTO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DOS GENES DE 18S RRNA DE MITOCÔNDRIA DE <i>SORGHUM BICOLOR</i> E DE 16S RRNA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	87
FIGURA 18. ANÁLISE FILOGENÉTICAS DAS SEQUÊNCIAS DOS CLONES DAS BIBLIOTECAS DE 16S rRNA DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	94
FIGURA 19 ANÁLISE FILOGENÉTICAS DAS SEQUÊNCIAS DOS CLONES DAS BIBLIOTECAS DE 16S rRNA DE COMO DE CANA-DE-AÇÚCAR IDENTIFICADOS COMO ENTEROBACTÉRIAS.....	96
FIGURA 20 ANÁLISE FILOGENÉTICAS DAS SEQUÊNCIAS DOS CLONES DAS BIBLIOTECAS DE 16S rRNA DE COMO DE CANA-DE-AÇÚCAR IDENTIFICADOS COMO DA FAMÍLIA PSEUDOMONADACEAE.....	98
FIGURA 21 ANÁLISE FILOGENÉTICAS DAS SEQUÊNCIAS DOS CLONES DAS BIBLIOTECAS DE 16S rRNA DE COMO DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	100
FIGURA 22 CURVA DE RAREFAÇÃO DA BIBLIOTECA DE GENES 16S rRNA DA AMOSTRA CA0101.....	102
FIGURA 23 CURVAS DO COLETOR DA BIBLIOTECA DE GENES 16S rRNA DA AMOSTRA CA0101.....	103
FIGURA 24 ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR IDENTIFICADOS COMO DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE.....	107

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 PRINCIPAIS TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS NO ESTUDO DA DIVERSIDADE BACTERIANA .....	28
TABELA 2 GÊNEROS ENCONTRADOS NAS DIFERENTES CLASSES DAS PROTEOBACTÉRIAS.....	34
TABELA 3 ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS.....	43
TABELA 4 INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rRNA.....	50
TABELA 5 AMOSTRAS DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZADAS PARA AS ANÁLISES DE DIVERSIDADE .....	62
TABELA 6 BIBLIOTECAS DO GENE 16S rRNA AMPLIFICADO DE DNA EXTRAÍDO DE TECIDO DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	68
TABELA 7 NÚMERO DE CLONES SUBMETIDOS AO SEQUENCIAMENTO POR BIBLIOTECA .....	73
TABELA 8 RESUMO DO SEQUENCIAMENTO DAS BIBLIOTECAS DO GENE 16S rRNA.....	75
TABELA 9 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR DA AMOSTRA BIBLIOTECA CA01 COM BASE NA SEQUÊNCIA DO GENE 16S RRNA.....	83
TABELA 10. IDENTIFICAÇÃO COM BASE NA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR BIBLIOTECA CA0115.....	84
TABELA 11 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DA AMOSTRA CA22.....	85
TABELA 12 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DA AMOSTRA CA23.....	90
TABELA 13 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DA AMOSTRA CA62.....	91
TABELA 14 RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DA AMOSTRA CA63.....	92
TABELA 15 RESULTADOS DA BUSCA POR IDENTIDADE DE SEQUÊNCIAS REALIZADA PELO PROGRAMA BLAST <sub>n</sub> DAS SEQUÊNCIAS ISOLADAS DE CANA-DE- AÇÚCAR.....	106

## RESUMO

Bactérias endofíticas são encontradas no interior dos tecidos da maioria das espécies de plantas e podem trazer benefícios, como fixação de nitrogênio, produção de fitormônios e controle biológico de patógenos. No presente trabalho a diversidade bacteriana endofítica da cana-de-açúcar foi analisada por métodos independentes de cultivo e comparada com aquela previamente obtida através de metodologia dependente de cultivo. Os colmos de plantas vindas da Estação Experimental da UFPR localizada em Paranavaí foram externamente desinfectados, macerados e usados para a extração de DNA. O DNA purificado foi utilizado como molde para a amplificação do gene 16S rRNA utilizando os conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores 27f e 16805r e 27f e 1492r. Esses pares amplificam, respectivamente, a porção inicial (800 pb) e todo o gene 16S rRNA (1500 pb). Os amplicons foram então clonados no vetor PCR 2.1. Dois mil cento e doze clones foram coletados e os insertos de 866 clones foram sequenciados e analisados. A maioria das sequências apresentou alta identidade (mais que 91%) com sequências do gene 16S rRNA do filo Proteobacteria. Uma alta prevalência de representantes da classe  $\gamma$ -Proteobacteria foi observada, com dominância das famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae. Dentro das enterobactérias, foram encontradas bactérias relacionadas aos gêneros *Enterobacter* sp, *Pantoea* sp, *Klebsiella* sp, *Serratia* sp e *Citrobacter* sp. A família Pseudomonadaceae foi representada pelo gênero *Pseudomonas* sp. Apenas seis sequências foram identificadas como  $\alpha$ -Proteobacteria e uma como  $\beta$ -Proteobacteria. Vinte e duas sequências apresentaram alta identidade com genes 16S rRNA de bactérias não-cultivadas, mas foram re-classificadas como Enterobactérias. Resultados semelhantes foram observados com os métodos dependentes de cultivo. Esses resultados revelam uma diversidade diferente da classicamente observada em cana-de-açúcar, mostrando que há nessa planta um potencial reservatório de organismos ainda a ser explorado e que, a comunidade bacteriana endofítica pode variar de acordo com o genótipo da planta analisada e também com sua localização geográfica.

## ABSTRACT

Endophytic bacteria are found in inner tissues of most plant species and can promote benefits such as nitrogen fixation, phytohormone production and biological control of pathogens. In the present work the bacterial diversity of sugarcane endophytes was analyzed by cultivation-dependent and independent methods. Stem of sugarcane from a commercial crop located in the Northwest of the Parana state (Brazil) was externally disinfested, ground and subjected to DNA extraction. The purified DNA was used as a template for amplification of the 16S rRNA gene using primers 27f and 805r and 27f and 1492r. The amplicons were then cloned into the pCR 2.1 vector. Two thousand and one hundred twelve clones were collected, and the inserts of 866 clones were sequenced and analyzed. The majority (99%) of the sequences were similar (more than 91% identity) to Proteobacteria 16S rRNA gene. The highest prevalence were of representatives of the gamma-Proteobacteria such as from Pseudomonadaceae and Enterobacteriaceae families. Among the latter were found the genera *Enterobacter* sp, *Pantoea* sp, *Klebsiella* sp, *Serratia* sp and *Citrobacter*. The Pseudomonadaceae family was represented by *Pseudomonas* genus. Sequences with high identity to the alpha-Proteobacteria *Devosia* sp, *Roseomonas* sp, *Asaia* sp and the beta-Proteobacteria *Alcaligenes* sp were also found. Twenty-two sequences showed high identity with sequences from uncultured bacteria but they were classified as Enterobacteriaceae. Similar results were observed with the culture-dependent method. The results reveal a rich diversity of bacteria in the stem of healthy sugarcane, with some taxons not described in this plant yet.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 BIODIVERSIDADE BACTERIANA

O termo biodiversidade diz respeito à organização biológica como um todo, abrangendo um nível que vai do macroscópico ao molecular. Essa definição inclui a variedade de espécies nos ecossistemas (riqueza), variabilidade genética dentro de cada espécie (conjunto de genes em uma determinada espécie) e sua relativa abundância das espécies no seu habitat natural (SPANGENBERG, 2007).

O termo biodiversidade esteve por muito tempo diretamente relacionado às espécies vegetais existentes nos ecossistemas de florestas, à diversidade de espécies de insetos e também muito ligada às questões da diminuição da biodiversidade pelos processos de desmatamento e aquecimento global. Organismos procarióticos eram pouco considerados nesse contexto. Com os trabalhos de Woese e colaboradores na década de 90, as bactérias ganharam maior evidência, constituindo uma das três divisões nas quais todos os seres vivos foram re-classificados (WOESE et al., 1990). Essa nova proposta de classificação foi feita baseada em dados moleculares e não morfológicos. Atualmente, técnicas de Biologia Molecular que permitem a extração e sequenciamento de DNA diretamente de amostras ambientais permitem o estudo da comunidade microbiana dependente ou não de cultivo, estendendo o termo biodiversidade também para este grupo de organismos.

Uma estimativa da diversidade microbiana é essencial para o entendimento da função dos microrganismos nos ecossistemas (OVREAS e TORSVIK, 1998). Entender essa função se faz necessário porque muitos dos processos ambientais que sustentam a vida no planeta, tais como ciclagem de nutrientes, fixação de carbono e de nitrogênio, decomposição de matéria orgânica, entre outros, são realizados com a participação

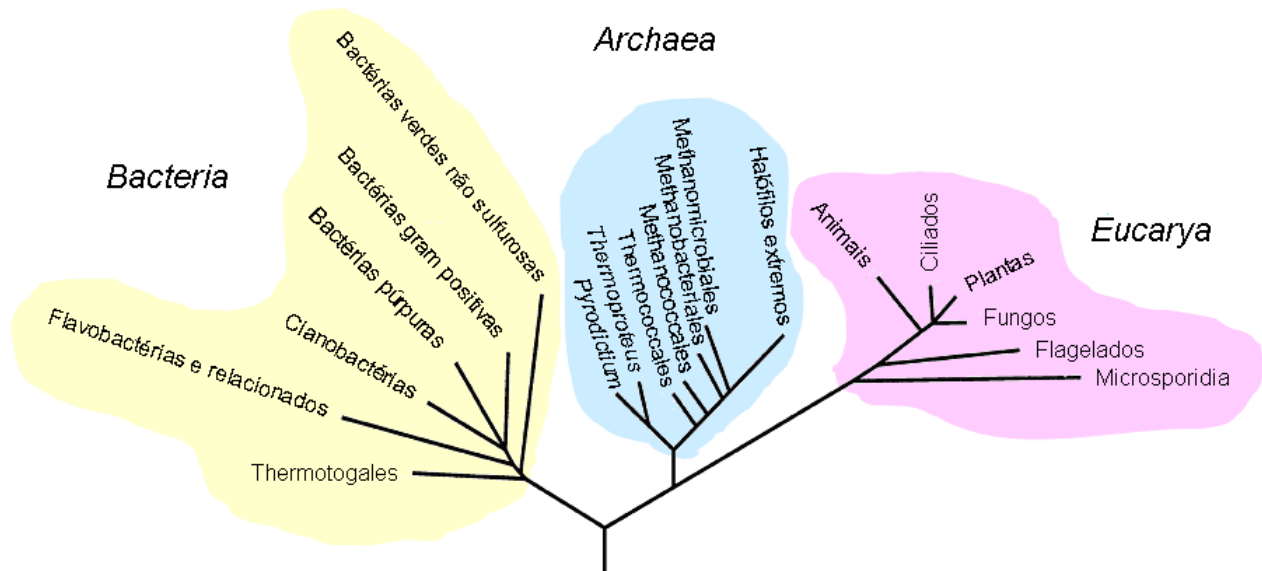
indispensável dos microrganismos (DÖBEREIBER 1992, BEL et al., 2005).

Um dos aspectos mais notáveis das bactérias é a sua onipresença. Elas colonizam uma grande variedade de habitats, daqueles que oferecem condições brandas e ricas em nutrientes até os mais extremos. Elas habitam solos, lagos, oceanos, outros organismos, fontes termais (com temperaturas perto do ponto de ebulição) e também são encontradas no fundo de geleiras e quilômetros abaixo da superfície terrestre (LOVELAND-CURTZE et al., 2009).

Há quase duas décadas atrás era impossível acessar essa diversidade microbiana. Porém, com o desenvolvimento de técnicas de identificação molecular independente de cultivo e o uso de moléculas que funcionam como marcadores evolucionários os estudos de diversidade de microrganismos tornou-se viável e vem contribuindo enormemente para o conhecimento do papel dos microrganismos no ecossistema e para sua taxonomia. Os 5 reinos (Animalia, Plantae, Fungi, Protista e Monera) propostos seguindo a taxonomia Lineana tradicional, baseada em dados morfológicos e fisiológicos (WHITTAKER, 1969) foram divididos em três grandes grupos taxonômicos (Domínios), Archaea, Bacteria e Eucarya, dentre os quais os dois primeiros são procariotos: Bacteria e Archaea (Figura 1). Essa nova divisão taxonômica traz a tona uma nova perspectiva: a maior parte da diversidade genética do planeta vem das formas de vida microscópicas (HUGENHOLTZ e PACE, 1996).



FIGURA 1. ÁRVORE FILOGENÉTICA REPRESENTANDO OS TRÊS DOMÍNIOS DA VIDA PROPOSTOS POR WOESE E COLABORADORES (1990)



Árvore filogenética universal modificada mostrando os três domínios. O comprimento e ordem dos ramos são baseados em comparação de seqüências do gene 16S rRNA. A posição da raiz foi determinada ao se comparar seqüências de pares de genes parálogos que divergiram antes que as linhagens primárias emergissem de sua condição ancestral comum.

Os microrganismos procariotos (Bactéria e Arqueobactérias) apresentam uma grande diversidade genética e desempenham funções cruciais na manutenção dos ecossistemas, sendo componentes fundamentais de cadeias alimentares (MYERS, 1996). São considerados também como verdadeiros reservatórios para o descobrimento de novas drogas e processos metabólicos (CURTIS & SLOAN, 2005).

Ao estimar o número total de procariotos no planeta ( $4-6 \times 10^{30}$  células) e a quantidade total de seu carbono celular ( $355-550 \times 10^9$  toneladas), Whitman e colaboradores especularam que a quantidade total de carbono estocada em todas as células procarióticas na Terra correspondem à 60-100% do carbono total estimado como presentes nos vegetais (WHITMAN et al., 1998). A extrapolação de resultados obtidos em vários estudos sugere que 1 grama de solo contém cerca de 10 bilhões de

procariotos pertencentes a milhares de espécies diferentes (ROSSELÓ-MORA e AMANN, 2001).

Apesar da sua importância a diversidade e ecologia microbiana são pouco conhecidas. Estima-se que grande parte dos microrganismos que existem na natureza não possam ser cultivados pelos métodos tradicionais (AMANN et al., 1995). Como os métodos de classificação microbiana clássicos requerem o isolamento e cultivo do microrganismo, a maioria das espécies bacterianas são formalmente desconhecidas. Conforme já mencionado, técnicas que permitam a identificação dos microrganismos sem a necessidade de cultivo tem sido desenvolvidas e amplamente utilizadas para esse fim (AMANN et al., 1995).

## 1.2 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

As plantas são responsáveis por parte da fixação de CO<sub>2</sub> atmosférico na Terra, que é feita também por algas e bactérias fotossintetizadoras. A energia solar capturada pelas plantas as habilita a reduzir o carbono contido no CO<sub>2</sub> e a sintetizar compostos orgânicos. Por isso, os seres fotossintetizadores representam as maiores fontes de carbono, nitrogênio e energia para os microrganismos heterotróficos.

Em particular, plantas são bastante atrativas como fontes de nutrientes para as bactérias (VANDENKOORNHUYSE et al., 2007), constituindo um verdadeiro ecossistema microbiano. Os diferentes nichos das plantas hospedeiras como a superfície de raízes e folhas e o interior de diversos tecidos vegetais podem ser ocupados por bactérias.

Entretanto, para a maioria das bactérias, o interior e mesmo o exterior das plantas são territórios proibidos por conta dos compostos antimicrobianos como terpenóides, benzoxazinona e particularmente flavonóides e isoflavonóides, que são produzidos (principalmente pelas raízes) (BAIS et al., 2006). Bactérias endofíticas são

definidas como aquelas que vivem no interior das plantas sem causar danos visíveis (HALLMANN et al., 1997). Essas bactérias conseguem penetrar na planta, em geral através das raízes, mas também pelos estômatos e pelas partes aéreas, como as flores, caules e cotilédones. Uma vez dentro da planta, podem colonizar o entorno ponto de entrada ou se dispersar de forma sistêmica (HALLMANN et al. 1997; ZINNIEL et al., 2002). Estes microrganismos parecem penetrar ativamente nos tecidos de plantas usando enzimas hidrolíticas, como celulasas e pectinases, além de usarem aberturas naturais devido ao crescimento da planta ou provocadas por injúrias (QUADT-HALLMANN et al., 1997) .

Sob o aspecto fisiológico, a colonização dos tecidos internos das plantas por bactérias endofíticas confere vantagens sobre outros microrganismos, pois estes passam a viver em um ambiente mais protegido e são menos afetados pelos efeitos de extremos de temperatura, potencial osmótico e radiação ultravioleta (LODEWYCKX et al., 2002).

As bactérias endofíticas têm despertado atenção devido ao seu potencial para aplicações biotecnológicas (HALLMANN et al., 1997). Mecanismos diretos de promoção de crescimento vegetal podem envolver a produção de como postos como auxinas, citocininas e giberelinas, supressão de estresse por etileno produzido pela atividade da 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACC), fixação de nitrogênio e mobilização de nutrientes indisponíveis como fósforo e outros nutrientes minerais. Endófitos podem também promover indiretamente o crescimento vegetal ao prevenir a colonização por patógenos competindo pelo espaço e nutrientes com eles, produzindo enzimas hidrolíticas, por antibiose, indução de mecanismos de defesa da planta e através da inibição de enzimas ou toxinas produzidas pelos patógenos (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Assim as bactérias endofíticas podem atuar como antagonistas, ou seja, podem interferir na infecção, crescimento e sobrevivência de um determinado patógeno

(CHERNIN et al., 1995). Espécies de *Pseudomonas* podem suprimir a infecção por *Ralstonia solanacearum* em berinjela (RAMESH et al., 2008); *Gluconacetobacter diazotrophicus*, um endófito de cana-de-açúcar, produz uma bacteriocina contra o patógeno *Xanthomonas albilineans* (PINON et al., 2002), além de fixar nitrogênio e produzir o fitormônio ácido indol acético (AIA). Estirpes de *Bacillus* sp induzem resistência sistêmica contra patógenos em diversas plantas (CHOUDHARY e JOHRI, 2008). Estirpes de *Azospirillum brasilense* promovem o crescimento vegetal através da produção de hormônios vegetais como ácido abscísico, giberelina e ácido indol acético (PERRIG et al., 2009).

A fixação de nitrogênio é outra contribuição importante das bactérias endofíticas. Gramíneas de importância econômica, tais como cana-de-açúcar, arroz, trigo, sorgo, milho foram identificados com hospedeiros de diversas espécies de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio sendo as principais *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp. e *Azospirillum* spp (JAMES e OLIVARES, 1997; BALDANI et al., 1997; JAMES 2000; BODDEY et al. 2003).

Outras contribuições das bactérias endofíticas são: 1) produção de sideróforos, observada em bactérias endofíticas isoladas de nabo (*Brassica napus*), (SHEN et al. 2008), 2) a capacidade de solubilizar fosfatos (ROSENBLUETH e MARTÍNEZ-ROMERO, 2006) e 3) conferir à planta resistência a estresses (HALLMANN, 1997).

Em geral as densidades populacionais das bactérias endofíticas são menores que as de patógenos e bactérias da rizosfera (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). A densidade populacional dos endofíticos é altamente variável, dependendo principalmente das espécies bacterianas e genótipo do hospedeiro, e também do estágio de desenvolvimento do hospedeiro, densidade do inóculo e condições ambientais (PILLAY e NOWAK, 1997; TAN et al., 2003). Muitos fatores, como a rotação de culturas, condições do solo e população de fitopatógenos podem

influenciar a estrutura da população das bactérias endofíticas (CHO et al., 2007).

O início dos estudos com bactérias endofíticas é controverso. Em 1984, BECKING isolou endofíticos de nódulos de raízes de plantas da família Rosaceae e identificou as características morfológicas de espécies de *Frankia* através de microscopia eletrônica de transmissão (BECKING, 1984). Nos anos seguintes diversos autores investigaram a diversidade de bactérias endofíticas utilizando técnicas como morfologia das culturas bacterianas e microscopia de transmissão (DONG et al., 1994), análise dos ácidos graxos celulares (FAME) e testes bioquímicos por meio de crescimento com diferentes fontes de carboidrato, presença de determinadas enzimas) (GERMIDA et al., 1998). No decorrer da década de 1990, após o trabalho de WOESE, os pesquisadores começaram a utilizar a abordagem molecular nos estudos de diversidade (HUGENHOLTZ, et. al., 1996; KIRCHHOF et al., 1996; LUDWIG & SCHLEIFER, 1994). Recentemente, a diversidade endofítica bacteriana de uma grande variedade de plantas tem sido analisada utilizando principalmente as técnicas moleculares. MOCALI e colaboradores (2003) pesquisaram a diversidade endofítica em *Ulmus* spp. utilizando seqüenciamento do gene 16S rRNA e ARDRA (análise de restrição de DNA ribossomal amplificado), e encontraram representantes dos gêneros *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Enterobacter* e *Staphylococcus*.

Em três variedades diferentes de batata foram encontrados representantes das classes  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -Proteobacteria (BERG et al., 2004; SESSITCH et al., 2002). As técnicas moleculares permitiram a descrição de bactérias endofíticas também em soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004), plantas cítricas (ARAUJO et al., 2002), arroz (VERMA et al., 2001; CHAINTREUL et al., 2000) e trigo (CONN e FRANCO, 2004).

Em colmos e raízes de arroz a diversidade de bactérias e de actinobactérias endofíticas foi analisada por métodos dependentes e independentes de cultivo, e sequenciamento do gene 16S rRNA de isolados e RFLP (TIAN et al., 2007,

SUN et al., 2008).

### 1.3 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é um elemento químico fundamental na formação de biomoléculas como proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos. Porém a maior parte do nitrogênio está na forma gasosa ( $N_2$ ), inerte para vegetais e animais. Na natureza a incorporação do nitrogênio ao ecossistema é feita principalmente pelas bactérias fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas (POSTGATE, 1982). A fixação biológica de nitrogênio tem importância ecológica, pois representa um aporte de nitrogênio fixado em muitos habitats terrestres e aquáticos.

As bactérias diazotróficas ocupam nichos distintos, podendo ser de vida livre, associativas e simbióticas. As bactérias diazotróficas associativas foram inicialmente isoladas da rizosfera e do rizoplano de uma grande variedade de plantas não-leguminosas. Porém, algumas evidências posteriores indicam que bactérias diazotróficas podem colonizar tecidos vegetais internos, principalmente de gramíneas, sendo, portanto bactérias endofíticas (OLIVARES et al., 1996; URETA et al., 1995). As bactérias endofíticas diazotróficas estabelecem associação com diversas espécies de planta e fixam nitrogênio de maneira mais eficiente que os diazotrofos associados à rizosfera (DÖBEREINER, 1992).

Bactérias fixadoras de nitrogênio são encontradas em gramíneas de importância econômica, tais como cana-de-açúcar, arroz, trigo, sorgo, milho e algumas forrageiras (JAMES e OLIVARES, 1997, JAMES 2000) e também em plantas como abacaxizeiros e bananeiras (CRUZ et al., 2001), entre outras.

A contribuição da fixação biológica de nitrogênio por bactérias endofíticas em cana-de-açúcar é responsável por até 60% do total de nitrogênio acumulado (URQUIAGA et al., 1992). Porém, essa contribuição parece estar relacionada ao

genótipo do hospedeiro (URQUIAGA et al., 2003, COELHO et al., 2003). Grande parte das evidências da contribuição da fixação biológica de nitrogênio pelas bactérias endofíticas vem de estudos com balanço de N, diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  e abundância natural de  $^{15}\text{N}$  em plantas de cana-de-açúcar, arroz e “kallar grass”, que podem obter o nitrogênio que necessitam através da fixação biológica de nitrogênio (JAMES, 2000).

Diazotróficos endofíticos melhor estudados estão distribuídos entre os gêneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (BALDANI et al., 1997). Muitas enterobactérias possuem a capacidade de fixar nitrogênio também e as mais relacionadas com essa atividade são estirpes de *Enterobacter* sp, *Klebsiella* sp, *Citrobacter* sp (KENNEDY et al., 2004; ROESCH et al., 2008; RENNIE 1982).

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria endofítica diazotrófica que foi isolada inicialmente de raízes de milho, sorgo e arroz em 1984, e coloniza raízes, colmos, folhas e sementes de cana-de-açúcar, plantas forrageiras, cereais e palmeiras (BALDANI et al., 1984; BALDANI et al., 1986; REIS et al., 2000).

O gênero *Azospirillum* possui diversas espécies fixadoras de nitrogênio, que podem ser de vida livre ou endofíticas, estão distribuídos em quatorze espécies: *A. brasilense* (TARRAND et al., 1979), *A. lipoferum*, *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1984), *A. canadense* (MEHNAZ et al., 2007), *A. melinis* (PENG et al., 2006), *A. oryzae* (XYE e YOKOTA 2005), *A. picis* (LIN et al., 2009), *A. rugosum* (YOUNG et al. 2008), *A. zea* (MEHNAZ et al., 2007), *A. irakense* (KAMMAS et al., 1989), *A. halopraeferans* (REINHOLD et al. 1987), *A. largomobile* (BEN DEKHIL et al., 1997), *A. largimobile* (BEN DEKHIL et al., 1997) e *A. doebereineriae* (ECKERT et al., 2001). As espécies de *Azospirillum*, principalmente *A. brasilense* e *A. lipoferum* (TARRAND et al., 1978) tem sido isoladas de cereais (milho, trigo, arroz e sorgo), gramíneas forrageiras, cana-de-açúcar, palmeiras oleaginosas e plantas tuberosas, a partir de tecidos da raiz, caule, folhas, tubérculos, do interior do xilema e de frutos e sementes, principalmente em

regiões tropicais (BALDANI et al., 1997).

*Gluconacetobacter diazotrophicus* foi isolada dos tecidos de cana-de-açúcar, e tem recebido especial atenção como um potencial contribuinte para a fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar brasileira (BODDEY et al., 1995). Essa bactéria também já foi isolada de plantas de café (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997).

*Burkholderia* inclui 66 espécies e constitui um dos grupos de diazotróficos mais recentemente descobertos. Incluem-se várias espécies fixadoras de nitrogênio: *Burkholderia silvatlantica* (PERIN et al., 2006), *B. vietnamiensis*, isolada de rizosfera de arroz cultivadas no Vietnã (GILLIS et al., 1995), *B. kururiensis* (ZHANG et al., 2000).

#### 1.4 BACTÉRIAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar pertence à família Poaceae, uma das maiores famílias da classe das angiospermas (JOLY, 1993). Essa cultura é uma das mais importantes do Brasil, o maior produtor mundial. A produção brasileira de açúcar em 2007-2008 foi de aproximadamente 490 milhões de toneladas. O Paraná é o segundo maior produtor brasileiro, atrás apenas de São Paulo (<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica>).

Além dos produtos açúcar, álcool e aguardente, os subprodutos da cana (bagaço, vinhaça e torta de filtro) são de grande importância socioeconômica e são insumos para produção de energia, ração animal, aglomerados, fertilizantes etc (<http://www.alcopar.org.br/produtos/subprodutos.php>).

Devido à grande importância da cultura da cana-de-açúcar, é essencial aumentar a sua produtividade e/ou diminuir o custo de produção. Um dos fatores que pode levar a um aumento de produtividade é o controle ou erradicação de microrganismos que possam provocar doenças à planta, podendo esses microrganismos ser vírus, fungos ou bactérias, além da fixação biológica de nitrogênio.



O estudo de bactérias associadas à cana-de-açúcar sempre esteve relacionado às bactérias fixadoras de nitrogênio. Em 1958, DÖBEREINER e RUSCHEL isolaram a bactéria *Beijerinckia fluminensis* da rizosfera de cana-de-açúcar (DÖBEREINER e RUSCHEL, 1958). Outros autores também estudaram endófitos utilizando meios seletivos para organismos fixadores de nitrogênio (CABALLERO-MELLADO E MARTINEZ-ROMERO, 1994; OLIVARES, 1996, ELBELGATY, 2001 LOIRET, 2004). Porém, em 2001, SUMAN e colaboradores analisaram 22 isolados endofíticos de raízes de cana-de-açúcar da Índia e encontraram representantes diazotróficos e não diazotróficos. Estes mesmos autores mostraram que apenas uma pequena fração dos endófitos de cana é formada por fixadores de nitrogênio. Em 2005 foram analisados isolados endofíticos de cana-de-açúcar através de tipagem bioquímica e molecular. Estes isolados foram classificados predominantemente junto às  $\gamma$ -Proteobacteria (MAGNANI, 2005).

### 1.5 MÉTODOS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Taxonomia é a ciência da classificação dos organismos, ou seja, a ciência de ordená-los em grupos com base em suas características comuns (BUSSE et al., 1996). Desde a década de 1920, bactérias são classificadas taxonomicamente através de testes bioquímicos, nutricionais e fisiológicos (BUSSE et al., 1996). Estes métodos avaliam, entre outros parâmetros, características morfológicas, composição química da parede celular, a capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono e a presença de determinadas enzimas. De forma geral, a semelhança de fenótipos era usada para agrupar os diferentes organismos em grupos relacionados e, portanto, para definir sua classificação taxonômica.

Segundo OLSEN e WOESE, 1993, uma vez que os organismos são produtos da evolução, é necessário conhecer a sua história evolutiva para entender e defini-los

em termos biológicos. Entretanto, morfologia bacteriana, fisiologia e as demais propriedades citadas não são informativas o suficiente para serem usadas como marcadores filogenéticos (LUDWIG e SCHLEIFER, 1994), uma vez que determinada característica fenotípica pode ter-se originado de uma forma independente ou ter sido adquirida por transferência lateral. Atualmente, é senso comum que a sistemática bacteriana deve utilizar critérios moleculares além dos fenotípicos para identificação e classificação (WOESE, 1990). Para tanto, tem-se usado moléculas denominadas de marcadores moleculares que refletem não só a semelhança genotípica entre diferentes bactérias, mas podem descrever a história evolutiva comum, permitindo sua classificação a partir de critérios filogenéticos. Marcadores moleculares são genes ou sequências de DNA que podem ser usadas para identificar um organismo, espécie, estirpe ou característica fenotípica (WOESE, 1987).

O uso de marcadores em sistemática foi primeiramente introduzido por Zuckerkandl e Pauling em 1965 em seu artigo intitulado “Moléculas como documentos da história evolutiva”. Sequências de moléculas são documentos da história evolutiva porque elas são lineares e contêm de dezenas a milhares de caracteres mais ou menos independentes (WOESE, 1991). Como há um número enorme de possíveis sequências de uma dada composição ou tamanho, a similaridade de sequências indica uma origem comum das moléculas ou genes. O número e natureza das diferenças nas sequências do mesmo marcador molecular em diferentes organismos refletem o curso da evolução e podem ser usados para a reconstrução de genealogias moleculares (LUDWIG & SCHLEIFER, 1994).

Para este fim, o marcador molecular deve ter as seguintes características: a) estar presente em todos os organismos do grupo estudado; b) ser funcionalmente homólogo nos diferentes organismos; c) o alinhamento de suas seqüências deve ser possível para permitir a identificação de regiões conservadas e não-conservadas; d) sua sequência deve ter uma taxa de mutação definida para permitir inferir o padrão

temporal de divergência entre os organismos (MADIGAN et al.,1997). Estes critérios têm o objetivo de garantir que a similaridade entre as sequências aponta para uma origem comum e possa servir de critério de comparação entre os organismos (LUDWIG & SCHLEIFER, 1994).

Um marcador molecular ideal funciona como um “relógio molecular”, acumulando mudanças aleatoriamente ao longo do tempo. Conseqüentemente, o número de mudanças poderia ser usado para medir o tempo de divergência entre esse organismo e seu ancestral comum. Se essas mudanças são neutras e independentes do fenótipo, a mudança contida no genoma dá ao pesquisador a capacidade de inferir filogenia (WOESE 1987).

Baseando-se na utilização dos marcadores moleculares, métodos de DNA recombinante e de filogenia molecular têm sido utilizados como meios de estabelecer relações evolutivas entre bactérias que ocorrem em ambientes naturais e até mesmo aquelas não cultiváveis (HUGENHOLTZ & PACE, 1996; WISE et al., 1997). Estas técnicas permitem a determinação da diversidade microbiana em diferentes ecossistemas, como solos, ambientes aquáticos e tecidos de plantas (FELSKE et al., 1998; FRANKLIN et al., 1999; CHELIUS & TRIPLETT, 2001; SESSITSCH et al., 2002; CONN & FRANCO, 2004). Um fato importante nesse contexto foi o desenvolvimento da técnica da PCR (SAIKI et al., 1988), que permitiu o aparecimento de vários métodos para a análise da comunidade microbiana (TABELA 1).

TABELA 1. PRINCIPAIS TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS AO ESTUDO DA DIVERSIDADE BACTERIANA QUE UTILIZAM A PCR

NOME DA TÉCNICA	SIGNIFICADO	INDICAÇÕES DE USO
Clonagem e sequenciamento	Clonagem de produtos de PCR e posterior sequenciamento dos insertos	Quando o posicionamento filogenético é relevante e o sequenciamento em larga escala é possível
ARDRA	Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado	Para comparações de comunidades simples ou para triagem de clones para posterior sequenciamento
ARISA	Análise da região espaçadora intergênica ribossomal	Para resolver sutis diferenças entre espécies
T-RFLP	Análise do polimorfismo do fragmento de restrição	Para comunidades com grande riqueza de espécies e para estudos com grande número de amostras
DGGE	Eletroforese em gel com gradiente desnaturante	Para comunidades com um número limitado de membros abundantes.
SSCP	Polimorfismo de Conformação de Fita Simples	Quando uma alta sensibilidade é desejada
DHPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance Desnaturante	Análise rápida após uma otimização inicial
TGGE	Eletroforese em gel com gradiente de temperatura	As indicações são as mesmas do DGGE

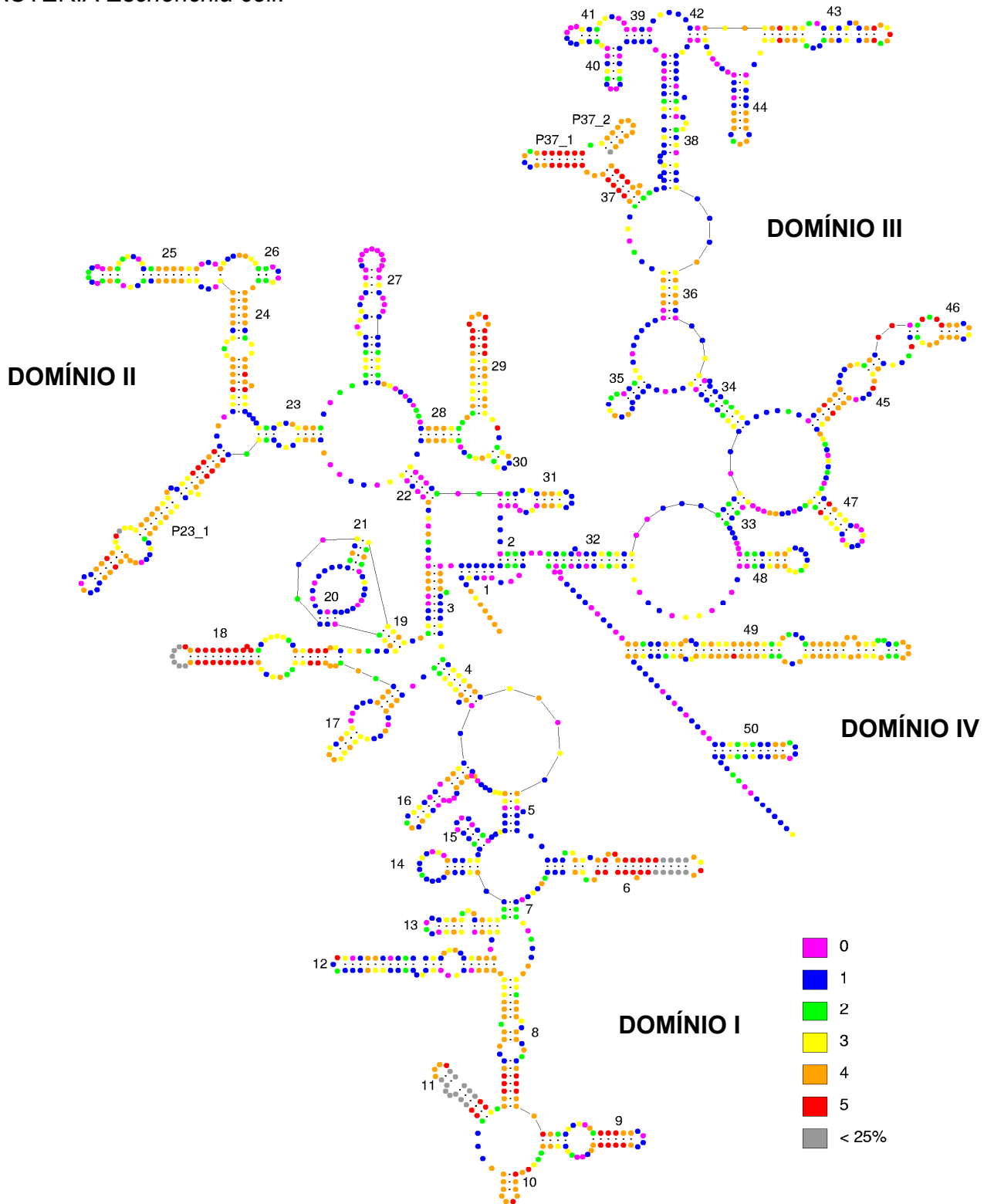
Fonte: NOCKER et al., 2007

### 1.5.1 Genes utilizados na inferência filogenética

As sequências de rRNAs ocupam uma posição central no estudo da evolução e ecologia dos microrganismos (FOX, PECKMAN e WOESE, 1977). Os RNAs ribossomais são moléculas antigas, funcionalmente constantes, universalmente distribuídas entre os organismos e moderadamente bem conservadas. Diferentes posições em suas sequências mudam a diferentes taxas, o que permite a inferência filogenética. Uma vez que o número de sequências possíveis de RNA ribossomal seja grande, a similaridade entre duas sequências indica alguma relação filogenética entre elas (MADIGAN et al., 1997). As seqüências de rRNA contêm domínios altamente conservados, intercalados com regiões variáveis (HEAD et al., 1998), o que torna a comparação de sequência de rRNA uma ferramenta importante para deduzir relações filogenéticas e evolutivas entre os organismos (WOESE et al., 1987). Na figura 2 está a estrutura secundária da molécula de 16S rRNA de *E. coli*, mostrando os diferentes domínios existentes na molécula e a variabilidade em cada nucleotídeo dessa molécula.

O método original de análise consistia na extração de rRNA de culturas puras seguido por análises comparativas realizadas com o uso dos catálogos de oligonucleotídeos produzidos por digestão do gene para o 16S rRNA com a ribonuclease T1 (FOX, PECKMAN e WOESE, 1977). Atualmente, análises comparativas da estrutura primária dos genes de rRNA transformaram a taxonomia microbiana de um simples sistema de identificação para um sistema baseado na história evolutiva dos organismos (OLSEN, WOESE e OVERBEEK, 1994). PACE e colaboradores (1986) foram os primeiros autores a sugerirem o uso do gene 16S rRNA como um marcador molecular para o estudo de populações microbianas em amostras do ambiente, independente do seu cultivo.

FIGURA 2. ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA MOLÉCULA DE 16S rRNA DA BACTÉRIA *Escherichia coli*.



Modelo proposto por VAN DER PEER (1996) mostrando a variabilidade dos nucleotídeos da molécula de 16S rRNA. Em cinza estão as regiões mais variáveis e em rosa as absolutamente conservadas.

Genes que codificam proteínas também são utilizados para estudar determinados grupos com capacidades fisiológicas semelhantes, entre eles genes que codificam a amônia monooxigenase (*amoA*), a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase (*rpoB*), metano monooxigenase (*pmoA*), nitrogenase (*nifH*), nitrito redutase (*nirS/nirK*) etc (NOCKER et al., 2007).

Nas análises filogenéticas que utilizam esses genes e se baseiam em distâncias, elas são expressas como a fração de sítios que diferem entre duas sequências num alinhamento múltiplo. Apesar de ser natural de se pensar que quanto mais tempo se passou após a divergência das sequências da original maior será a diferença entre as duas sequências, isso nem sempre é verdade. Isso porque uma linhagem pode ter evoluído mais rápido que a outra. E, mesmo quando elas evoluem à mesma taxa, a possibilidade de múltiplas substituições deve ser considerada. Pelo fato de que o número de diferenças observadas quase sempre subestima o número de modificações reais, uma variedade de modelos é usada para estimar distâncias corrigidas a partir do número de diferenças observadas (HALL, 2008).

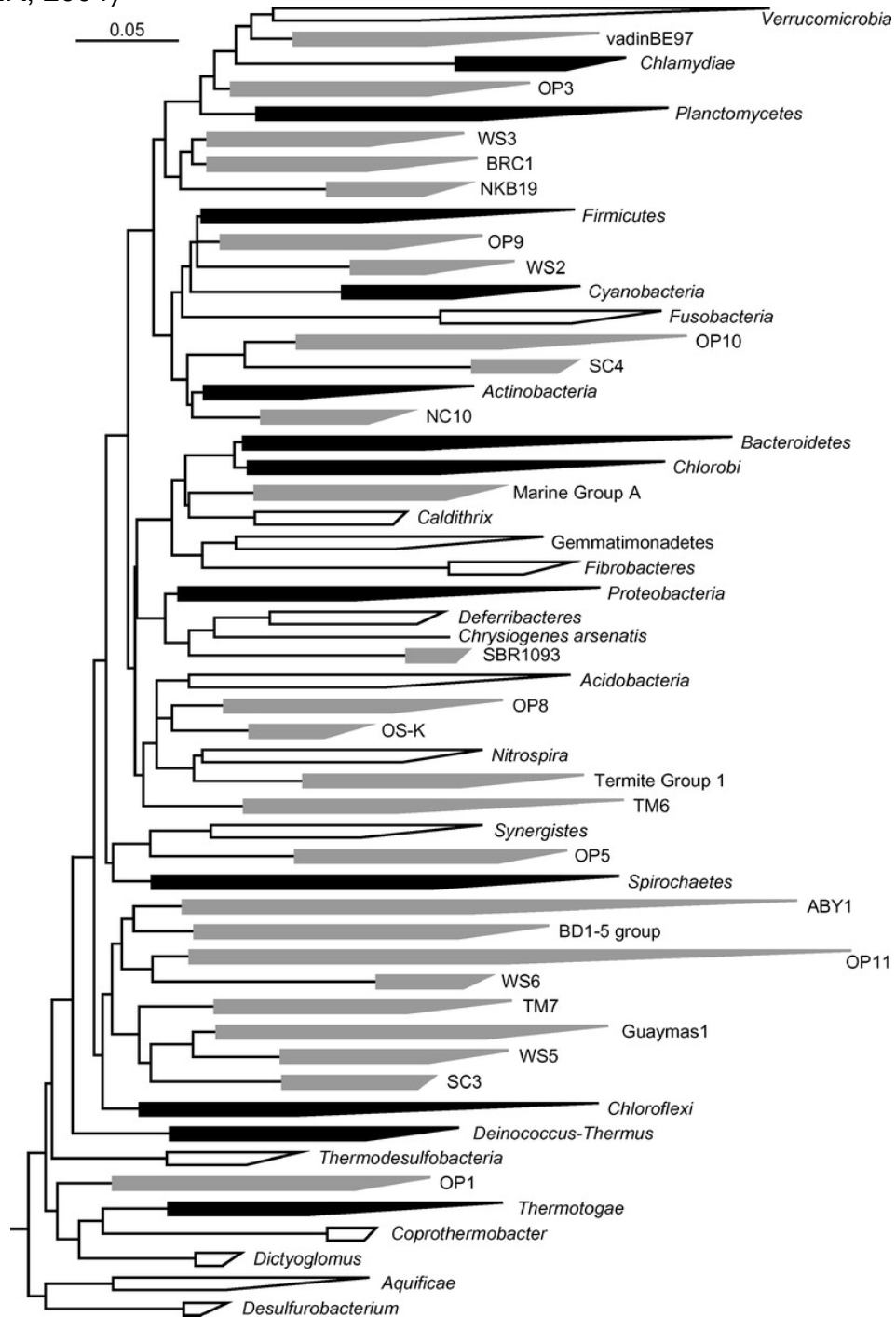
## 1.6 FILOGENIA DO DOMÍNIO BACTERIA

Em 1987, Woese publicou seu clássico artigo “Bacterial Evolution”, onde descreveu os diferentes grupos (filos) bacterianos estudados até aquele momento baseando-se na sequência do gene 16S rRNA, em catálogos de oligonucleotídeos do gene 16S rRNA (com a enzima ribonuclease T1, que produzia fragmentos de aproximadamente 20 pares de base) e na sua estrutura secundária (WOESE, 1987). Os 12 filos do Domínio Bacteria descritos até aquele momento estão representados na figura 3 como ramos preenchidos na cor preta. Na mesma figura veem-se 14 ramos em branco, que são os filos de bactérias cultiváveis reconhecidos após o trabalho de Woese de 1987. Os ramos em cinza são os filos que não contem representantes

cultiváveis (KELLER E ZANGLER, 2004).



FIGURA 3. ÁRVORE FILOGENÉTICA DO DOMÍNIO BACTERIA (KELLER E ZANGLER, 2004)



Árvore filogenética ilustrando os filios do domínio Bacteria. Em preto estão os 12 filios originais, como descritos por Woese, em branco estão os 14 filios com representantes cultivados reconhecidos desde 1987, e em cinza estão os 26 filios candidatos que não contem representantes cultiváveis. Essa análise foi construída por comparação entre 600 seqüências do gene 16S rRNA quase completas usando o pacote de análise de seqüências ARB, selecionados de um banco de dados maior de aproximadamente

12.000 sequências. Uma versão modificada da “Lane mask” foi utilizada nessa análise, com um fator de correção evolutiva Olsen e o algoritmo neighbor-joining. Os nomes dos filios estão designados ao selecionar a primeira opção aplicável das 3 seguintes: (a) nomenclatura convencional no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, se existir; (b) o primeiro gênero representativo descrito dentro do filo, se este possui representante cultivável; (c) o primeiro nome dado a um filo candidato se já publicado previamente; ou (d) o primeiro clone ou ambiente onde os primeiros clones foram retirados, para um filo candidato sem nomenclatura anterior.

### 1.6.1 FILO PROTEOBACTERIA

O termo Proteobacteria vem do grego: Proteus (deus dos oceanos capaz de mudar de forma); e bakterion (pequeno bastão) (STACKEBRANDT et al., 1988). Esse filo é um dos maiores grupos entre os procariotos e um dos mais diversos fenotipicamente; seus representantes estão presentes em quase todos os ambientes (GUPTA, 2000)

O filo Proteobacteria compreende 5 classes,  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria, D-proteobacteria e  $\epsilon$ -Proteobacteria (Tabela 2).

TABELA 2. GÊNEROS REPRESENTATIVOS ENCONTRADOS NAS DIFERENTES CLASSES DAS PROTEOBACTÉRIAS

Classe	Gêneros
$\alpha$ -Proteobacteria	<i>Agrobacterium</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Gluconoacetobacter</i> , <i>Azospirillum</i>
$\beta$ -Proteobacteria	<i>Burkholderia</i> , <i>Herbaspirillum</i> , <i>Chromobacterium</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Iodobacter</i>
$\gamma$ -Proteobacteria	<i>Escherichia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Actinobacillus</i>
$\epsilon$ -Proteobacteria	<i>Campylobacter</i> , <i>Sulfurospirillum</i> , <i>Helicobacter</i>
$\delta$ -proteobacteria	<i>Cystobacter</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfuromonas</i> , <i>Myxococcus</i>

Modificada de Madigan et al., 1997.

### 1.6.1.1 CLASSE $\gamma$ -PROTEOBACTERIA

A classe das  $\gamma$ -Proteobactérias é a mais estudada dentro desse filo. Esta classe inclui as bactérias gram-negativas clássicas e, baseando-se em análises cultivo-independentes e cultivo-dependentes são consideradas um dos grupos de bactérias de maior sucesso no planeta (RAPPE & GIOVANONNI, 2003). Há representantes com metabolismo bem variado: fototróficos, não-fototróficos, aeróbicos, anaeróbicos, heterotróficos, quimiolitotróficos etc. Os gêneros das bactérias mais bem estudadas deste grupo são: *Escherichia* e *Pseudomonas*. A primeira pertence à família Enterobacteriaceae e a segunda à família Pseudomonadaceae.

#### 1.6.1.1.1 FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE

Essa é uma família de bacilos gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbicas facultativas e oxidase negativas. Entre as bactérias dessa família, há muitas espécies patogênicas associadas a diversas infecções em humanos incluindo infecções do trato intestinal (BARON et al., 1996), mas elas podem ser encontradas também em praticamente todos os ambientes naturais. Por conta da importância médica dessas bactérias, elas constituem um dos grupos mais conhecidos.

Como exemplo de enterobactérias temos as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Shigella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Serratia* etc. A *E. coli*, tem um papel fundamental no trato intestinal, ao sintetizar vitaminas, particularmente a vitamina K (MADIGAN et al., 1997). Ela está também relacionada a algumas patologias e várias estirpes desse microrganismo são amplamente utilizadas como estirpes hospedeiras para técnicas de DNA recombinante (GIANELLA, 1981; SAMBROOK et al., 1989)

As Enterobactérias são um dos grupos de bactérias endofíticas mais frequentemente encontrados nas plantas (WEYNES et al., 2009). Algumas delas podem

provocar doenças, como *Erwinia amylovora atroseptica* causadora da podridão mole em batata, maçã e pêra (BURSE et al., 2004), e *Pantoea ananatis*, que causa doenças em plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas (COUTINHO E VENTER, 2009).

Por outro lado, enterobactérias que vivem associadas às plantas podem promover crescimento vegetal através de mecanismos como fixação biológica de nitrogênio e também atuam no controle biológico de fitopatogenias (TYLER e TRIPPLET, 2008).

Em arroz inundado, por exemplo, membros da família Enterobacteriaceae isoladas de superfície de sementes esterilizadas fixam nitrogênio, produzem ácido indol acético e solubilizam fosfatos insolúveis (VERMA et al., 2001). Em rizoma e colmo de gramíneas de dunas (*Ammophila arenaria*) foram encontradas as enterobactérias fixadoras de nitrogênio *Enterobacter hormaechei* e *Pantoea ananatis* (DALTON et al., 2004). Por meio de sequenciamento do gene *nifH*, em rizosfera de capim praturá, foram identificadas espécies de *Klebsiella* (LOVEL et al., 2000). *Pantoea agglomerans* e *Enterobacter asburiae* diazotróficas foram encontrados em batata-doce no Japão (ASIS e ADACHI, 2003).

Outras espécies de enterobactérias (*P.agglomerans* e *Enterobacter cloacae*) foram isoladas de citros (LACAVA et al., 2004) e de raiz de canola e trigo (*E. agglomerans*) (GERMIDA et al., 1998).

#### 1.6.1.1.2 FAMÍLIA PSEUDOMONADACEAE

O gênero *Pseudomonas* tem 186 espécies descritas (<http://www.bacterio.cict.fr/p/pseudomonas.html>) e muitas delas estão relacionadas com doenças, tanto em animais quanto em vegetais. É o caso da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, que pode causar endocardite, infecção respiratória, septicemia, otite entre

outras patogenias humanas (BARON et al., 1996).

Em plantas, estirpes de *Pseudomonas syringae* são consideradas fitopatógenas de uma ampla gama de hospedeiros, como tomate, batata, maçã, café etc. *Pseudomonas corrugata* está associada a sintomas de necrose-da-medula em campo de produção de tomate (QUEZADO-DUVAL et al., 2007)

Porém várias espécies de *Pseudomonas* associadas às plantas e não lhes causam mal algum e ainda, trazem alguns benefícios. Por exemplo, algumas estirpes de *Pseudomonas fluorescens* têm sido usadas para controle biológico de fitopatógenos associada à raiz (COUILLEROT et al., 2009). Em arroz a presença de bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas* com atividade contra os patógenos *Achlya klesbiana* e *Phyitium spinosum* foi verificada (ADHIKARY et al.,2004). Em tomate a aplicação de *Pseudomonas* sp (PsJN) induziu resistência sistêmica em *Verticillium dahliae* (SHARMA E NOVAK, 1998).

Espécies de *Pseudomonas* também possuem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. Bactérias diazotróficas do gênero *Pseudomonas* foram isoladas de vários ambientes, como por exemplo, de sementes de arroz, de gramíneas presentes em dunas, e até em raízes de gramíneas de regiões frias como o Ártico Canadense (PRAKAMHANG et al., 2009; DALTON et al., 2004; LIFSHITZ et al., 1986).

## **2 JUSTIFICATIVA**

A cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes do Brasil, maior produtor mundial. Dois de seus derivados, açúcar e álcool têm grande peso na economia brasileira: o açúcar é uma das principais commodities de exportação e o álcool é a principal alternativa de combustível renovável. Assim, aumentos de produtividade desta cultura são essenciais para manter o país na posição de liderança econômica. O estudo da interação endófitos-planta, incluindo fisiologia, ecologia e diversidade, é bastante recente. Já se sabe que a diversidade bacteriana nos sistemas agrícolas é de grande importância e que pode variar de acordo com o genótipo da planta, condições climáticas da região, solo etc. Conhecer a comunidade bacteriana endofítica e investigar os seus efeitos é essencial para explorar essa cultura adequadamente. O uso de métodos cultivo-independentes no estudo das bactérias endofíticas pode revelar organismos e composições de comunidades ainda não observadas. A descoberta de novas estirpes promotoras de crescimento vegetal capazes de promover um aumento de produtividade e/ou resistência a pragas pode resultar no desenvolvimento de novas alternativas de tecnologias para uma agricultura sustentável.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL:**

- Determinar a diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar, utilizando métodos independentes e dependentes de cultivo;

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Isolar bactérias endofíticas a partir de plantas de cana-de-açúcar esterilizadas superficialmente;

- Sequenciar o gene 16S rRNA das bactérias isoladas;

- Amplificar, clonar e sequenciar o gene 16S rRNA a partir do DNA total extraído diretamente de colmo de plantas de cana-de-açúcar;

- Determinar as relações filogenéticas das bactérias endofíticas caracterizadas utilizando as sequências do gene 16S rRNA obtidas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ESTIRPE DE BACTÉRIA E PLASMÍDIO UTILIZADOS

A estirpe DH10B de *E. coli* (GRANT et al., 1990) foi utilizada como hospedeira dos plasmídios derivados do vetor pCR 2.1 (Invitrogen, Anexo - Figura 24).

### 4.2 MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Células de *E. coli* DH10B foram cultivadas em meio líquido LB, SOB, SOC ou Terrific Broth (SAMBROOK et al., 1989), sob agitação constante de 120 rpm à 37°C.

As composições dos meios de cultura utilizados são apresentadas abaixo:

#### MEIO LB

<b>Componentes</b>	<b>g/L</b>
Triptona	10
Extrato de levedura	5
Cloreto de sódio	10

O pH foi ajustado para 7,5 com uma solução de NaOH 2 mol/L. Para obtenção do meio sólido ágar na concentração de 15 g/L foi adicionado ao meio líquido. O meio sólido foi denominado LA.

#### MEIO SOB (SAMBROOK *et al.*, 1989)

<b>Componentes</b>	<b>g/L</b>
Triptona	20
Extrato de levedura	5



Cloreto de sódio 0,584

Cloreto de potássio 0,186

Para obtenção do meio SOC foram adicionados 3,6 g/L glucose, 0,94 g/L  $MgCl_2$  e 1,2 g/L  $MgSO_4$  ao meio SOB. O pH dos meios de cultura foram corrigidos com uma solução de NaOH 2 mol/L para pH 7.

#### MEIO TERRIFIC BROTH (SAMBROOK *et al.*, 1989)

<b>Componentes</b>	<b>g/L</b>
Extrato de levedura	24,0
Glicerol	4,0
$KH_2PO_4$	2,31
$K_2HPO_4$	12,54

O meio NFbHP foi utilizado para isolamento de bactérias endofíticas de plantas de cana-de-açúcar e também para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

#### MEIO NFbHPN (PEDROSA E YATES, 1984)

<b>Componentes</b>	<b>g/L</b>
Lactato de sódio	5,0 g
$K_2HPO_4$	6,0 g
$KH_2PO_4$	4,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
NaCl	0,1 g
$CaCl_2$	0,2 g
Ácido Nitrilo triacético	56 mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	20 mg
Biotina	0,1 mg

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,4 mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2,8 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,24 mg

O pH foi ajustado para 6,5 – 6,8 com KOH. Fonte de nitrogênio:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  20mmol/L

Para preparo do meio NFbHP sólido foi adicionado ao meio 15g/L de ágar bacteriológico ao meio líquido.

O meio de cultura BATATA foi utilizado para isolamento de bactérias endofíticas de plantas de cana-de-açúcar pela Dra Claudia M. Didonet. Os isolados foram gentilmente cedidos para caracterização molecular durante esta tese. Este meio foi utilizado também para o crescimento dessas bactérias, que se encontravam estocadas em glicerol 50% a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### MEIO BATATA (DÖBEREINER e BALDANI, 1995)

<b>Componentes</b>	<b>g/L</b>
Batata	200 g
Ácido málico	2,5 g
Açúcar cristal	2,5 g
Solução de micronutrientes	2 mL*
Solução de vitaminas	1 mL**

<b>*Solução de micronutrientes</b>	<b>g/L</b>
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,04 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,2 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	1,4 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 g

MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,175 g
<b>**Solução de vitaminas</b>	<b>mg/L</b>
Biotina	10 mg
Piridoxol-HCl	20 mg

#### 4.2.1 Antibióticos

As soluções dos antibióticos utilizados foram preparadas conforme SAMBROOK *et al.* (1989) e os estoques mantidos a -20°C. As concentrações das soluções de estoque, bem como as utilizadas para os cultivos estão apresentadas na tabela 3.

TABELA 3 – ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS

Antibióticos	Abreviatura	Solução estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Ampicilina	Amp	250	250
Canamicina	Km	100	50
Estreptomicina	Sm	80	10

#### 4.3 PLANTIO E COLETA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM PARANAÍ-PR

As plantas utilizadas neste trabalho vieram da Estação Experimental da UFPR, localizada em Paranaíba, Noroeste do Paraná, no terceiro planalto, (Latitude 23° 05' S, Longitude 52° 26' W e Altitude de 480m). Duas plantas de cana-de-açúcar da variedade RB-72454 em ponto de corte foram coletadas na Estação Experimental em junho de 2006 (06/06/06).

Para estudar a diversidade em diferentes estágios de desenvolvimento e regime de adubação, foi delimitada uma área de aproximadamente 20 m<sup>2</sup>, separada em

dois blocos (Figura 4). Um dos blocos recebeu adubação nitrogenada (90 kg/ha) enquanto o outro não recebeu nenhum adubo nitrogenado. Cada bloco continha seis fileiras (Figura 5), onde foram plantadas mudas de cana-de-açúcar variedade RB-72454). As mudas foram plantadas em setembro de 2006. Durante o período de setembro de 2006 a outubro de 2007 amostras de cada tratamento foram coletadas em intervalos de 45 a 60 dias, enviadas para o Núcleo de Fixação de Nitrogênio no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular para a extração do DNA total e análises posteriores. Essas amostras se constituíam de uma planta de cana-de-açúcar vinda do bloco que recebeu adubação nitrogenada e outra planta vinda do bloco que não recebeu adubação nitrogenada. Cada planta recebida foi separada em folha, colmo e raiz. As raízes e o solo aderido a elas foram passadas para o aluno de doutorado Giovani Pisa. Foram recebidas um total de sete amostras nesse período.

No mês de agosto de 2007, em virtude do clima extremamente seco em Paranavaí e à presença de fortes ventos, as plantas do experimento foram acidentalmente queimadas.

Na figura 6 está representado o fluxograma das principais etapas realizadas para a análise e determinação da diversidade de bactéria endofíticas em colmo de plantas de cana-de-açúcar.

FIGURA 4. VISTA DOS BLOCOS DE PLANTIO DE CANA-DE-AÇÚCAR



Data da foto: 22/01/07. Vista do experimento delineado na Estação Experimental da UFPR em Paranavaí, norte do Estado. Nessa foto aparecem dois blocos, um que recebeu adubação nitrogenada e outro que não recebeu adubação nitrogenada.

AUTORA DA FOTO: Giovana de Souza Magnani

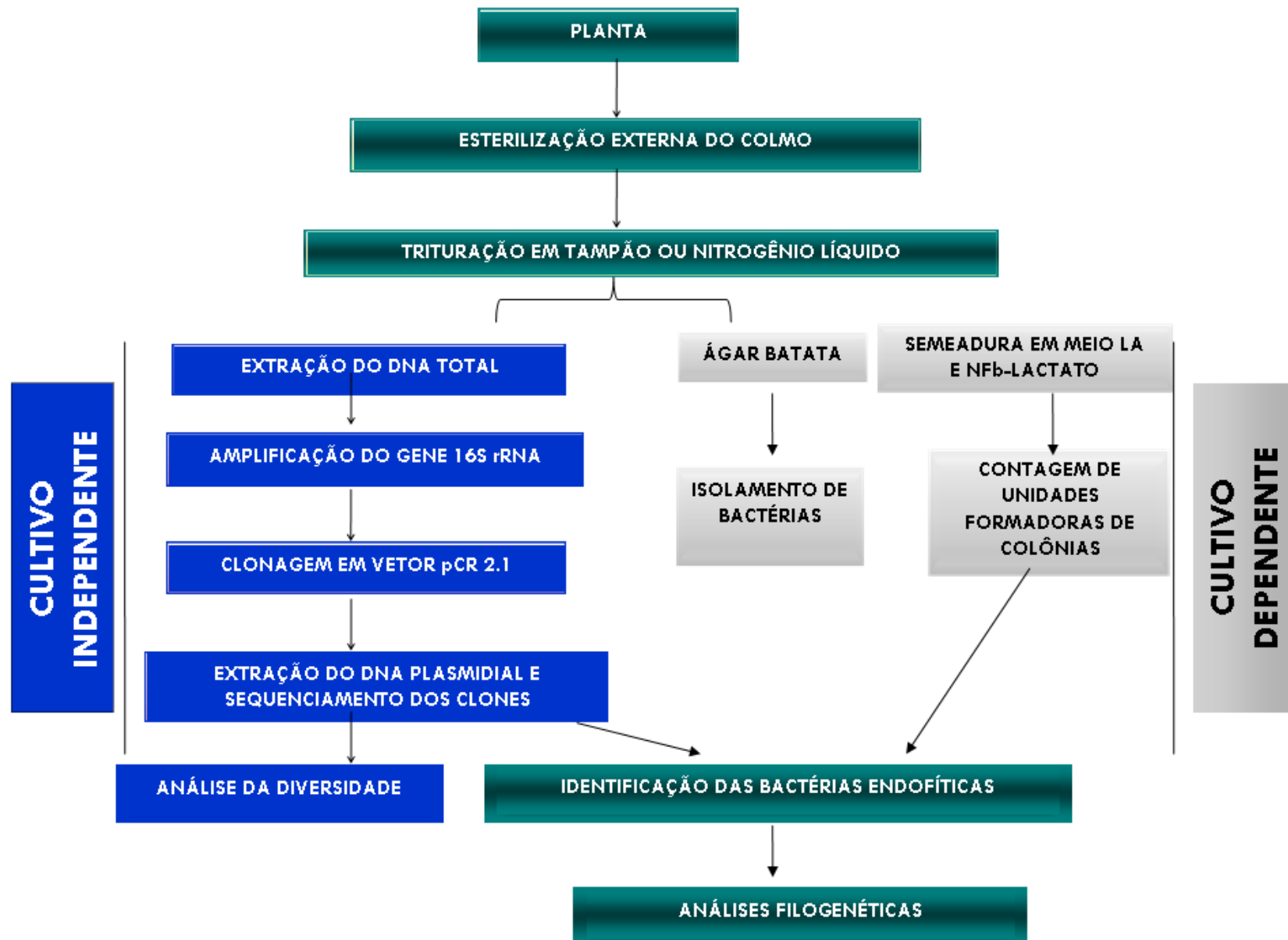
FIGURA 5 VISTA DAS FILEIRAS DOS BLOCOS DE PLANTIO DE CANA-DE-AÇÚCAR SEM ADUBAÇÃO NITROGENADA



Data da foto: 22/01/07. Foto mostrando três das seis fileiras do bloco sem adubação, com aproximadamente 50 cm entre elas.

AUTORA DA FOTO: Giovana de Souza Magnani

FIGURA 6. DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM CANA-DE-AÇÚCAR



- O isolamento e contagem das bactérias foi feito somente na amostra de 06 de junho de 2006 (06/06/06)

#### 4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DO COLMO DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Cada planta de cana-de-açúcar que chegou ao laboratório foi fotografada e separada em raiz, colmo e folhas. Em seguida foi feita a desinfecção da superfície externa do colmo com álcool 70% e o colmo foi flambado. O colmo foi então descascado assepticamente e sua porção inicial (~50 cm) foi cortada em pedaços de aproximadamente 5 cm. Três pedaços foram selecionados aleatoriamente para obtenção do extrato. A partir desse ponto, duas metodologias diferentes foram utilizadas para a obtenção dos extratos:

- 1) os pedaços do colmo foram macerados em nitrogênio líquido e triturados, em fluxo laminar, com o auxílio de pistilo e gral. Os extratos (colmo esterilizado, descascado, congelado e triturado em nitrogênio líquido) eram guardados em tubos tipo Falcon de 50 mL a -80°C até o momento da extração do DNA;
- 2) os pedaços do colmo foram macerados em tampão TrisHCl 8 mmol/L e triturados, em fluxo laminar, com o auxílio de pistilo e gral. Os extratos eram guardados em tubos tipo Falcon de 50 mL a -80°C até o momento da extração do DNA.

#### 4.5 EXTRAÇÃO DO DNA DE EXTRATOS DE COLMOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

O DNA dos colmos de cana-de-açúcar foi extraído com o kit “PowerPlant DNA Isolation” (MOBIO) segundo as orientações do fabricante.

Somente uma amostra foi processada de modo diferente. O colmo da amostra de junho de 2006, após a esterilização externa, foi descascado assepticamente, e um pedaço (10 g) foi macerado em tampão Tris-HCl 8 mmol/L pH 8,0 com auxílio de pistilo e gral, e armazenado a -80°C.



#### 4.6 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

O isolamento das bactérias de folhas e colmo de cana-de-açúcar, em meio batata, foi feito pela Dra Claudia Martim Didonet durante o seu pós-doutorado. As plantas foram coletadas e as bactérias isoladas de diferentes tecidos (folha, colmo e raiz). Para o isolamento de bactérias endofíticas de folha, estas foram primeiramente picadas e submetidas à esterilização da sua superfície através da imersão em solução de álcool 70%. O colmo foi esterilizado por imersão em álcool 70%, posteriormente flambado em chama e, em seguida, descascado assepticamente. Folhas e colmos foram triturados separadamente em Tris-HCl 10 mmol/L pH 8,0 estéril e preparadas diferentes diluições (de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ). As suspensões foram semeadas em placas de agar batata. Um novo cultivo em meio líquido foi feito e usado para estocar os isolados em solução de glicerol a 50% a  $-20^{\circ}$  C. A partir desses estoques, as bactérias foram novamente crescidas em meio líquido e o seu DNA foi extraído para posterior amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA. Durante o mestrado foram realizados testes bioquímicos nessas estirpes e sequenciamento do gene 16S rRNA de alguns isolados (MAGNANI, 2005).

A contagem das unidades formadoras de colônias foi feita somente na amostra CA01 da cana-de-açúcar *var.* RB-72454. Para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) os extratos frescos foram diluídos serialmente ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) em salina tamponada estéril e plaqueados em meios LB e NFbHPN lactato. Após 24 horas, as colônias foram contadas e 384 foram selecionadas aleatoriamente e armazenadas em solução de glicerol 50% a  $-20^{\circ}$  C.

#### 4.7 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rRNA A PARTIR DO DNA EXTRAÍDO DE EXTRATOS DE COLMO DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

O gene 16S rRNA das bactérias existentes nas amostras de plantas de

cana-de-açúcar foi amplificado por PCR com os pares de oligonucleotídeos iniciadores 27f/1492r e 27f/805r. O uso desses pares de oligonucleotídeos permitiu amplificação de fragmentos de DNA de 1500 e 800 pares de base do gene, respectivamente. As seqüências desses iniciadores estão indicadas na tabela 4.

O sistema de reação da PCR foi o seguinte: tampão de reação para a *Taq* DNA polimerase (20 mmol/L Tris-HCl pH 8,4, 50 mmol/L KCl), 200 µmol/L de cada dideoxinucleotídeo, 1,5 mmol/L de cloreto de magnésio, 0,4 pmol/µL de cada iniciador e água ultra pura estéril para um volume final de 25 µL. Como molde foram utilizados de 50 a 100 ng de DNA extraído dos extratos de colmos de plantas de cana-de-açúcar.

Os ciclos utilizados foram os seguintes: 1 ciclo inicial de 95°C por 3 minutos, 28 ciclos de 94°C por 1 minuto, 62°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto e 45 segundos (27f-1492r) ou 1 minuto (par 27f-805r) e, por último, um ciclo de 72°C por 10 minutos.

TABELA 4. INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S RRNA

Nome	Tamanho (pb)	Seqüência (5'→3')	Referência
27f	20	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	LANE et al., 1991
16S805r	23	GACTACCAGGGTATCTAATCCTG	SOARES-RAMOS et al., 2003
1492r	19	GGTACCTTGTTACGACTT	LANE et al., 1991

#### 4.8 CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DOS GENES 16S RRNA

O gene 16S rRNA amplificado das amostras de cana-de-açúcar foi clonado no vetor pCR 2.1 (TA Cloning Kit - Invitrogen). Esse vetor é fornecido linearizado e possui uma timina não pareada nas suas extremidades. Dessa maneira os vetores se aproveitam da capacidade que a *Taq* DNA polimerase possui de adicionar a base nitrogenada adenina não pareada na extremidade 3' da nova fita de DNA, permitindo o pareamento com a ponta T do vetor.

A reação de ligação foi feita utilizando-se 50 ng de vetor pCR 2.1,

aproximadamente 10 ng de inserto de DNA, 1 unidade de enzima T4 DNA ligase, tampão de reação (60 mM Tris-HCl pH 7,8, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% polietileno glicol) e água ultrapura estéril para um volume final de 10 µl. Além do vetor, a enzima T4 DNA ligase e o tampão de reação também foram fornecidos com o kit. O sistema de ligação foi incubado durante a noite em geladeira (aproximadamente 4°C) e posteriormente transformado.

#### 4.8.1 Preparo de células eletrocompetentes

Células eletrocompetentes da estirpe DH10B de *E. coli* foram preparadas da seguinte forma. As células foram inicialmente inoculadas em 4 mL de meio SOB e cultivadas em agitador rotatório a 37°C sob agitação constante (120 rpm) durante a noite. A seguir, 1 mL dessas células foi transferido para 100 mL de meio SOB e incubado a 37°C a 120 rpm até a cultura atingir uma D.O.<sub>600</sub> de 0,5 a 0,7. A cultura foi então colocada em gelo por 15 a 30 minutos. Após esse período a cultura foi centrifugada a 4000 rpm (2.500 g) por 5 minutos, a 2°C. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em água gelada e centrifugadas novamente a 4000 rpm (2.500 g) por 5 minutos a 2°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas mais uma vez em água gelada. O sobrenadante foi novamente descartado e as células ressuspensas em glicerol 15% e submetidas à centrifugação como anteriormente. Finalmente, as células foram ressuspensas em 200 µL de glicerol 15%. Aliquotas de 100 µL foram mantidas em gelo e utilizadas em seguida para proceder a eletrotransformação.

#### 4.8.2 Eletrotransformação bacteriana

A eletrotransformação foi realizada utilizando-se 100 µL da suspensão de células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B e 1 µL do sistema de ligação. Esta mistura

foi posteriormente transferida para cubetas de eletroporação de 0,2 cm (BIORAD). Para a eletrotransformação foi usado o Gene pulser II (BioRad), no qual as amostras foram submetidas a um choque elétrico de 2,5 kV. Para promover a recuperação das células eletrotransformadas foi adicionado 1 mL de meio SOC e o sistema foi incubado a 37°C em agitador rotatório durante 30 minutos. Após esse período as células elas foram plaqueadas em meio LA contendo 250 µg/mL de ampicilina, 50 µg/mL de canamicina e 10 µg/mL de estreptomicina.

#### 4.8.3 Coleta dos clones transformantes

As colônias de *E. coli* DH10B contendo os plasmídeos recombinantes das bibliotecas (vetor ligado ao gene 16S RNA) foram coletadas e repicadas em meio sólido LA contendo 250µg/mL de ampicilina, 50 µg/mL de canamicina, e 10 µg/mL de estreptomicina em placas de Petri. Após o crescimento das colônias, os clones foram repicados com o auxílio do replicador de 96 pinos para placas do tipo ELISA contendo 100 µL de meio terrific Broth e antibióticos adequados e incubadas na estufa a 37°C durante a noite. No dia seguinte foram adicionados 100 µL de glicerol 87% estéril a cada poço. As placas foram então seladas e armazenadas a -20°C.

#### 4.8.4 Purificação de DNA plasmidial em placas de 96 poços

Para purificar os plasmídios recombinantes, os clones estocados em glicerol foram cultivados em placas tipo *deep well* de 96 poços contendo 1,25 mL de meio Terrific Broth e os antibióticos adequados. As colônias foram repicadas com o auxílio do replicador e os poços selados com adesivo, que foi posteriormente perfurado para permitir a aeração necessária para o crescimento bacteriano. Essas culturas foram incubadas a 37°C sob agitação de 180 rpm durante aproximadamente 16 horas.

Após o período de crescimento, o bloco contendo as culturas foi centrifugado por 7 minutos a 4.000 rpm a 20°C. Terminada a centrifugação, o selo foi removido e o meio foi retirado dos blocos. As células foram ressuspensas pela adição de 180 µL de tampão GET (glucose 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L e Tris-HCl 25 mmol/L pH 8) a cada poço e os blocos foram agitados em vórtex de placa à velocidade máxima. Em seguida o bloco foi centrifugado por 7 minutos a uma velocidade de 4.000 rpm a 20°C.

Após retirar o sobrenadante, foram adicionados aos poços 80 µL de GET contendo 2,5 µg/mL de RNase. A suspensão foi transferida para uma microplaca de polipropileno de 96 poços de fundo U. Às suspensões contidas nos poços foram então adicionados 80 µL de solução de lise (NaOH 0,2 mol/L e SDS 1%), a placa foi devidamente selada e o sistema de lise foi misturado por inversão (20 vezes). A seguir acrescentaram-se 80 µL da solução de acetato de potássio (3 mol/L) e o conteúdo dos poços foi misturado por inversão (30 vezes). A placa foi então deixada à temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida incubada (sem o selo) a 90°C em estufa por 30 minutos. A placa foi selada e resfriada em banho de gelo por 15 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada durante 10 minutos a 4000 rpm e temperatura ambiente. O sobrenadante foi então transferido para uma placa de 96 poços Millipore (MAGV N22), fixada sobre outra placa de fundo V e centrifugado sem tampa por 5 minutos a 4.000 rpm. Ao filtrado adicionaram-se 90 µL de isopropanol e o material foi centrifugado por 45 minutos a 4.000 rpm a 8°C. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado de DNA foi então lavado com 150 µL de etanol 80% e seco na estufa a 37°C. Por último o DNA foi dissolvido em 30 µL de água ultra pura.

#### 4.8.5 Purificação do DNA plasmidial por cromatografia em SEPHADEX G-50

Inicialmente a resina sephadex G-50 foi depositada nos 96 poços de uma

placa para filtração Multiscreen HV com o auxílio do suporte *Column Loader* (Millipore). A resina foi inchada pela adição de água ultrapura e incubada por 3 horas à temperatura ambiente. Uma vez inchada a resina, a placa poderia ser estocada a 4°C por duas semanas (em sacos plásticos para evitar desidratação). Após as 3 horas, o suporte de alinhamento (Millipore) para centrifuga foi colocado no topo de uma placa de 96 poços padrão e a placa *Multiscreen HV* foi alinhada e submetida à centrifugação a 910 x g por 5 minutos para empacotar a resina. A resina foi lavada com 150 µL de água ultrapura estéril para remover contaminantes. Logo após, as soluções de plasmídios isolados foram adicionadas ao centro de cada poço. Usando o suporte de alinhamento para centrifuga, a placa foi submetida à centrifugação a 910 x g por 5 minutos e o eluato foi coletado numa placa de 96 poços com fundo V.

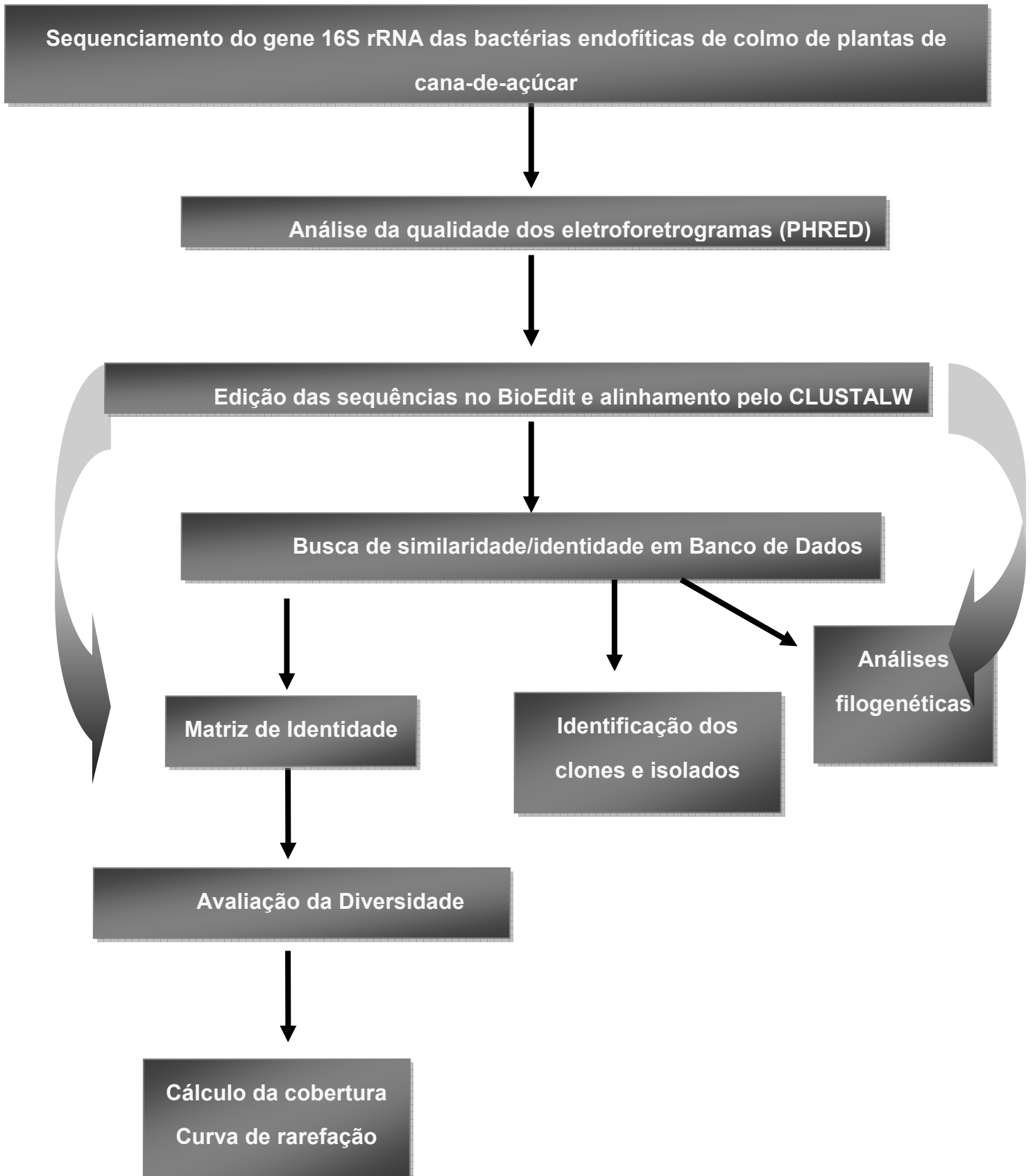
#### 4.9 SEQUENCIAMENTO DE DNA PLASMIDIAL

O seqüenciamento de DNA foi realizado pelo método de Sanger (Sanger et al., 1977), utilizando dideoxynucleotídeos fluorescentes como terminadores de cadeia. O sistema de reação continha aproximadamente 250 ng de DNA, 3,5 pmol de iniciador, 3 µL de reativo *ET terminador mix* (GE Health Care) e água ultra pura suficiente para 7,5 µL. A reação de seqüenciamento foi conduzida em termociclador Eppendorf *Master CyclerGradient 5331* nas seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 1 minuto seguido de 35 ciclos de 94°C por 20 segundos e 62°C por 2 minutos. A seguir o produto das reações foi purificado adicionando-se a cada tubo 12,5 µL de água ultra pura, 2 µL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 3 volumes de etanol 96% e homogenizado por inversão. O DNA foi coletado por centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos, lavado com 100 µl de etanol 80% e seco em estufa à 37°C. O DNA seco e purificado foi dissolvido em água ultra pura e aplicado no sequenciador automático Megabace 1000 (GEHealthcare) ou ABI 377 (Applied Biosystems).

#### 4.10 ANÁLISES DE SEQUÊNCIA

O fluxograma das etapas dados de análise das sequências está na figura 7. Os dados dos eletroforetogramas gerados pelos seqüenciadores foram inicialmente analisados pelo programa PHRED para a identificação das bases e avaliação da qualidade das sequências. As regiões de sequência de baixa qualidade das extremidades foram retiradas (*trimming*). Em seguida as sequências foram analisadas utilizando o programa BioEdit e submetidas ao programa BLASTn para uma busca por identidade entre sequências. As sequências foram alinhadas pelo CLUSTALW (THOMPSON et al., 1994) e o alinhamento foi utilizado como arquivo de entrada no programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007) para a construção das árvores filogenéticas e para a construção de matriz de identidade pelo programa DNADIST versão 3.5c (FELSENSTEIN, J. 1986). As matrizes foram utilizadas para a avaliação da diversidade, feita através da construção da curva de rarefação, do cálculo de cobertura da biblioteca e pela construção da curva do coletor.

FIGURA 7. FLUXOGRAMA DAS ANÁLISES DE SEQUÊNCIAS PARCIAIS DO GENE 16S rRNA





#### 4.10.1 Pesquisa de homologia de sequência

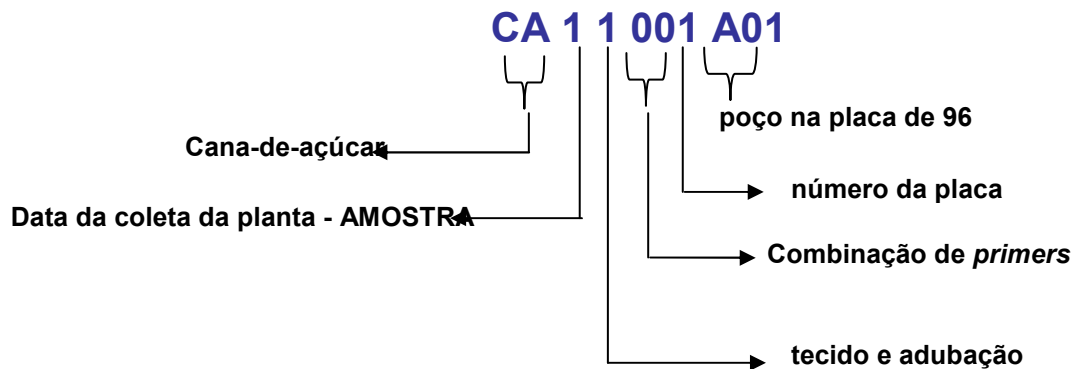
A busca de similaridade entre sequências obtidas com sequencias depositadas no banco de dados GenBank foi realizada com o programa BLASTn. Esse programa realiza alinhamentos locais entre a sequência fornecida pelo usuário (*query*) e as sequências do banco de dados e identifica as sequências de maior semelhança com o alvo.

#### 4.10.2 Análises filogenéticas

Para determinar a relação de parentesco, as sequências obtidas dos clones das bibliotecas da cana-de-açúcar foram alinhadas com as sequências do banco de dados com as quais apresentaram maior grau de identidade. Isso foi feito pelo programa CLUSTAW. Esse alinhamento foi utilizado pelo programa MEGA4 para a construção das árvores filogenéticas. Nessa análise, a distância evolutiva foi calculada para cada par de sequências através do método de JUKES & CANTOR (SAITOU & NEI, 1987). Este método constrói uma matriz numérica, onde cada valor representa a estimativa da distância entre cada par de sequências. Para que não haja uma subestimativa da distância real que separa os organismos, o programa aplica um modelo evolutivo específico, com correção para ocorrência de substituições múltiplas. A partir da matriz de distância, a topologia da árvore filogenética foi inferida através do método de *neighbor-joining* (SAITOU & NEI (1987). Este método, evolução mínima, parte de uma topologia sem resolução (estrela) e procura, a cada ciclo, o par de sequências que contribui com a menor soma de ramos para a topologia da árvore (CAVALLI-SFORZA & EDWARDS, 1967).

#### 4.10.3 Nomenclatura das bibliotecas e dos clones

A fim de facilitar as análises e a identificação das diferentes sequências das diferentes amostras e condições de adubação, foi definido um código com 10 dígitos para denominar as sequências.



Legenda:

#### DATA DA COLETA

0 – 06/06/06

2 – 16/11/06

6 – 26/06/07

#### TECIDO E ADUBAÇÃO

1- CC (colmo de cana adulta sem tratamento)

2- CCN+ (colmo de cana com adubação nitrogenada)

3- CCN- (colmo de cana sem adubação nitrogenada)

#### COMBINAÇÃO DE PRIMERS DE AMPLIFICAÇÃO E PRIMER DE SEQUENCIAMENTO

01 - 27f-16S805r:27f

02 - 27f-16S805r:805r

05 - 27f-1492r:27f

## 4.11 ESTIMATIVAS DE DIVERSIDADE

### 4.11.1 Cobertura da biblioteca

Para inferir a representatividade das bibliotecas, ou seja, o quanto as seqüências obtidas representam a diversidade do ambiente avaliado, foi utilizada a seguinte fórmula para calcular a cobertura (C) da biblioteca (SUN et al., 2008).

$$C = 1 - \left( \frac{n_1}{N} \right) \times 100$$

$n_1$  = número de seqüências únicas

$N$  = número total de clones sequenciados da biblioteca

### 4.11.2 Curva de rarefação e curva do coletor

Rarefação é um método estatístico utilizado para estimar o número de espécies (ou unidades taxonômicas operacionais – UTO) esperado em uma amostra casual de indivíduos retirada de uma comunidade. A curva mostra na abscissa o número de indivíduos amostrados e na ordenada o número de espécies ou UTO esperado. O número esperado de espécies ou UTO é dado pela equação:

$$E(S_n) = \sum_{i=1}^S \left( 1 - \frac{C_n^{N-N_i}}{C_n^N} \right)$$

$E(S_n)$  = número esperado de espécies em uma amostra casual de  $n$  indivíduos

$S_n$  = número total de espécies na população

$N$  = número total de indivíduos na população

$N_i$  = número de indivíduos da espécie  $i$

$n$  = tamanho da amostra

A curva de rarefação foi calculada pelo programa DOTUR (SCHLOSS HANDELSMAN, 2005). Esse programa divide as sequências em UTOs (unidades taxonômicas operacionais) baseando-se na distância genética entre elas. Ele define estas OTUs levando-se em consideração diferentes porcentagens de dissimilaridade entre as sequências.

Inicialmente um alinhamento com todas as sequências é feito pelo programa CLUSTALW e a partir desse uma matriz de distância é calculada pelo programa PHYLIP (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Esta matriz foi usada como arquivo de entrada para o DOTUR, que divide as sequências nas diferentes UTOs para cada possível distância (1%, 2%, 3%, 5% etc). O DOTUR então calcula valores que são usados para construir curvas de rarefação e do coletor das diferentes UTOs observadas. Esses valores podem ser calculados pelos algoritmos *nearest neighbor*, *furthest neighbor*, e *average neighbor*.

Como resultado vê-se as curvas de rarefação e do coletor. Nessas curvas pode-se observar o número de UTOs *versus* o número de sequências analisadas para cada porcentagem de dissimilaridade entre as UTOs. Com elas, pode se ter uma noção se a amostragem conseguiu recuperar as UTOs existentes na amostra.

## 5 RESULTADOS

### 5.10 ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR POR MÉTODO INDEPENDENTE DE CULTIVO

#### 5.10.1 Coleta das plantas de cana-de-açúcar *var* RB72454

Amostras de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB-72454, oriundas da Estação experimental de Paranavaí foram colhidas e enviadas ao laboratório. Inicialmente, uma planta adulta foi colhida em junho de 2006 (amostra CA01) e levada ao laboratório para análise da diversidade de bactérias endofíticas. Em seguida, na mesma área, foi implantado um experimento onde mudas de cana de açúcar foram plantadas em um bloco que recebeu adubação nitrogenada e em outro que não recebeu. No período de setembro de 2006 a junho de 2007, a um intervalo de 45-60 dias, foram coletadas e enviadas para o laboratório duas plantas de cana-de-açúcar, uma proveniente do bloco que recebeu adubação nitrogenada (N+) e outra do bloco que não recebeu adubação nitrogenada (N-). As folhas e os colmos de todas as amostras foram esterilizados, triturados e utilizados para a extração do DNA, mas os colmos de amostras selecionadas é que foram utilizadas para o presente estudo (Tabela 5).

A amostra CA01 foi esterilizada externamente e macerada em tampão para a preparação dos extratos. E os demais colmos, vindos dos blocos com e sem nitrogênio, foram congelados em nitrogênio líquido e então triturados.

TABELA 5. AMOSTRAS DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZADAS PARA AS ANÁLISES DE DIVERSIDADE

Coleta	Data	Denominação das amostras utilizadas nessa tese
<b>Coleta planta adulta</b>	<b>06/06/06</b>	<b>CA01</b>
<b>2ª coleta</b>	<b>16/11/06</b>	<b>CA22 e CA23</b>
<b>6ª coleta</b>	<b>26/06/07</b>	<b>CA62 e CA63</b>

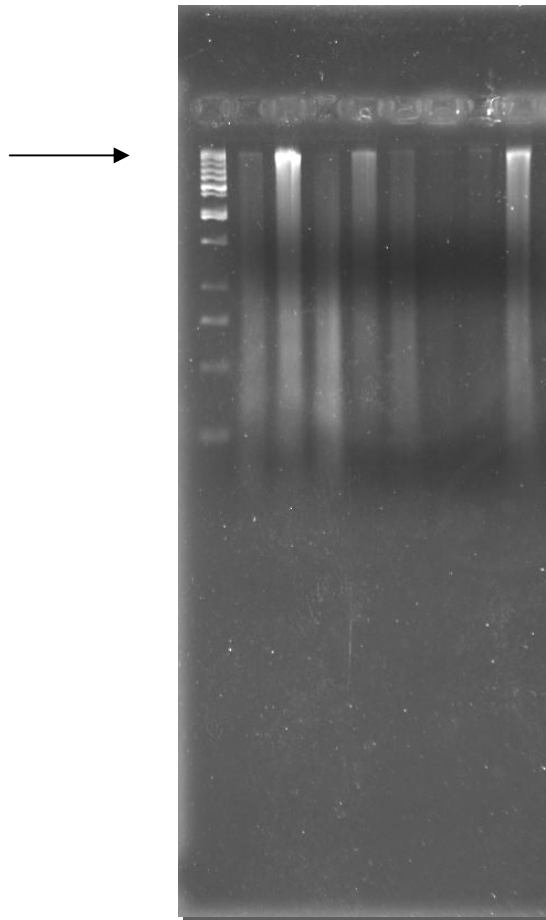
Foram utilizadas as amostras CA01 por ser de uma planta adulta, e as amostras CA22/CA23 e CA62/CA63 por representarem o maior intervalo de tempo, o que resultaria numa maior variação da comunidade de bactérias endofíticas associadas às plantas de cana-de-açúcar.

#### 5.10.2 Extração de DNA do material vegetal

Para a extração do DNA dos extratos vegetais foi utilizado o *PowerPlant DNA Isolation Kit* (MOBIO) e a aplicação do protocolo recomendado pelo fabricante mostrou-se eficiente para extração do DNA pois possibilitou a extração de DNA Apesar do DNA obtido se mostrar bastante fragmentado (Figura 8), este pode ser utilizado como molde para a amplificação dos genes 16S rRNA das bactérias endofíticas presentes no colmo da cana-de-açúcar.

As segundas e sextas coletas foram escolhidas por representarem um intervalo maior de tempo, dentro do qual poderia ser observada uma maior variação na diversidade das bactérias endofíticas. O material das coletas 1, 3, 4, 5 e 7 foi esterilizado, macerado, seu DNA foi extraído e guardado a -20°C.

FIGURA 8. DNA EXTRAÍDO DAS AMOSTRAS DE CANA-DE-AÇÚCAR



Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, a 60 V por 2 horas do DNA extraído das amostras de cana-de-açúcar. FC: folha de cana-de-açúcar (dados não mostrados nesse trabalho). O DNA das amostras CA32 e CA33 foi extraído em 2 experimentos diferentes.

Poço 1: Marcador de massa molecular *GeneRuler 1kb DNA Ladder* (Fermentas).

Poço 2: CA32.

Poço 3: FCN+ 16/11/06.

Poço 4: CA33

Poço 5: CA32.

Poço 6: CA33.

Poço 7: FC 06/06/06.

Poço 8: CA11.

Poço 9: FCN- 16/11/06.

### 5.11 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rRNA A PARTIR DO DNA EXTRAÍDO DA CANA-DE-AÇÚCAR.

O DNA extraído de colmo de cana de açúcar da amostra CA01 foi amplificado por PCR utilizando o par de oligonucleotídeos iniciadores 27f-1492r, que amplifica aproximadamente 1.500 pb do gene 16S rRNA a partir da extremidade 5'. Esse par de oligonucleotídeos iniciadores é utilizado para amplificação do gene 16S rRNA do domínio Bacteria (TIAN et al., 2005).

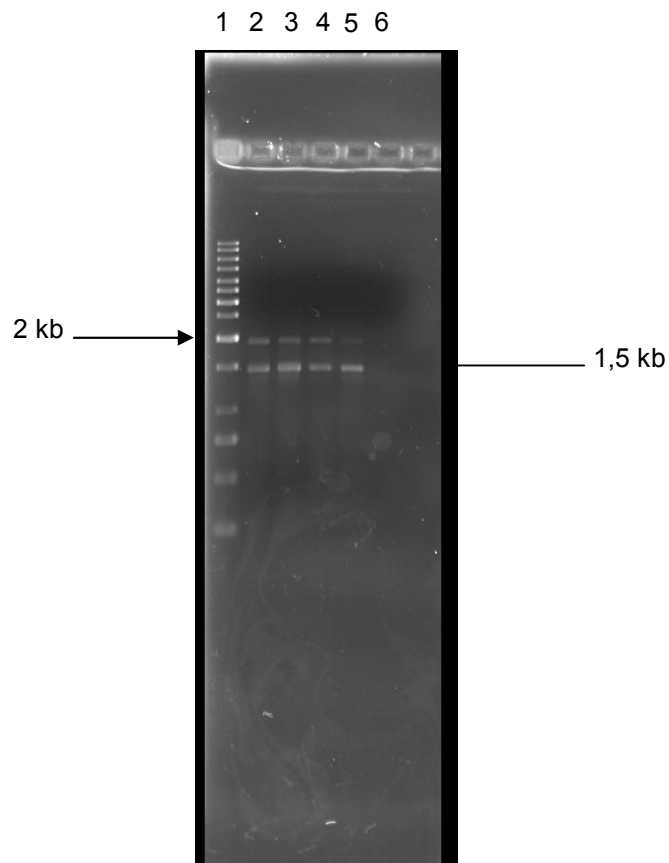
Porém, como pode ser visto no gel da figura 9, houve a amplificação de um produto de PCR inespecífico, de cerca de 2.000 pb. Esse fragmento de DNA tem o mesmo tamanho que o gene 18S rRNA mitocondrial da cana-de-açúcar e constituiria um fragmento clonado indesejável nas bibliotecas do gene 16S rRNA para análise da diversidade de bactérias endofíticas. Esse par de oligonucleotídeos iniciadores foi utilizado em apenas uma amostra analisada nesse trabalho, a amostra CA01, triturada em tampão.

Para evitar a amplificação de um produto de PCR inespecífico nas demais amostras, a reação de PCR foi realizada com o par de oligonucleotídeos iniciadores 27f-16S805r, que amplifica aproximadamente 800 pb da extremidade 5' do gene 16S rRNA. Uma análise realizada no programa *Probe Match*, disponível no sítio do RDP II (<http://rdp.cme.msu.edu/probematch/search.jsp>) mostrou que os oligonucleotídeos iniciadores 27f e 16S805r são capazes de anelar com sequências de representantes de diferentes filos bacterianos (26 de um total de 34 disponíveis no banco de dados). Por essa razão, esse último par de primers foi escolhido para a amplificação do DNA extraído a partir dos demais extratos da cana-de-açúcar.

A figura 10 mostra o resultado da amplificação com o par de oligonucleotídeos iniciadores 27f-16S805r. Neste caso, aparentemente não houve amplificação de fragmento inespecífico.



FIGURA 9 PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 27F-1492R DO GENE 16S RRNA DE EXTRATOS DE CANA-DE-AÇÚCAR



Eletroforese (60 V por 2 horas) em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X do produto de PCR amplificado com os oligonucleotídeos 27f-1492r a partir de DNA extraído das amostras de cana-de-açúcar. Os poços 3-5 são de produtos de PCR amplificados a partir de folhas de cana-de-açúcar (dados não mostrados nesse trabalho).

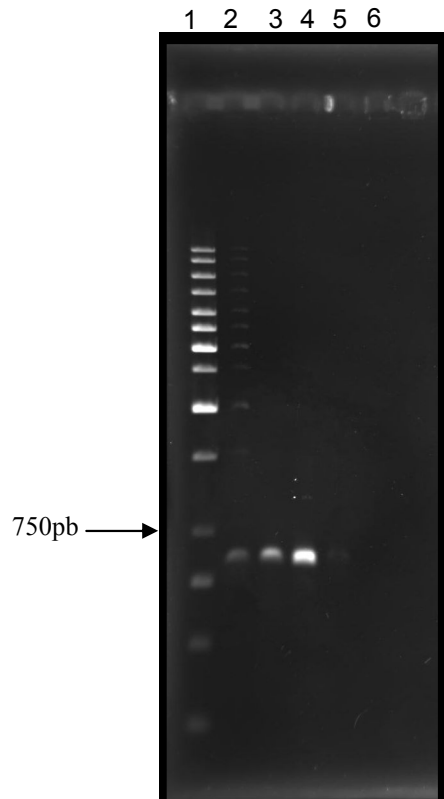
Poço 1: Marcador de peso molecular *Gene ruler* 1 kb DNA ladder (Fermentas).

Poço 2: CA01.

Poço 3-5: amostras de folha de cana-de-açúcar.

Poço 6: controle negativo (tubo de reação sem DNA).

FIGURA 10 PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 27F-16S805R DE ENDÓFITOS DE TECIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR



Eletroforese (60 V por 2 horas) em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X do produto de PCR amplificado com os oligonucleotídeos 27f-16S805r a partir de DNA extraído de colmos de cana-de-açúcar.

Poço 1: Marcador de massa molecular *Gene ruler* 1 kb DNA ladder (Fermentas).

Poço 2: CA22.

Poço 3: CA32.

Poço 4: CA33.

Poço 5: CA23

Poço 6: controle negativo (tubo de reação sem DNA)

## 5.12 CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DO GENE 16S rRNA AMPLIFICADO DE DNA EXTRAÍDO DE TECIDO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Os amplicons do gene 16S rRNA foram ligados em vetor pCR2.1 e transformados em *E. coli* DH10B. Na tabela 6 estão listadas as amostras utilizadas, o tamanho de fragmento clonado e o número de clones coletados e armazenados. Foi observada uma grande variação na eficiência de clonagem e, conseqüentemente, no número de transformantes contendo inserto. Foram coletados um mínimo de 192 clones de cada amostra, totalizando 2.112 clones de 6 amostras. O DNA do colmo da planta adulta, CA01, foi utilizado para amplificar os fragmentos amplificados de 1,5Kb e 0,8 kb do gene 16S rRNA e ambos os fragmentos foram clonados.

Como não foi possível sequenciar todas as bibliotecas do gene 16S rRNA representativas de todas as coletas (Tabela 5), priorizou-se a obtenção de bibliotecas para amostras de plantas em diferentes estágios de maturação: amostras iniciais (plantas jovens, 50 dias após plantio, amostras CA22 e CA23), amostras no final do período experimental (270 dias após o plantio, amostras CA62 e CA63) e amostras de plantas em época de colheita (CA01) (Tabela 6). Estas amostras permitiriam também avaliar a diversidade endofítica em diferentes estações e, portanto, submetidas a diferentes condições de temperatura, e regime pluviométrico.

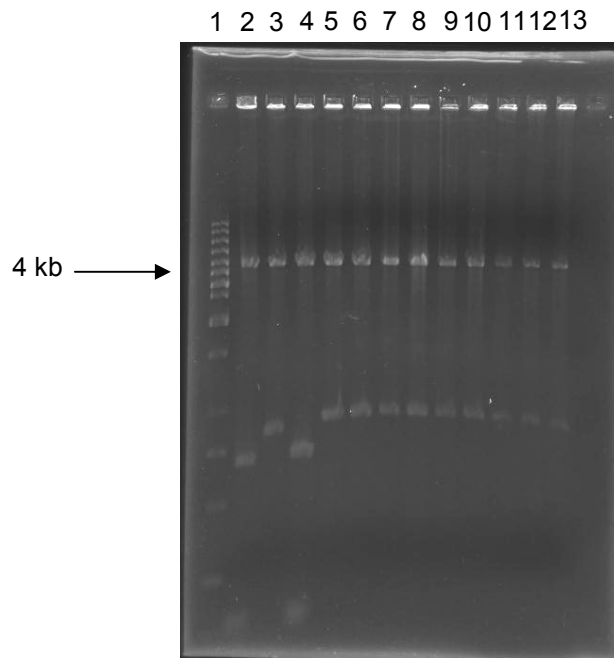
TABELA 6. BIBLIOTECAS DO GENE 16S RRNA AMPLIFICADO DE DNA EXTRAÍDO DE TECIDO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Amostra	Tamanho do fragmento clonado	Clones coletados
CA01	1,5 Kb	192
CA01	0,8 Kb	672
CA22	0,8 Kb	288
CA23	0,8 Kb	480
CA62	0,8 Kb	192
CA63	0,8 Kb	288

O fragmento de 1,5 kb foi amplificado com o par de oligonucleotídeos iniciadores 27f-1492r e o de 0,8 kb com o par 27f-16S805r

Para confirmar a clonagem e verificar o tamanho dos insertos, o DNA plasmidial de 12 clones da biblioteca CA22 foi extraído e digerido com EcoRI (Figura 10). Essa enzima foi utilizada porque o vetor no qual os produtos de PCR foram clonados (pCR 2.1) possui sítios de restrição EcoRI flanqueando o sítio de clonagem. Foram testadas 12 colônias brancas (indicando que houve a clonagem do inserto de 800 pb).

FIGURA 11 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE PRODUTOS DE RESTRIÇÃO COM *EcoRI* DOS CLONES DA BIBLIOTECA CA22 DE 16S RRNA DE CANA-DE-AÇÚCAR



Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, a 90 V por 1,5 hora do DNA plasmidial purificado e digerido com a enzima *EcoRI* de clones da biblioteca CA22.

Poço 1: Marcador de massa molecular *Gene ruler* 1 kb DNA ladder (Fermentas)

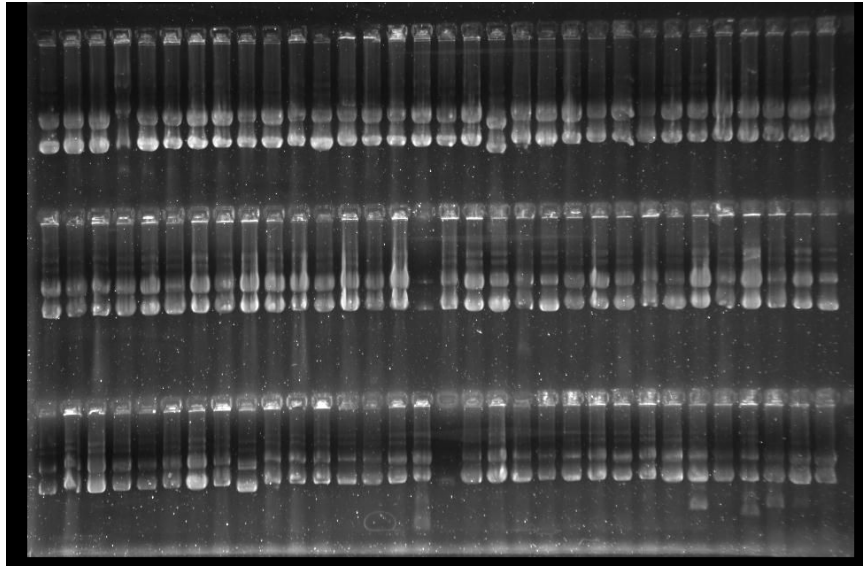
Poço 2 a 13: colônias brancas.

### 5.13 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL PARA SEQUENCIAMENTO

Para realizar as reações de sequenciamento dos genes 16S rRNA das bactérias endofíticas presentes na cana-de-açúcar, o DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina. Essa etapa é crítica para a obtenção das sequências de DNA e somente aquelas preparações contendo quantidade de plasmídio homogêneo, não degradado e livre de contaminação de DNA cromossomal e RNA foram usadas para as reações de sequenciamento (Figura 12).

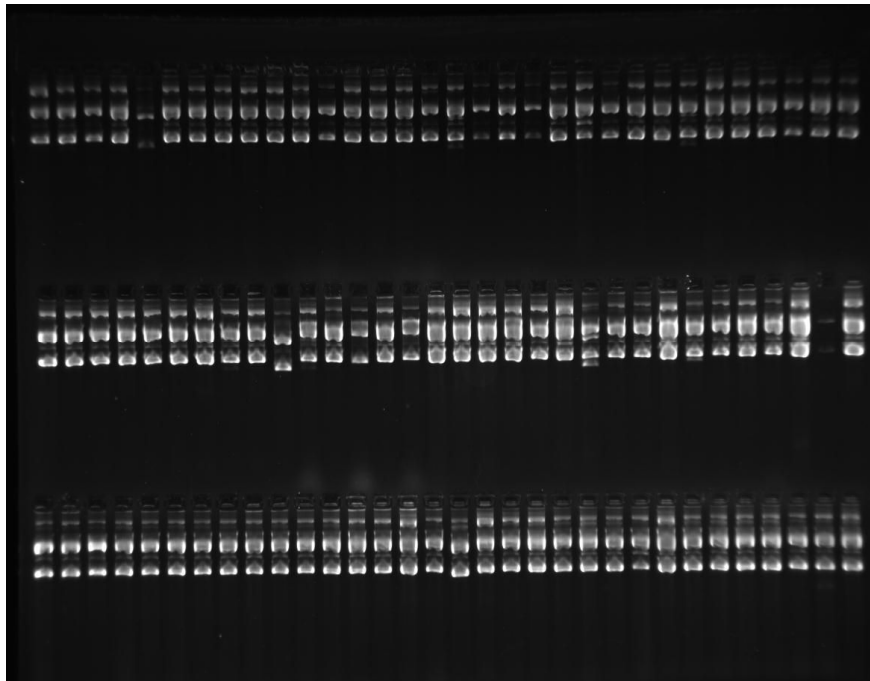
As reações de seqüenciamento das bibliotecas do gene 16S rRNA foram conduzidas em seqüenciador automático MEGABACE 1000 (GE Healthcare). A qualidade das leituras de seqüência obtidas neste aparelho é altamente sensível à pureza das amostras de DNA. Inicialmente não foram obtidas leituras de seqüências satisfatórias, sendo necessária a inclusão de uma etapa de purificação das minipreparações de plasmídeos com resina Sephadex G-50. A inclusão desta etapa resultou em aumento da qualidade do DNA sem causar perda da quantidade (Figura 13) e esse DNA foi utilizado para o sequenciamento dos clones.

FIGURA 12 DNA PLASMIDIAL PURIFICADO PARA SEQUENCIAMENTO DA BIBLIOTECA CA22



Eletroforese a 90 V em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, por 1,5 hora do DNA plasmidial obtido por lise alcalina de 96 clones da biblioteca CA22.

FIGURA 13 DNA PLASMIDIAL DA BIBLIOTECA CA22 PURIFICADO POR GEL FILTRAÇÃO EM SEPHADEX G-50



Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X, a 90 V por 1,5 hora do DNA plasmidial obtido por lise alcalina e purificado por cromatografia em SEPHADEX G-50 .



#### 5.14 SEQUENCIAMENTO DAS BIBLIOTECAS DO GENE 16S RRNA

Foram sequenciados os insertos dos clones de 6 bibliotecas diferentes (Tabela 8) a partir de DNA plasmidial extraído por lise alcalina e purificado em coluna de Sephadex G-50. Nota-se, nessa tabela 8, que o número de clones submetidos ao sequenciamento foi menor que o número de clones coletados (Tabela 6).

As bibliotecas derivadas da amostra CA01, bibliotecas CA0101 e CA0115, e demais bibliotecas sequenciadas estão listadas na Tabela 7. O número de clones sequenciados para cada biblioteca está mostrado também nessa tabela.

TABELA 7. NÚMERO DE CLONES SUBMETIDOS AO SEQUENCIAMENTO POR BIBLIOTECA

Biblioteca	Clones submetidos à reação de sequenciamento
CA0115	96 clones
CA0101	288 clones
CA2201	192 clones
CA2301	192 clones
CA6201	192 clones
CA6301	96 clones
<b>TOTAL</b>	<b>1056 clones</b>

## 5.15 ESTATÍSTICAS DE SEQUENCIAMENTO

Os eletroforetogramas gerados correspondentes aos sequenciamentos foram analisados pelo programa PHRED para chamada de bases, determinação das qualidades e eliminação das extremidades das sequências de acordo com a essa qualidade. As sequências de bases resultantes foram utilizadas para as análises de diversidade e identificação taxonômica. Foi gerado um total de 1.953 leituras de sequências, das quais 697 foram descartadas devido à falta de sinal produzido pela reação de seqüenciamento ou baixa qualidade de bases ao longo de toda a sequência (tabela 8). As 1.256 sequências restantes corresponderam a 866 clones sequenciados, com uma média de 1,45 sequência por clone (as sequências obtidas por clone variaram de 1 a 5 sequências por clone).

TABELA 8. RESUMO DO SEQUENCIAMENTO DAS BIBLIOTECAS DO GENE 16S rRNA

Bibliotecas	No. de clones sequenciados	Sequências de alta qualidade	Sequências descartadas
CA0115X	69	101 (34%)	196 (66%)
CA01011	81	81 (84,4%)	15 (15,6%)
CA01014	65	65 (72,3%)	25 (27,7%)
CA22011	88	222 (57%)	168 (43%)
CA22021	90	162 (86,2%)	26 (13,8%)
CA23013	76	76 (79,2%)	20 (20,8%)
CA23014	51	82 (42,7%)	110 (57,3%)
CA62011	82	144 (75,8%)	46 (24,2%)
CA62012	83	83 (90,2%)	9 (9,8%)
CA63012	85	144 (75,0%)	48 (25,0%)
CD01013	96	96 (74,0%)	34 (26,0%)
TOTAL	866	1256 (64,3%)	697 (35,7%)

CA0115X: placa X da biblioteca do gene 16S rRNA obtido a partir de DNA extraído de colmo de cana coletado no dia 06/06/06. Esse DNA foi amplificado com os primers 27 e 1492r e sequenciado com o primer 27f. CA01011: placa número 1 da biblioteca do gene 16S rRNA obtido a partir de DNA extraído de colmo de cana coletado no dia 06/06/06. Esse DNA foi amplificado com os primers 27 e 16805r e sequenciado com o primer 27f. CA01014: placa número 4 da biblioteca do gene 16S rRNA obtido a partir de DNA extraído de colmo de cana coletado no dia 06/06/06. Esse DNA foi amplificado com os primers 27 e 16805r e sequenciado com o primer 27f. CA22011: placa número 1 da biblioteca do gene 16S rRNA obtido a partir de DNA extraído de colmo de cana coletado no dia 16/11/06, vindo do bloco abubado com nitrogênio. Esse DNA foi amplificado com os primers 27f e 16805r e sequenciado com o primer 27f. CA22012: placa número 2 da biblioteca do gene 16S rRNA obtido a partir de DNA extraído de colmo de cana coletado no dia 16/11/06, vindo do bloco abubado com nitrogênio. Esse DNA foi amplificado com os primers 27 e 16805r e sequenciado com o primer 27f. CA23013: placa número 3 da biblioteca do gene 16S rRNA obtido a partir de DNA extraído de colmo de cana coletado no dia 16/11/06, vindo do bloco sem abubação nitrogenada. Esse DNA foi amplificado com os primers 27 e 16805r e sequenciado com o primer 27f. CA23014: placa número 4 da biblioteca do gene 16S rRNA obtido a partir de DNA extraído de colmo de cana coletado no dia 16/11/06, vindo do bloco sem abubação nitrogenada. Esse DNA foi amplificado com os primers 27 e 16805r e sequenciado com o primer 27f. CA62012: placa número 2 da biblioteca do gene 16S rRNA obtido a partir de DNA extraído de colmo de cana coletado no dia 26/06/07, vindo do bloco com abubação nitrogenada. Esse DNA foi amplificado com os primers 27 e 16805r e sequenciado com o primer 27f. CA63012: placa número 2 da biblioteca do gene 16S rRNA obtido a partir

de DNA extraído de colmo de cana coletado no dia 26/06/07, vindo do bloco sem abubação nitrogenada. Esse DNA foi amplificado com os primers 27 e 16805r e sequenciado com o primer 27f. CD01013: placa número 3 da biblioteca do gene 16S rRNA obtido a partir de DNA extraído de colmo de cana coletado no dia 06/06/06. Esse DNA foi amplificado com os primers 27 e 16805r e sequenciado com o primer 27f.

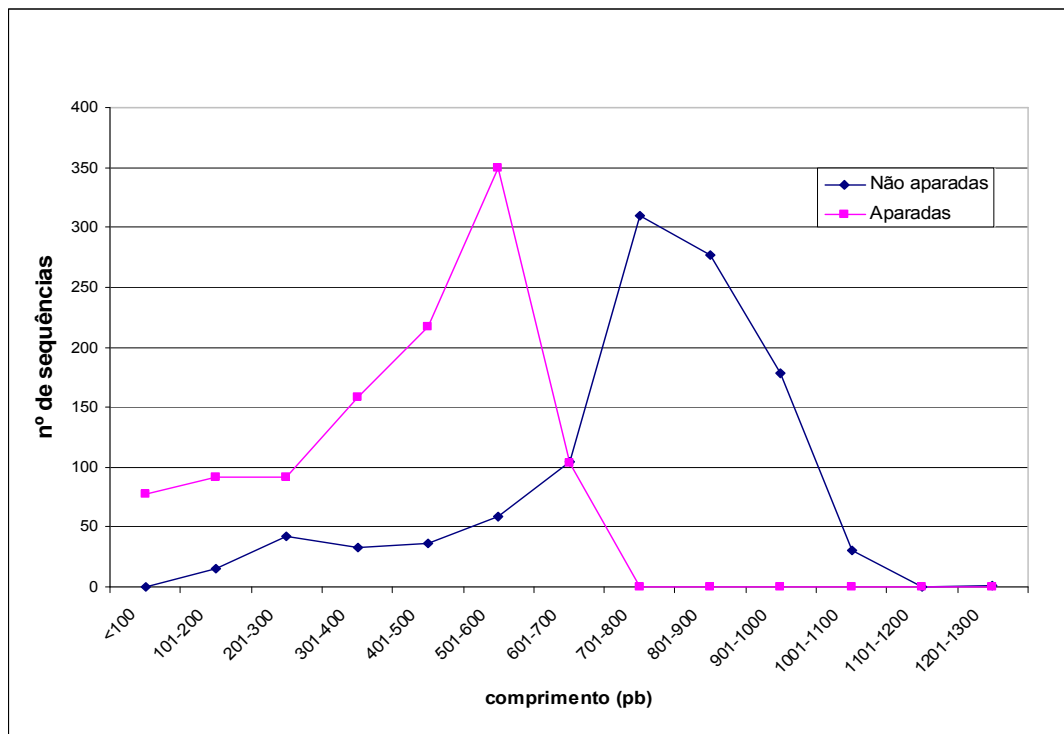
### 5.15.1 ANÁLISES DE QUALIDADE

Após a avaliação da qualidade pelo programa PHRED, as regiões de sequência de baixa qualidade das extremidades das sequências dos insertos foram retiradas ou aparadas (*trimming*). A figura 14 mostra a distribuição dos comprimentos (pb) das sequências não editadas e após edição das bibliotecas do gene 16S rRNA. Essas sequências foram aparadas utilizando a opção “-trim\_alt” do programa PHRED. No total foram analisadas 1.256 sequências. Essa etapa causou a perda de, aproximadamente, 300 pb em cada sequência.

Não houve perda significativa de bases de alta qualidade ( $\geq 20$ ) quando as sequências foram aparadas (figura 15), mas houve um aumento na qualidade média das bases em cada sequência (figura 16) confirmando que as bases retiradas foram bases de baixa qualidade.

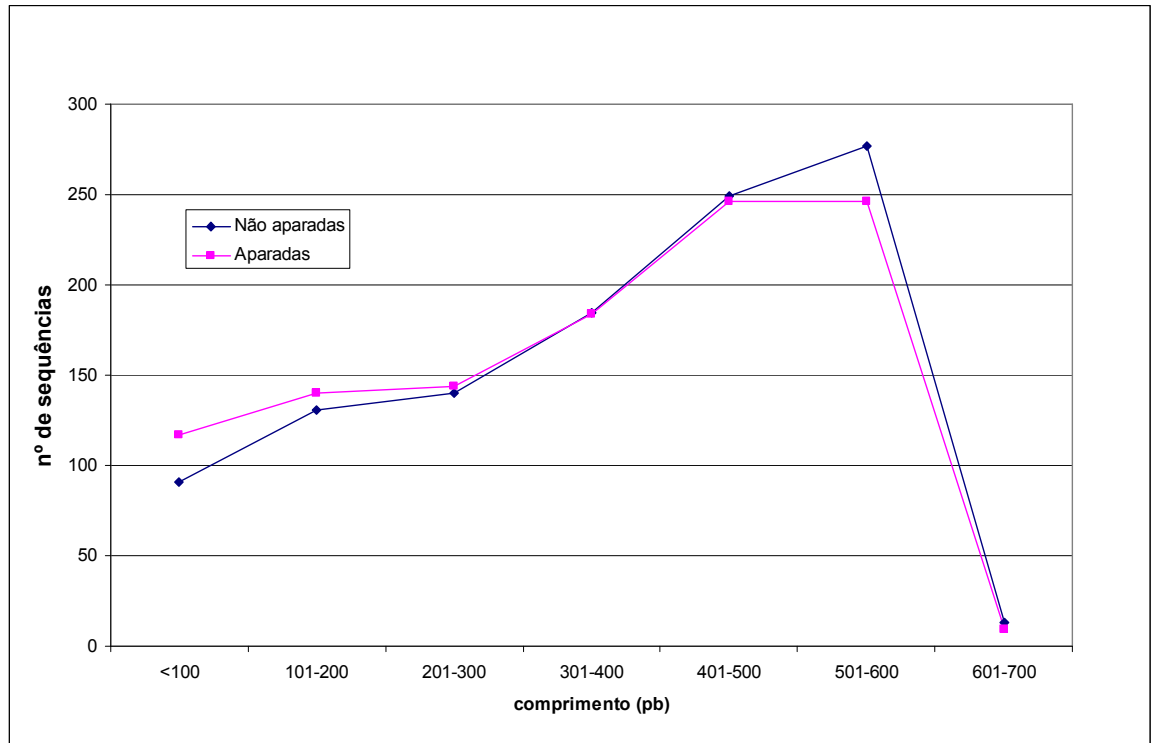
Essas sequências aparadas foram usadas nas análises posteriores.

FIGURA 14. DISTRIBUIÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE SEQUÊNCIA



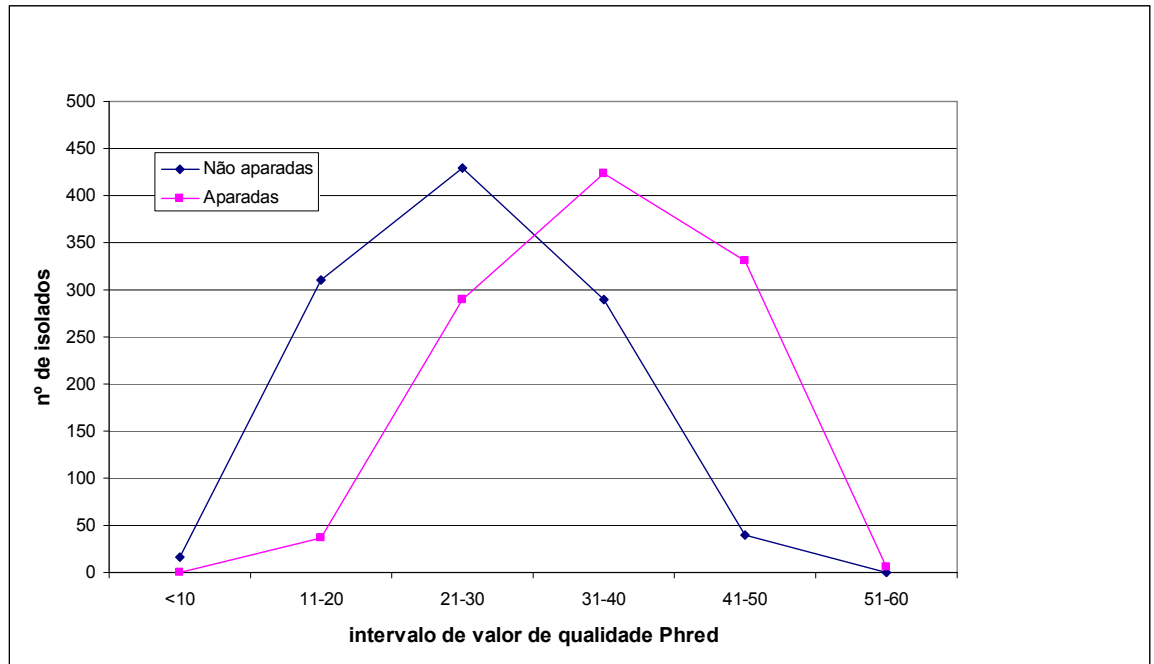
Distribuição dos comprimentos das seqüências não editadas e após edição pelo programa PHRED. No eixo X estão os comprimentos das seqüências (em pb) e no eixo Y o número de seqüências.

FIGURA 15 .DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS SEQUÊNCIAS COM VALOR DE PHRED &gt;20



Comparação entre seqüências aparadas e não aparadas com valor médio de PHRED>20.

FIGURA 16. DISTRIBUIÇÃO SEQUÊNCIAS DE ACORDO COM VALOR PHRED DE QUALIDADE.



Análise dos valores PHRED de qualidade com as sequências aparadas e não aparadas.



## 5.16 COMPARAÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS OBTIDAS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS PRESENTES NA CANA DE AÇÚCAR COM BANCO DE DADOS

As sequências de nucleotídeos de alta qualidade foram comparadas com o banco de dados Genbank utilizando o programa BLASTn ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e o programa *Seqmatch* do banco de dados RDP II (<http://rdp.cme.msu.edu/>), que faz uma busca por sequências de alta identidade com as sequências alvo. Foram analisadas sequências das amostras CA01, CA22, CA23, CA62 e CA63 (Tabela 8).

### 5.16.1 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE 16S rRNA DA AMOSTRA CA01

#### 5.16.1.1 ANÁLISE PELO PROGRAMA BLASTn

Foram analisadas 186 sequências do gene 16S rRNA da amostra CA01 (Anexo Tabela 1). Dessas, 157 são de bibliotecas construídas a partir de produto de PCR amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores 27f-16S805r (tabela 9) e 29 são de inserto de 1500 pb clonado, a partir de amplificação com os primers universais 27f-1492r (Tabela 10). O comprimento das sequências variou de 344 pb a 654 pb.

Todos os clones apresentaram identidade maior que 90% com pelo menos uma sequência do Genbank. A maioria (150 clones – 92,6%) dos clones de 16S rRNA foram classificados na classe  $\gamma$ -Proteobacteria. As duas famílias encontradas foram Pseudomonadaceae e Enterobacteriaceae. O gênero mais frequentemente encontrado foi *Pseudomonas*, com 80 clones com identidade de sequência entre 90-100% com as sequências do banco de dados Genbank. A família Enterobacteriaceae está representada com 69 clones. Entre esses, 34 clones foram identificados como do

gênero *Enterobacter*, 14 como *Pantoea*, 2 como *Citrobacter* e 1 como *Klebsiella*.

Os demais clones (6,7% do total) apresentaram a maior identidade com sequências de bactérias não cultivadas e foram então classificadas, em diversos táxons, por comparações com o Genbank.

TABELA 9. IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR DA BIBLIOTECA CA0101 COM BASE NA SEQUÊNCIA DO GENE 16S RNA

OTU	CLONES	IDENTIFICAÇÃO	NÚMERO DE ACESSO	% DE IDENTIDADE <sup>1</sup>	COBERTURA DO QUERY <sup>1</sup>
1	1	<i>Enterobacter</i> sp	FJ784695.1	97%	98%
6	2	<i>Enterobacter</i> sp.	EU653006.1	98%	99%
22	1	<i>Enterobacter</i> sp	FJ870557.1	97%	100%
7	4	<i>Enterobacter ludwigii</i>	GQ380575.1	98%	99%
10	12	<i>Enterobacter ludwigii</i>	FJ859683.1	99%	100%
17	3	<i>Enterobacter cloacae</i>	EF219421.2	99%	100%
9	1	<i>Pantoea</i> sp.	EU887713.1	99%	99%
13	6	<i>Pantoea agglomerans</i>	FJ603033.1	100%	100%
20	2	<i>Pantoea agglomerans</i>	EU931561.1	98%	99%
3	1	Uncultured <i>Pantoea</i> sp.	FJ193637.1	100%	100%
5	7	<i>Pantoea dispersa</i>	GQ246183.1	96%	99%
11	1	Uncultured <i>Serratia</i> sp.	DQ279305.1	100%	99%
18	48	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	GQ301534.1	98%	100%
21	5	<i>Pseudomonas putida</i>	DQ482656.1	99%	100%
25	2	<i>Pseudomonas</i> sp.	EF581816.1	90%	100%
26	1	<i>Pseudomonas</i> sp.	AB508856.1	94%	97%
28	16	<i>Pseudomonas</i> sp.	FJ577973.1	94%	98%
31	1	<i>Pseudomonas</i> sp.	FJ719329.1	98%	98%
33	1	<i>Pseudomonas</i> sp.	FN421341.1	99%	99%
35	2	<i>Pseudomonas</i> sp.	EU580707.1	99%	100%
29	1	Uncultured <i>Pseudomonadaceae</i>	EU721823.1	96%	100%
19	2	<i>Citrobacter freundii</i> <sup>2</sup>	GQ983053.1	98%	100%
23	16	<i>Enterobacteriaceae</i> <sup>2</sup>	EU272859.1	99%	99%
2	1	<i>Enterobacter</i> sp <sup>2</sup>	FN433019.1	88%	70%
4	1	<i>Pantoea ananatis</i> <sup>2</sup>	AY579212.1	98%	100%
12	2	<i>Enterobacter cloacae</i> <sup>2</sup>	AB244469.1	99%	100%
8	1	<i>Klebsiella oxytoca</i> <sup>2</sup>	GU003834.1	99%	100%
14	5	<i>Enterobacter</i> sp <sup>2</sup>	GQ360072.1	92%	87%
15	2	<i>Enterobacteriaceae</i> <sup>2</sup>	DQ068793.1	99%	100%
16	4	<i>Enterobacter</i> sp <sup>2</sup>	GQ062425.1	99%	99%
27	1	<i>Enterobacteriaceae</i> <sup>2</sup>	DQ221401.1	96%	100%
30	1	<i>Pseudomonas</i> sp <sup>2</sup>	EF581815.1	90%	78%
34	3	<i>Pseudomonas</i> sp <sup>2</sup>	EF179816.1	99%	99%

<sup>1</sup> Para as sequências tiveram alta identidade com mais de um clone, os valores de identidade e cobertura (da *query* em relação à sequência do banco de dados) são uma média das porcentagens de identidade e cobertura apresentadas pelos clones individualmente <sup>2</sup> Sequências anotadas como bactérias não cultivadas foram classificadas em taxons baseando-se em comparações com o Genbank.

TABELA 10. IDENTIFICAÇÃO COM BASE NA SEQUÊNCIA DO GENE 16S rRNA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR DA BIBLIOTECA CA0115

IDENTIFICAÇÃO	NÚMERO DE ACESSO NO GENBANK	NÚMERO DE CLONES	IDENTIDADE	COBERTURA DO QUERY
<i>Pseudomonas putida</i>	GQ240852.1	1	99%	98%
<i>Pseudomonas plecossida</i>	EF600884	1	98%	99%
<i>Pseudomonas monteilli</i>	GQ284481.1	1	98%	100%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DQ318225.1	1	97%	99%
<i>Pseudomonas</i> sp	GQ 284541.1	8	99%	99%
<i>Pseudomonas</i> sp	GQ 284545.1	11	99%	98%
<i>Pseudomonas</i> sp	FJ719329.1	1	98%	97%
<i>Pseudomonas</i> sp	FJ646635.2	1	97%	100%
Uncultured <i>Citrobacter</i>	GQ130029.1	1	100%	100%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	GQ144701.1	1	98%	100%
<i>Stenotrophomonas</i> sp	AB461796.1	1	99%	98%
<i>Enterobacter</i> sp	EU693574.1	1	96%	99%
<b>TOTAL DE CLONES</b>		29		

### 5.16.2 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA CA22

Foram obtidas sequências de 86 clones do gene 16S rRNA amplificado da amostra CA22. Essa biblioteca foi feita com produtos de PCR amplificados a partir do colmo de cana-de-açúcar com 50 dias após plantio e que recebeu adubação nitrogenada. Como observado na tabela 11, a maior parte das sequências apresentou um tamanho entre 400 e 600 pb, sendo 36 sequências com comprimento de entre 401 e 500 pb e 27 entre de 501 e 600 pares de base.

TABELA 11. RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DA AMOSTRA CA22

Comprimento (pb)	Número de sequências
100-200	5
201-300	4
301-400	5
401-500	36
501-600	27
>600	9

Apenas 3 sequências apresentaram semelhança com 16S rRNA bacteriano, que corresponde a sequências de  $\alpha$ -proteobactérias da espécie *Asaia bogorensis*, *Devosia* sp e *Roseomonas* sp.

Quando comparadas com o Genbank, a maioria das sequências obtidas apresentou alta identidade (~97%) com sequências de gene 18S rRNA mitocondrial. Sabe-se que os ribossomos mitocondriais das plantas contem RNA ribossomal 5S, 18S e 26S e que estes rRNAs são similares aos RNAs de bactérias e cloroplastos (NEWTON, 1988). Na lista de *hits* extraída do programa, apareceram também sequências de 16S rDNA de diversas bactérias, principalmente de bactérias não cultiváveis (tabela 17 – Anexo). Baseando-se nessas informações, estas sequências foram consideradas prováveis produtos de amplificação do gene 18S rRNA de cana-de-açúcar. A amplificação do gene 18S rRNA mitocondrial não era esperada porque a eletroforese dos produtos de PCR mostrou a presença apenas de um fragmento. Entretanto, a comparação da sequência dos oligonucleotídeos iniciadores 27f e 16S805r com a sequência do gene 18S rRNA de *Sorghum bicolor* confirmou a

possibilidade de amplificação do gene mitocondrial. A maior parte dos alinhamentos com sequências de DNA mitocondrial mostraram uma alta identidade com sequências de mitocôndria de *S. bicolor*.

Análises com o programa *Seqmatch* mostraram resultados semelhantes, com uma alta prevalência de sequências de mitocôndria similares às sequências dos clones. Uma análise comparativa das sequências do gene 16S rRNA de *E. coli* e 18S rRNA de mitocôndria de *Sorghum bicolor* foi realizada a fim de verificar essa possibilidade de amplificação do DNA. Essa análise apontou a presença de regiões conservadas para estes genes nos locais de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores usados para amplificação (Figura 17). Através destas sequências foi possível inferir a amplificação de 1.503pb e 1.917pb para *E. coli* e *S. bicolor*, respectivamente, com os pares de oligonucleotídeos iniciadores 27f/1492r. Para o par 27f/16S805r os fragmentos são de 798pb e 831pb.

FIGURA 17. ALINHAMENTO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DOS GENES DE 18S RRNA DE MITOCÔNDRIA DE *Sorghum bicolor* (N<sup>o</sup>. DE ACESSO NO GENBANK, DQ984518) E DE 16S rRNA DE *Escherichia coli* (N<sup>o</sup>. DE ACESSO NO GENBANK, NC\_000913).

```

          10      20      30      40      50      60      70
S. bicolor  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
E. coli     -----aaattgaagagtttgatcattggctcagattgaaagctggcggcaggcctaacaacatgcaag
          80      90      100     110     120     130     140
          27f
S. bicolor  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
E. coli     tcgaacgctgttttcggggagctgggcagaaggaaaagagctcctagctaaagttgtctcgccctgctt
          150     160     170     180     190     200     210
S. bicolor  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
E. coli     caaaactacagggcgcgc-tacggctttgacctactccgtttgctggaatcggaa--tagttgagaa
          220     230     240     250     260     270     280
S. bicolor  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
E. coli     caaagtgccgaaagggtgcgtaaocgctgggaaactgcccgaacagttccggccaaatcctgaagaaagct
          290     300     310     320     330     340     350
S. bicolor  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
E. coli     taaogtccg-aa--gacc--aaagaggggga-----cc-----ttcgggcc--tcttg-----
          360     370     380     390     400     410     420
S. bicolor  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
E. coli     caaaagcgtctgtttgatgagcctgcgtagtaattaggtagttggtcaggttaaaggctgaccaagccaatga
          360     370     380     390     400     410     420
S. bicolor  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
E. coli     ccat--cg-----gatgtgccagatgggattagctagtaggtggggtaacggctcacctaggcgacga
          430     440     450     460     470     480     490
S. bicolor  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
E. coli     tgccttagctggctcttttcggatgatcagccacactgggactgagacacggcccggactcccaacggggggc
          430     440     450     460     470     480     490
S. bicolor  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
E. coli     tccttagctggctctgagaggatgaccagccacactggaactgagacacggtccagactcctacgggaggc
          500     510     520     530     540     550     560
S. bicolor  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
E. coli     agcagtggggaatctttgacaatgggcgaaaagcccgatccagcaatatcgcgtgagtgaaagaaggcaat
          500     510     520     530     540     550     560
S. bicolor  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
E. coli     agcagtggggaatattgcacaatgggcgcaagcctgatgcagccatgccgcgtgtatgaagaaggcc--t
          570     580     590     600     610     620     630
S. bicolor  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
E. coli     gccgcttgtaaagctctttcgtcg-----agtgcgcga-----tcat-gacaggactc
          570     580     590     600     610     620     630
S. bicolor  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
E. coli     tcgggttgtaaagtactttcagcggggaggaaaggagtaaagttaatacctttgctcattgacgttacc
          570     580     590     600     610     620     630
S. bicolor  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
E. coli     gaggaagaagcccggctaactccgtgccagcagccgcggtaaagcgggggggcaagtgttcttcggaa
          570     580     590     600     610     620     630
S. bicolor  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
E. coli     gcagaagaagcaccggctaactccgtgccagcagccgcggttaatacggagggtgcaagcgttaatcggaa

```

```

        640      650      660      670      680      690      700
S. bicolor   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli      tgactgggctaaagggcacgtaggaggtaatcgggttgaaagtgaagtgcg---caaaaagtggcgg
              ttactgggctaaagggcacgcagggggtttgttaagtcagatgtgaaatccccgggctcaacctgg-ga

        710      720      730      740      750      760      770
S. bicolor   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli      aatgc-tctcgaaac---caattcacttgagtgagacagaggagagtggaatttcggtgtgtaggggtgaa
              actgcatct-gatactggcaag---cttgagtctcgtagaggggggtagaattccagggtgtaggggtgaa

        780      790      800      810      820      830      840
S. bicolor   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli      atccgtagatctacgaaggaaagccaaaagcgaaggcagctctctgggtccctaccgacgctgggggtgcg
              atggttagagatctggaggaaataccgggtggcgaaggcggccccctggacgaagactgacgctcagggtgcg

        850      860      870      880      890      900      910
S. bicolor   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli      aaagcatggggagcgaacaggattagataccctggtagtccatgccgtaaacgatga-gtgttcgccctt
              aaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaacgatgtcgaacttgagggtt
              16S805r

        920      930      940      950      960      970      980
S. bicolor   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli      g-gtctacgcggatcaggggccc-agctaacgcggtgaaacactccgcctggggagtacggtcgcaagacc
              gtgcccttgaggcgtggcttccggagctaacgcggttaagtcgacgccctggggagtacggccgcaagggtt

        990      1000     1010     1020     1030     1040     1050
S. bicolor   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli      gaaactcaaggaattgacgggggctgcacaagcgggtggagcatgtggtttaattcgatacaacgcgca
              aaaactcaaatgaattgacgggggcccgcacaagcgggtggagcatgtggtttaattcgatgcaacgcgaa

        1060     1070     1080     1090     1100     1110     1120
S. bicolor   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli      aaaccttaccagcccttgacatatgaacaaacaaacctgtccttaaccggatgggtac--t---ga-cttt
              gaaccttacctggtcttgacat-----ccaaggagttttcagagatgagaatgtgccttcgggaacctt

        1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190
S. bicolor   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli      catacagggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgtttggtcaagtccataaacgagcgaa
              gagacagggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgtttgtaaatgtttgggttaagtccccgcaacgagcgca

        1200     1210     1220     1230     1240     1250     1260
S. bicolor   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli      accctcgttttgtgttgctgagacatgcgcctaaaggagaaatagccgaggagccgagtgacgtgccagcg
              acccttatcctttgttgc-----cagcgg

        1270     1280     1290     1300     1310     1320     1330
S. bicolor   .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli      ctactacttgattgagtgccagcacgtagctgtgctttcagcaagaatttcaaccattgggagccggtgcc
              -----gt-----cggg-----

```



```

          1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400
S. bicolor  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli     tttcgaagcactttcacggtgtgaaccgaagtctgtccttccgaaactcaagacccaaggagacctacctata
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. bicolor  gtgacgtcaaagtaccagtgagcatggaggtttggttaggcttggttacgagtcgagttggcggcgagg
E. coli     -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470
S. bicolor  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli     aagactcggcatgaaggccaagccgcccggtggtgtggtacgtagtggttaatagtacgcgccccgctccga
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. bicolor  aagactcggcatgaaggccaagccgcccggtggtgtggtacgtagtggttaatagtacgcgccccgctccga
E. coli     a-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          1480      1490      1500      1510      1520      1530      1540
S. bicolor  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli     aagactcggcatgaaggccaagccgcccggtggtgtggtacgtagtggttaatagtacgcgccccgctccga
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. bicolor  aagactcggcatgaaggccaagccgcccggtggtgtggtacgtagtggttaatagtacgcgccccgctccga
E. coli     a-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          1550      1560      1570      1580      1590      1600      1610
S. bicolor  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli     aacaaagaaaaagggtgctgtccgcactcacgagggactgccagtgagatactggaggaagggtggggatga
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. bicolor  aacaaagaaaaagggtgctgtccgcactcacgagggactgccagtgagatactggaggaagggtggggatga
E. coli     -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
S. bicolor  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli     cgtcaagtcgcgatggcccttatgggctgggccacacacgtgctacaatggcaatgacaaatgggaagcaa
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. bicolor  cgtcaagtcgcgatggcccttatgggctgggccacacacgtgctacaatggcaatgacaaatgggaagcaa
E. coli     cgtcaagtcgcgatggcccttatgggctgggccacacacgtgctacaatggcgcatacaaaagagaagcga
          1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750
S. bicolor  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli     ggctgtaaggcggagcgaatccggaaagattgctctc--agttoggattgttctctgcaactcgggaacat
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. bicolor  ggctgtaaggcggagcgaatccggaaagattgctctc--agttoggattgttctctgcaactcgggaacat
E. coli     cctcgcgagagcaagcggg--cctcataaaagtgcgctcgtagtcoggattggagctctgcaactcgcactccat
          1760      1770      1780      1790      1800      1810      1820
S. bicolor  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli     gaagttgaaatcgctagtaatcggggatcagcatgccgcggtgaatatgtaccggggccctgtacacacc
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. bicolor  gaagttgaaatcgctagtaatcggggatcagcatgccgcggtgaatatgtaccggggccctgtacacacc
E. coli     gaagtcggaaatcgctagtaatcgtggatcagaatgccacggtgaatacgttccggggccctgtacacacc
          1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890
S. bicolor  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli     gccggtcacaccctgggaaattggtttcggccgaagcatcggaccaatgatcacccatgacttctgtgtac
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. bicolor  gccggtcacaccctgggaaattggtttcggccgaagcatcggaccaatgatcacccatgacttctgtgtac
E. coli     gccggtcacaccatggggagtggtttgcaaaaagaagta--gg-----|-----|-----|tagctt-----
          1900      1910      1920      1930      1940      1950      1960
S. bicolor  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli     cactagtgccacaaaggcccttgggtggtccttattggcgcataaccacggtggggctttcgaactggggtgaa
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. bicolor  cactagtgccacaaaggcccttgggtggtccttattggcgcataaccacggtggggctttcgaactggggtgaa
E. coli     -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          1970      1980      1990      2000
S. bicolor  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
E. coli     gtcgtaacaaggtagccgtaggggaacctgtggctggattgaatcc---
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
S. bicolor  gtcgtaacaaggtagccgtaggggaacctgtggctggattgaatcc---
E. coli     gtcgtaacaaggtaaccgtaggggaacctgcggttgatcacctcctta
          1492r

```

### 5.16.3 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA CA23

Foram sequenciados 127 clones da amostra CA23. Essa biblioteca foi feita com produtos de PCR amplificados a partir do colmo de cana-de-açúcar com 50 dias após plantio, do bloco que não recebeu adubação nitrogenada. A maior parte das sequências apresentou entre 301 e 600 pb, sendo 15 entre 301 e 400 pb, 9 entre 401 e 500 pb e 26 entre 501 e 600 pb (Tabela 12).

TABELA 12. RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DA AMOSTRA CA23

Tamanho de sequência	Número de sequências
0-100 pb	4
100-200 pb	12
201-300 pb	19
301-400 pb	22
401-500 pb	15
501-600 pb	51
>600 pb	4

Nessa biblioteca também houve uma grande prevalência (98,5%) de sequências com alta identidade com a sequência do gene 18S rRNA de mitocôndria (mais de 97% de identidade). Da mesma maneira que a biblioteca CA22, as análises feitas pelo programa BLASTn mostraram muitas sequências de genes 18S rRNA de mitocôndrias de diversas plantas (Tabela 3 Anexo).

Uma das sequências possui alta identidade (98%) com uma sequência de uma  $\alpha$ -Proteobacteria do gênero *Asaia* sp. e outra similar a uma Phyllobacteriaceae ( $\alpha$ -Proteobacteria). Esses resultados também foram confirmados por análises com programa *Seqmatch* do RDP.

#### 5.16.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA CA62

Essa biblioteca é do colmo de cana-de-açúcar com aproximadamente 9 meses após o plantio (270 dias após plantio). Foram obtidas 156 sequências dessa biblioteca, com comprimento entre 204 a 633pb, considerando valores de PHRED  $\geq 20$ . A distribuição das sequências e seus tamanhos estão mostrados (Tabela 13).

TABELA 13. RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DA AMOSTRA CA62

Tamanho de sequência	Número de sequências
200-300 pb	8
301-400 pb	17
401-500 pb	31
501-600 pb	83
>600 pb	17

A análise realizada no programa BLAST mostrou a existência de bactérias não cultivadas (2), com identidade igual ou maior que 97%, a uma  $\beta$ -proteobactéria da família Alcaligenaceae (98% de identidade) e de uma sequência similar à sequências de uma  $\alpha$ -proteobactéria da família Rhizobiaceae (97%).

Também foram observadas várias sequências homólogas à sequência de 18S rRNA de DNA mitocôndria, com mais de 97% de identidade (Tabela 19 – Anexo) e foram desconsideradas para as análises filogenéticas.

#### 5.16.5 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S rRNA DA AMOSTRA CA63

Essa biblioteca de 16S rRNA é do colmo de cana-de-açúcar com aproximadamente 9 meses após plantio (270 DAP - dias após plantio), e que não recebeu adubação nitrogenada. Foram obtidas 79 sequências dessa biblioteca, com comprimento de sequência de 147 a 662pb, com valor PHRED  $\geq 20$ . A distribuição das

sequências e seus tamanhos estão mostrados (Tabela 14).

TABELA 14. RESULTADOS DO SEQUENCIAMENTO DA AMOSTRA CA63

Tamanho de sequência	Número de sequências
<200	5
200-300 pb	5
301-400 pb	2
401-500 pb	12
501-600 pb	35
>600 pb	20

Nessa biblioteca foram encontradas sequências 2 homólogas às sequências de bactérias relacionadas à família Rhizobiaceae (99% de identidade). Foi encontrada também uma bactéria não-cultivável.

#### 5.17 ANÁLISES FILOGENÉTICAS DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR OBTIDAS POR MÉTODO INDEPENDENTE DE CULTIVO

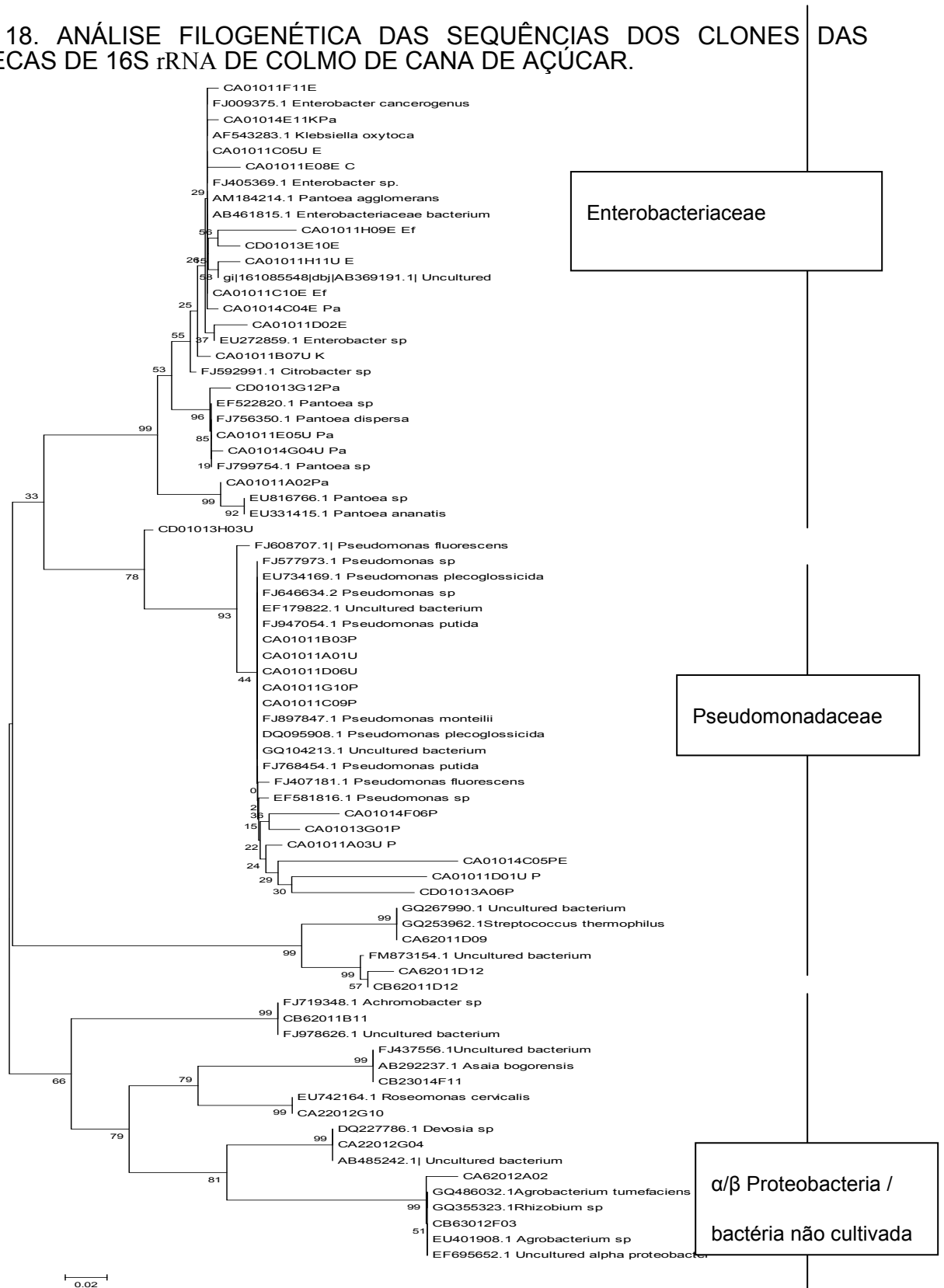
A fim de se estabelecer o posicionamento filogenético das bactérias encontradas em colmo de cana-de-açúcar, as sequências dos clones que apresentaram alta identidade com gene 16S rRNA de bactérias do banco de dados foram utilizadas para proceder as análises filogenéticas. Nessas análises foram utilizadas sequências de todas as bibliotecas (157 da biblioteca CA0101, 29 da biblioteca CA0115, 3 da biblioteca CA22, 1 da CA23, 2 da CA62 e 3 da CA63).

Inicialmente as sequências foram alinhadas pelo programa ClustalW, disponível no programa BioEdit. Em seguida, esse alinhamento foi salvo em formato FASTA e utilizado pelo programa MEGA4 para a construção das árvores, através do método *neighbor-joining*. A árvore filogenética obtida, com as 195 sequências dos clones, não mostrou ramos e grupos confiáveis (valores de *bootstrap* muito baixos).

Para melhorar a análise, foram utilizadas na árvore apenas uma ou duas sequências representativas de cada UTO (definidas como sequências que apresentaram a mais alta identidade com uma mesma sequência do banco de dados) (Tabela 9, 10 e 16). O resultado dessa análise (Figura 18) mostra claramente o posicionamento das sequências em três grupos distintos: um com representantes da família Pseudomonadaceae, um relacionado à família Enterobacteriaceae e outro com clones com identidade com  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria e bactérias não cultivadas. Nesse último, o clone CA62011D09 agrupou com uma sequência de uma bactéria não cultivável e com uma sequência do gênero *Streptococcus*, ambas são resultados da análise com o programa BLASTn. As sequências dos clones CB62011B11, CB2304F11 e CA22012G04 são semelhantes às sequências de 16S rRNA de  $\alpha$ -Proteobactéria e de bactérias não-cultivadas.

Com o objetivo de melhorar a análise e dar maior confiabilidade aos grupos e ramos formados, foram construídas árvores com cada subgrupo separadamente.

FIGURA 18. ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SEQUÊNCIAS DOS CLONES DAS BIBLIOTECAS DE 16S rRNA DE COLMO DE CANA DE AÇÚCAR.



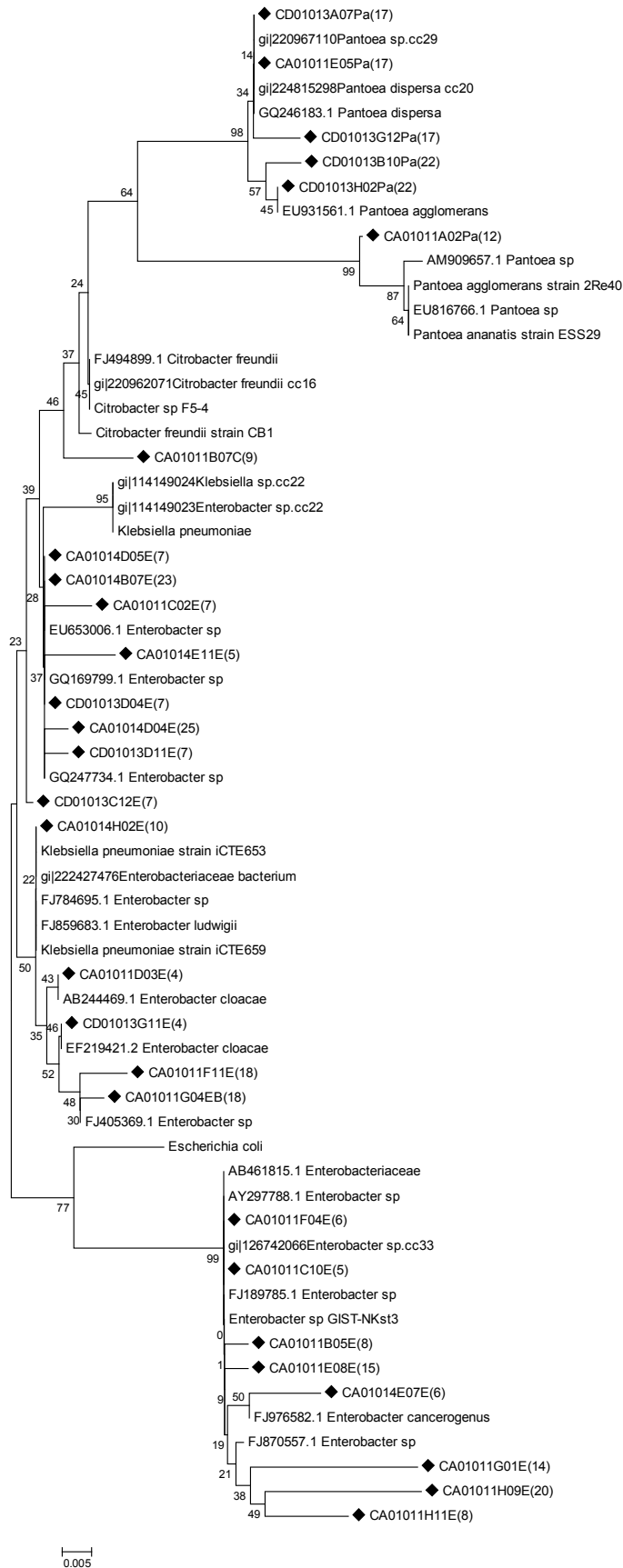
Legenda da Figura 18: Esta árvore filogenética foi construída usando o método *neighbour-joining* a partir de distâncias calculadas pelo método de Jukes e Cantor (SAITOU e NEI, 1987). A árvore não possui raiz. Os valores nos ramos representam porcentagens em relação às 2.000 amostragens *bootstrap*.

Na primeira reconstrução filogenética (019) estão as sequências dos clones relacionados à família Enterobacteriaceae e sequências relacionadas, obtidas no banco de dados do Genbank. De cada UTO foram usadas uma ou duas sequências dos clones para fazer a análise.

Os resultados indicam que esse grupo foi dividido em 3 subgrupos, sendo um deles próximo a bactérias do gênero *Pantoea* sp (CD01013G12, CD01013A07, CA01011E05, CD1013B10, CD1013H02, CA01011A02). As letras “Pa” colocadas após os nomes dos clones indicam o resultado da pesquisa de homologia, ou seja, que essas sequências foram similares a sequências do gênero *Pantoea* sp. e o número em parênteses indica a sequência do banco de dados que apresentou maior identidade. O clone CA01011B07 cuja sequência possui alta identidade com sequências de 16S rRNA de *Klebsiella oxytoca*, ficou entre os grupos de *Klebsiella* sp e de *Citrobacter* sp. As sequências relacionadas aos gêneros *Enterobacter* sp e *Klebsiella* sp foram agrupadas em ramos distintos. Os grupos formados foram também aqui condizentes com os resultados das análises do BLASTn.

A figura 20 mostra a reconstrução filogenéticas das sequências relacionadas à família Pseudomonadaceae. Foram escolhidas apenas algumas sequências representativas desse grupo. Grande parte das sequências das bibliotecas de colmo de cana de açúcar formaram grupos próprios, como por ex., os clones CA01014C05, CD0103A06, CD01013A05, CA01011D01, CA01014F06, CA01013G01 e CD1013C01. Os clones CD01013D03, CD01013E02 e CD01013E05 também formaram um ramo à parte. Já os clones CA01011B10, CA01011D06, CA01011A03, CA01011A01, CA01011G10, CA01011D08 e CA01011D05 formaram grupos incluindo sequências do banco de dados.

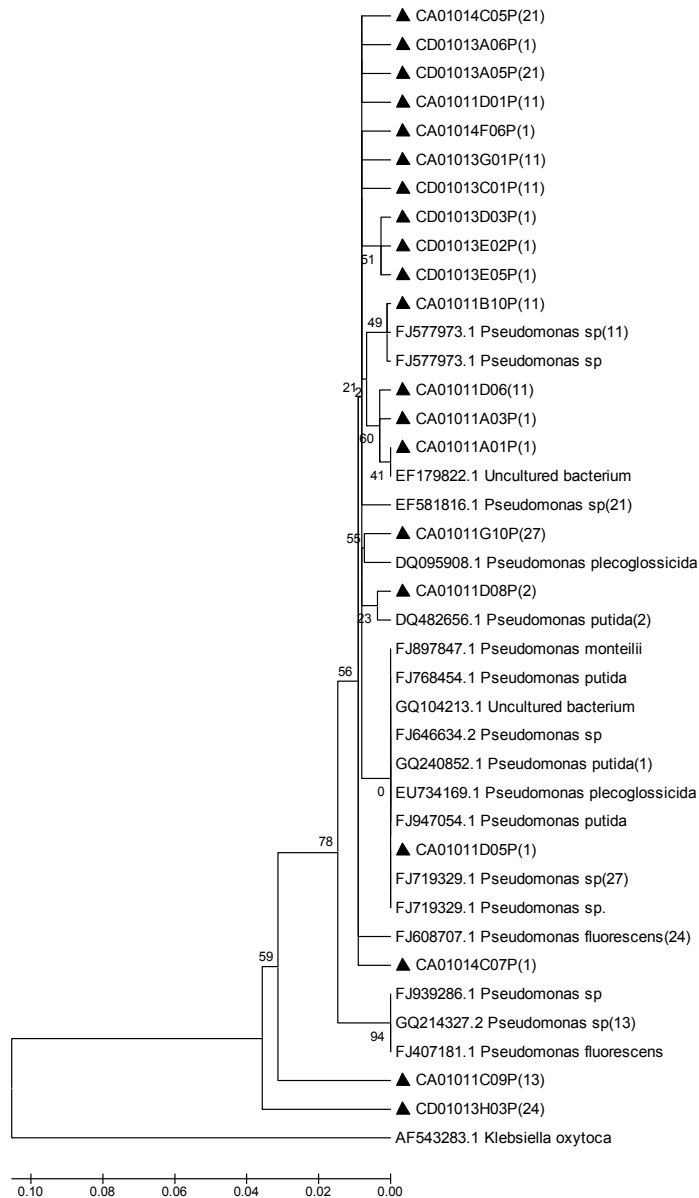
FIGURA 19. ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SEQUÊNCIAS DOS CLONES DAS BIBLIOTECAS DE 16S rRNA DE COLMO DE CANA DE AÇÚCAR IDENTIFICADOS COMO ENTEROBACTÉRIAS.





Esta árvore filogenética foi construída usando o método *Neighbour-Joining* a partir de distâncias calculadas pelo método de Jukes e Cantor. A árvore não possui raiz. Os valores nos ramos representam porcentagens em relação às 2.000 amostragens *bootstrap*. As sequências dos clones estão indicadas com um ♦, e as sequências do Genbank tem o número de acesso anteriormente ao nome do organismo. Após o nome do clone (código com 10 letras) há uma letra ou uma sílaba que indicam a identificação de acordo com o programa BLASTn. As sílabas PA indicam alta identidade com *Pantoea* sp, a letra C indica identidade com sequências de *Citrobacter* sp, a letra E com *Enterobacter* sp e EB indica identidade com sequências identificadas como da família Enterobacteriaceae. Após essa letra o número em parênteses indica a UTO a que corresponde essa sequência.

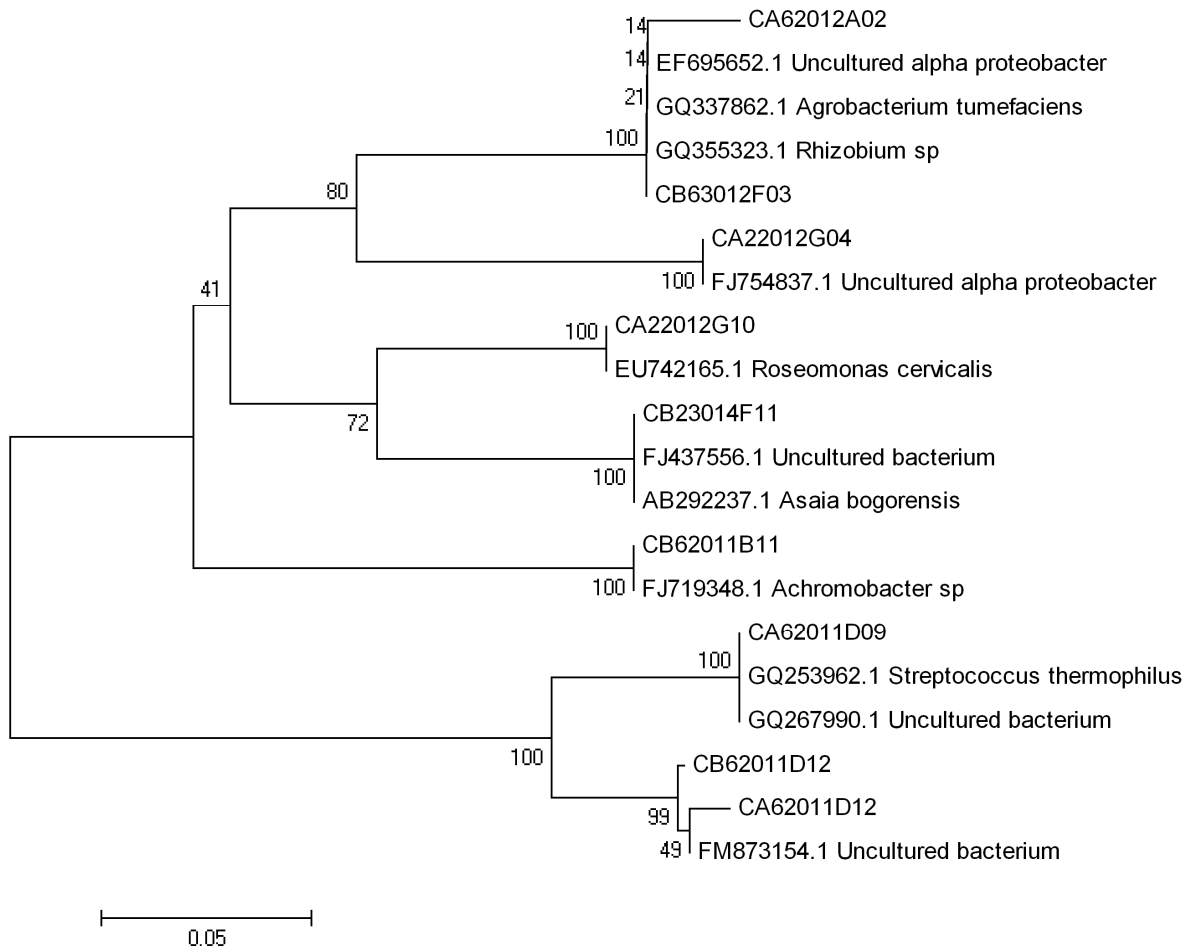
FIGURA 20. ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SEQUÊNCIAS DOS CLONES DAS BIBLIOTECAS DE 16S rRNA DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR IDENTIFICADOS COMO DA FAMÍLIA PSEUDOMONADACEAE



Esta árvore filogenética foi construída usando o método *Neighbour-Joining* a partir de distâncias calculadas pelo método de Jukes e Cantor. A árvore não possui raiz. Os valores nos ramos representam porcentagens em relação às 2.000 amostragens *bootstrap*. As sequências dos clones estão indicadas com um ▲, e as sequências do Genbank tem o número de acesso anteriormente ao nome do organismo. Após o nome do clone (código com 10 letras) há uma letra ou uma sílaba que indicam a identificação de acordo com o programa BLASTn. A letra P indica identidade com sequências de *Pseudomonas* sp. Após essa letra o número em parênteses indica a UTO a que corresponde essa sequência.

A figura 21 mostra a análise das sequências dos clones que não foram classificadas nas famílias Enterobacteriaceae e nem na família Pseudomonadaceae. Essas sequências vieram de amostras diferentes (CA62, CA63, CA22 e CA23) daquelas na qual essas famílias predominaram, sendo a maioria desses clones identificados como  $\alpha$ -Proteobacteria. Os clones CA62012A02, CB63012F03, CA22012G10 e CB62011B11 agruparam com sequências de  $\alpha$ -Proteobacteria do Genbank. Já os clones CA22012G04 e CA62011D12 agruparam com sequências de bactérias não-cultivadas. A sequência CB23014F11 formou um ramo consistente junto com uma sequência de uma alfa-proteobactéria e com de uma bactéria não-cultivada, cuja sequência é semelhante a sequências de  $\alpha$ -Proteobacteria.

FIGURA 21. ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS SEQUÊNCIAS DOS CLONES DAS BIBLIOTECAS DE 16S rRNA DE COLMO DE CANA DE AÇÚCAR



Legenda: Árvore filogenética construída usando o método *Neighbour-Joining* a partir de distâncias calculadas pelo método de Jukes e Cantor. A árvore não possui raiz. Os valores nos ramos representam porcentagens em relação às 2.000 amostragens *bootstrap*.

## 5.18 ESTIMATIVAS DA DIVERSIDADE

Ao contrário das análises anteriores que foram feitas com as sequências de todas as bibliotecas, as próximas análises incluem somente as sequências da amostra CA01, de colmo de cana-de-açúcar adulta. Isso se deve ao fato de que somente essa biblioteca obteve número de clones suficientes de 16S rRNA confirmados como do Domínio Bacteria para proceder as análises.

### 5.18.1 COBERTURA DA BIBLIOTECA

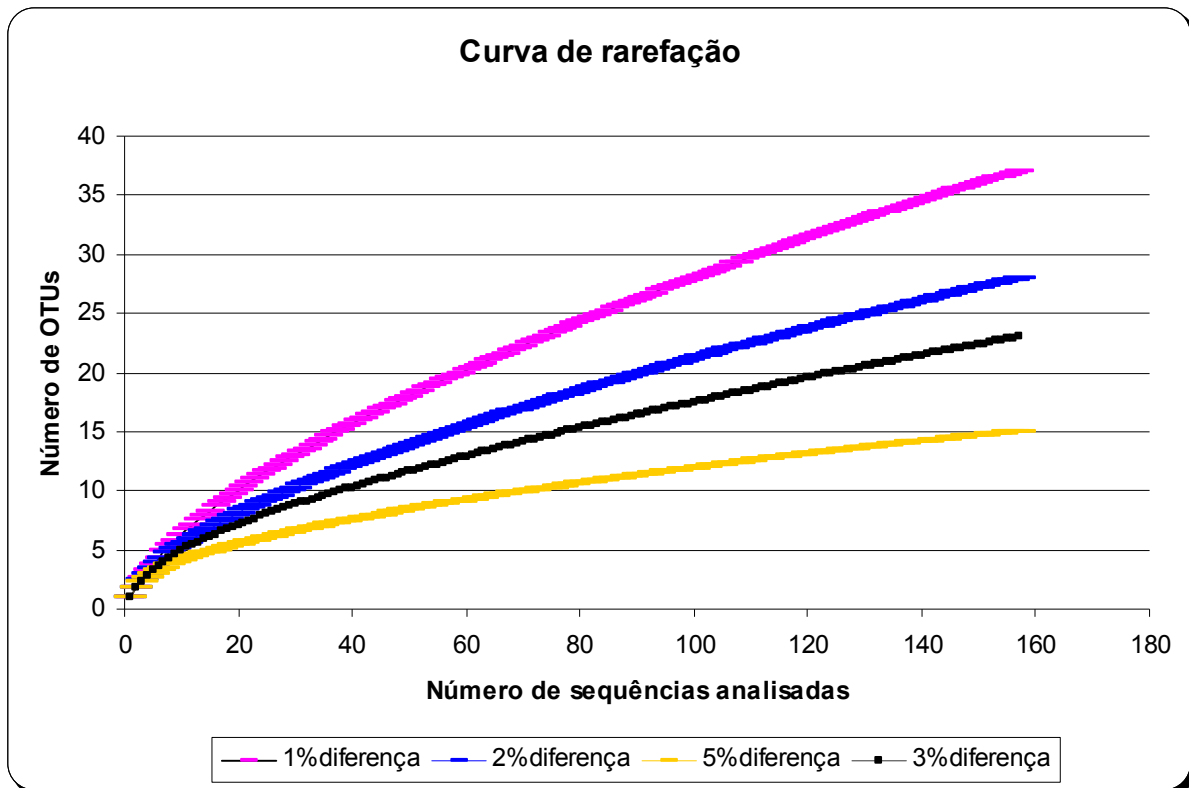
O cálculo da cobertura foi feito com base na fórmula descrita no item 4.11.1, levando-se em consideração uma diferença (divergência) de 3%, indicando uma identidade de sequência de 97%. Essa análise mostrou que a cobertura da biblioteca de 16S rRNA foi de 86%, ou seja, que 86% das principais espécies bacterianas definidas com 97% de identidade de 16S rRNA foram recuperadas.

## 5.19 CURVA DE RAREFAÇÃO E CURVA DO COLETOR

A curva de rarefação mostra a distribuição das UTOs em relação ao número de sequências obtidas (figura 22). Quando não há tolerância para uma única diferença de nucleotídeo na sequência, o número de UTOs máximo não foi alcançado (sequências únicas). Mas, considerando 3% de diferença (divergência), a curva mostra que o número máximo de UTOs foi alcançado, sugerindo uma baixa diversidade na população de bactérias endofíticas associadas à cana-de-açúcar. A distância de 5% foi utilizada porque alguns autores relacionam essa distância com OTUs representando

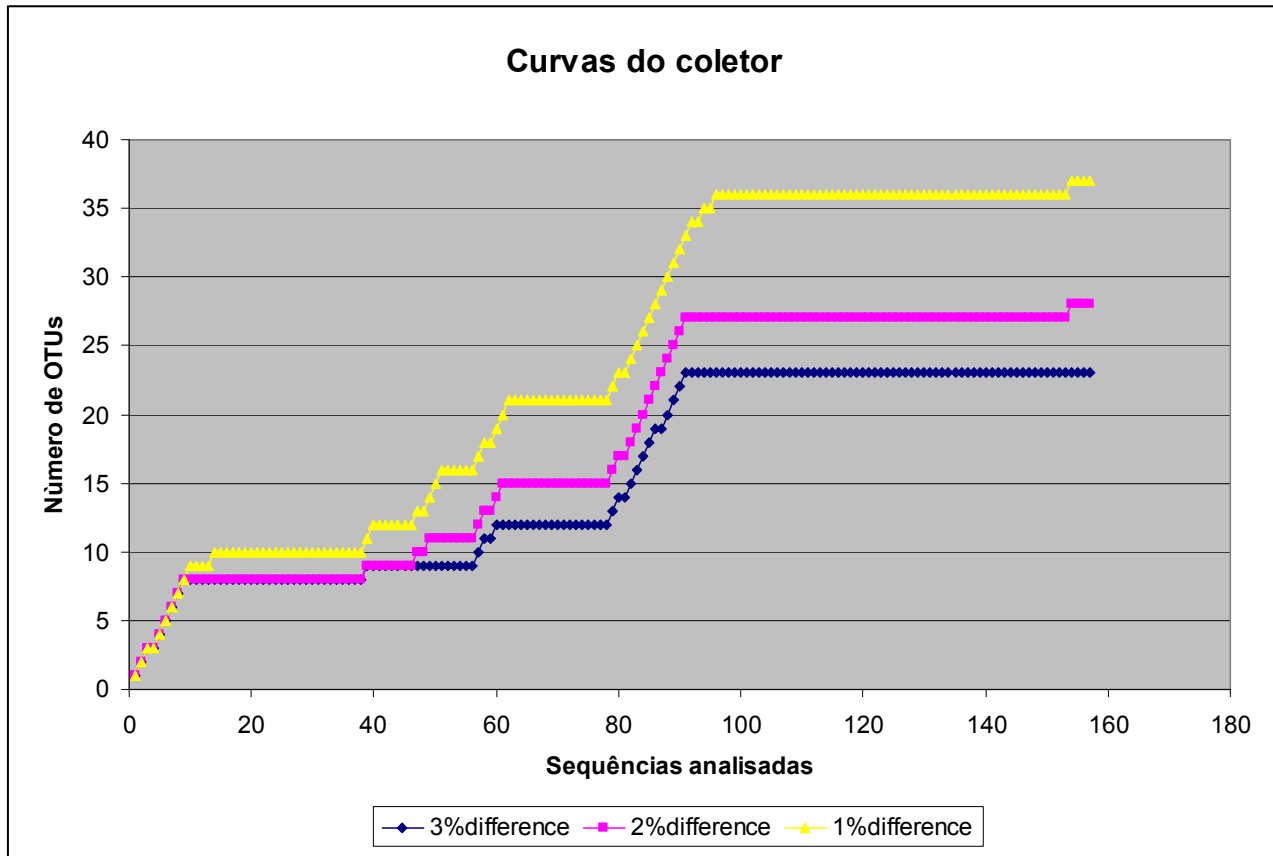
famílias. Nesse caso a saturação também foi atingida, indicando que o número de famílias presentes na amostra foi alcançado.

FIGURA 22 CURVA DE RAREFAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES 16S rRNA DA AMOSTRA CA01



No eixo X está o número de sequências analisadas e no eixo Y o número de UTOs encontradas pelo programa DOTUR nas diferentes diferenças de sequência (divergências) consideradas.

FIGURA 23 CURVA DO COLETOR DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES 16S RRNA DA AMOSTRA CA01



No eixo X está o número de sequências analisadas e no eixo Y o número de OTUs.

A amostra das sequências da biblioteca CA0101 também foi analisada utilizando curvas do coletor com diferença (divergência) de 1%, 2% e 3%. Esse é um tipo de análise que não se baseia em estimativa, como é o caso das curvas de rarefação, mas mostra o real número de OTUs presentes na amostra.

A figura 23 mostra que quando OTUs são definidas como sequências com 3% de diferença (ou 97% de identidade), o número máximo de OTUs é atingido. A curva atinge saturação, indicando que esse número de sequências é o suficiente para resgarmos as OTUs presentes na amostra.

## 5.20 ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR POR MÉTODO DEPENDENTE DE CULTIVO

O Núcleo de Fixação de Nitrogênio busca elucidar, entre outros aspectos da fixação biológica de nitrogênio, os fatores que influenciam na relação planta-bactéria. Dentro desse aspecto, o isolamento de bactérias para posterior caracterização e identificação é um dos meios de se esclarecer melhor essa relação. E, ao comparar os resultados obtidos por métodos independentes de cultivo e métodos dependentes de cultivo podemos ter uma melhor visão da diversidade das bactérias

A Dra Claudia M. Didonet, durante o seu estágio de pós-doutorado, isolou bactérias de colmo, raiz e folhas da cana-de-açúcar em meio ágar batata. Essa planta foi proveniente da localidade de Altônia, noroeste do Paraná e não pertence à mesma variedade que a planta utilizada nos experimentos cultivo independentes. As bactérias endofíticas isoladas da cana-de-açúcar foram gentilmente cedidas pela Dra Claudia para identificação bioquímica e molecular durante o mestrado (Magnani, 2005). Os resultados das análises mostraram algumas discrepâncias entre os resultados obtidos pelos métodos bioquímicos e os obtidos pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. A fim de se conseguir uma melhor identificação das bactérias endofíticas presentes no colmo e nas folhas da cana-de-açúcar e melhorar a qualidade das sequências obtidas, parte das bactérias analisadas durante o mestrado e outras isoladas do mesmo material tiveram seus genes 16S rRNA sequenciados novamente. Essas sequências foram alinhadas e analisadas filogeneticamente, identificadas através de pesquisa de homologia com sequências do banco de dados do NCBI, o Genbank.

Foram obtidas 32 sequências do gene 16S rRNA a partir de DNAs extraídos de bactérias isoladas de colmo e de folha de cana-de-açúcar (Tabela 15).

O tamanho médio das sequências foi de aproximadamente 280-290 pares de base.

Essas sequências foram classificadas em 5 diferentes grupos. O grupo I, com 14



sequências identificadas como pertencente à família Enterobacteriaceae: 8 *Enterobacter* sp, 4 *Pantoea* sp, 1 *Citrobacter*, 1 *Klebsiella* sp e 1 com *Erwinia* sp e *Pantoea* sp. Uma constatação importante em relação a esse grupo é que a maior parte dos isolados classificados nesse grupo foram isolados do colmo da cana-de-açúcar. A única exceção é o isolado FC2P, isolado de folha de cana-de-açúcar.

O grupo II contém dois isolados de colmo, o isolado CC38 contendo sequência de 16S rRNA com alta identidade (98%) com uma sequência de *Brevibacillus* isolado do solo. O outro isolado (CC18) foi identificado como pertencente ao gênero *Staphylococcus* sp.

Apenas o isolado CC27 compõe o grupo III, que foi identificado como *Curtobacterium* sp. O grupo IV, com 14 sequências, é composto de bactérias da família Pseudomonadaceae. Nesse grupo, todos os isolados pertencem ao gênero *Pseudomonas* sp. O último grupo (grupo V) contém apenas uma sequência, relacionada a uma bactéria não-cultivada, relacionada à família Pseudomonadaceae.

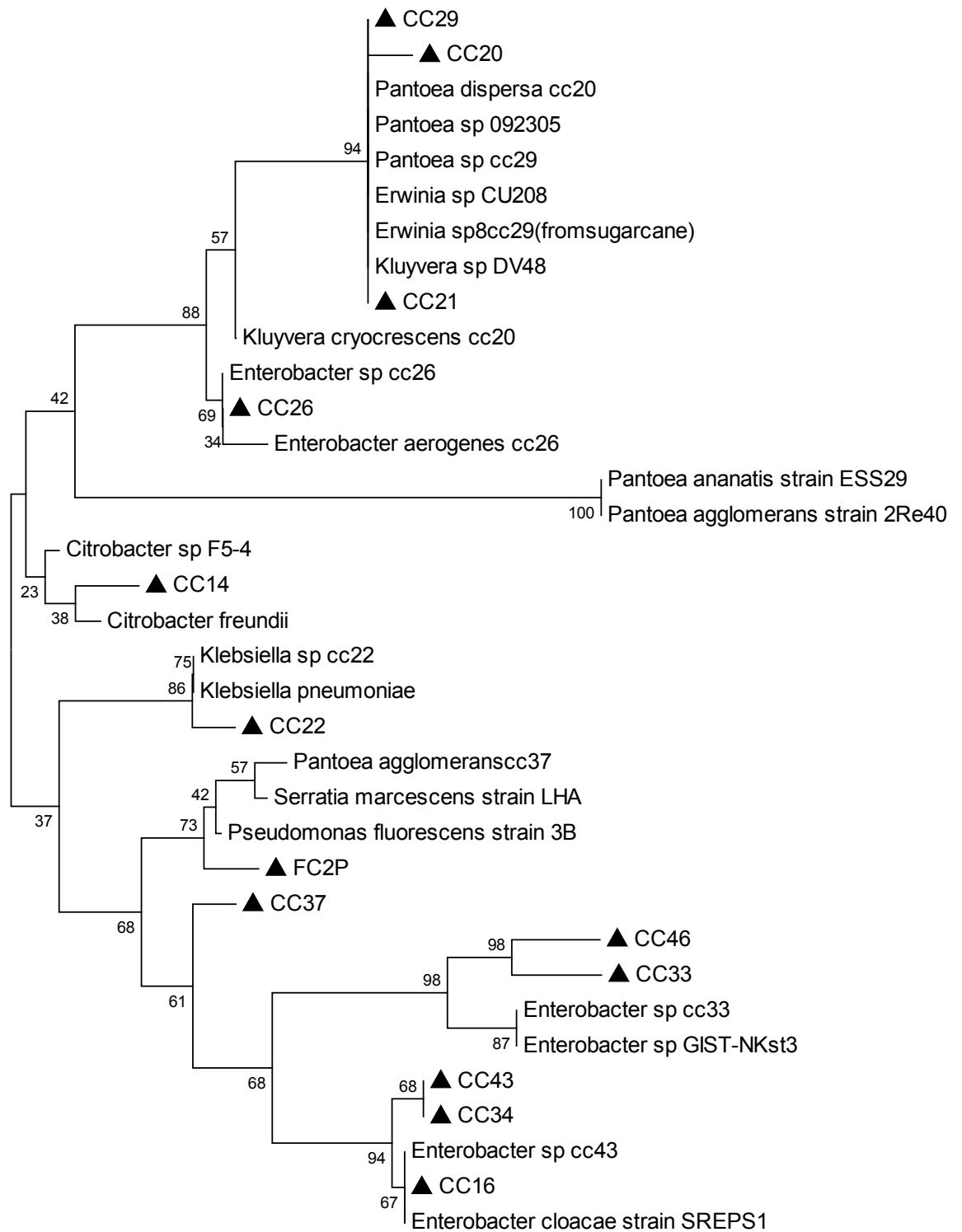
A reconstrução da árvore filogenética baseada na homologia de sequência do gene 16S rRNA (Figura 24) mostrou que os isolados CC29, CC20 e CC21 se agruparam juntamente com sequências de *Pantoea*, de *Erwinia* e *Kluyvera* sp. O isolado CC26 formou um ramo à parte com sequências de *Enterobacter* sp e *Enterobacter aerogenes*. A bactéria endofítica isolada de colmo de cana-de-açúcar identificada como CC14 está relacionada com sequências de *Citrobacter* sp e a CC22 com espécies de *Klebsiella*. Várias espécies identificadas como *Enterobacter* sp (FC2P, CC37, CC46, CC33, CC43 e CC34) não formaram ramos consistentes com sequências do banco de dados. Os valores de *bootstrap* variaram bastante, desde valores baixos como 23 (constituindo ramos com pouca confiabilidade) até valores altos como 94.

Os resultados mostrados aqui sugerem que a comunidade de bactérias endofíticas pode variar dependendo do órgão da planta analisado.

TABELA 15. RESULTADOS DA BUSCA POR IDENTIDADE DE SEQUÊNCIAS REALIZADA PELO PROGRAMA BLASTN DAS SEQUÊNCIAS DAS BACTÉRIAS

Isolado	Grupos	Identidade máxima (%)	Identificação baseada na sequência do gene (BLAST)	Caracterização da bactéria cuja sequência apresentou melhor alinhamento com a sequência analisada
CC14		98%-264 nt idênticos	Citrobacter sp	Bactéria que degrada lignina
CC16		100%-267 nt idênticos	<i>Enterobacter</i> sp	Bactéria isolada de pasta de soja
CC20		99%-266 nt idênticos	Pantoea sp	<i>P. agglomerans</i> associada à plantas
CC21		99%-292 nt idênticos	Pantoea	Bactéria diazotrófica de cana-de-açúcar
CC22		100%-263 nt idênticos	<i>Klebsiella</i> sp	Sistema de tratamento de água
CC26		100%- 263 nt idênticos	<i>Enterobacter</i> sp	PGPR em arroz
CC29		100%-267 nt idênticos	<i>Erwinia</i> sp/ <i>Pantoea</i>	Bactéria diazotrófica de cana-de-açúcar
CC33		100%-262 nt idênticos	<i>Enterobacter</i> sp	Planta tratada com água residual
CC37	Grupo I Família	98%-263 nt idênticos	<i>Enterobacter</i> sp	Colmos de soja de campo
CC43	Enterobact eri-aceae	100%-264 nt idênticos	<i>Enterobacter</i> sp	Bactéria isolada de pasta de soja
CC46		97%-261 nt idênticos	<i>Enterobacter</i> sp	Colmos de soja de campo
CC47		100%-265 nt idênticos	<i>Pantoea</i> sp	Bactéria endofítica resistente a cobre
FC2P		99%-263 nt idênticos	<i>Enterobacter</i> sp	Colmos de soja de campo
CC34		100%-263 nt idênticos	<i>Enterobacter</i> sp	Bactéria isolada de pasta de soja
CC38	Grupo II Bacilli	98%-286 nt idênticos	<i>Brevibacillus</i> sp	Identificação de PGPR de solo
CC18		99%-300 nt idênticos	<i>Staphylococcus</i> sp	Sedimento terrestre
CC27	Grupo III Actino- bacteria	100%-289 nt idênticos	<i>Curtobacterium</i> sp	<i>Curtobacterium</i> sp causadora de septicemia.
CC24		98%-244 nt idênticos	<i>Pseudomonas</i> sp	Bactéria degradadora de óleo
CC35		98%-244 nt idênticos	<i>Pseudomonas</i> sp	Bactéria degradadora de óleo
FC5				
FC6		96%-239 nt idênticos	<i>Pseudomonas</i> sp	Bactéria isolada do mar do Ártico
FC10				
FC12	Grupo IV Família Pseudo- monada- ceae	99%-331 nt idênticos	<i>Pseudomonas</i> sp	PGPR de raiz de milho
FC16		100%-247 nt idênticos	<i>Pseudomonas</i> sp	Um potencial agente de biocontrole
FC18		100%-247 nt idênticos	<i>Pseudomonas</i> sp	Um potencial agente de biocontrole
FC19		100%-247 nt idênticos	<i>Pseudomonas</i> sp	Um potencial agente de biocontrole
FC22		100%-242 nt idênticos	<i>Pseudomonas</i> sp	<i>Pseudomonas fluorescens</i> de plantas
FC23		98%-243 nt idênticos	<i>Pseudomonas</i> sp	Bactéria retirada de uma região de um
FC35		98%-330 nt idênticos	<i>Pseudomonas</i> sp	PGPR de raiz de milho
FC38		98%-243 nt idênticos	<i>Pseudomonas</i> sp	Bactéria retirada de um riacho
FC40		98%-242 nt idênticos	<i>Pseudomonas</i> sp	Um potencial agente de biocontrole
		97%-242 nt idênticos	<i>Pseudomonas</i> sp	Sedimento Marinho do Ártico
	97%-283 nt idênticos	<i>Pseudomonas</i> sp	Bactérias endofíticas isoladas de <i>Pinus</i>	
FC26	Group V	96%-239 nt idênticos	Uncultured bacterium	Bactéria retirada de um riacho

FIGURA 24. ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR IDENTIFICADOS COMO DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE



Legenda: Esta árvore filogenética foi construída usando o método *neighbour-joining* a partir de distâncias calculadas pelo método de Jukes e Cantor (SAITOU e NEI, 1987). Os valores nos ramos representam porcentagens em relação às 2.000 amostragens *bootstrap*.

#### 5.20.1 ISOLAMENTO E CONTAGEM DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM CANA-DE-AÇÚCAR RB-72454 (AMOSTRA CA01)

A amostra de colmo CA01 foi submetida à esterilização externa, e o tecido interno do colmo foi diluído em tampão com auxílio de pistilo e gral e posteriormente plaqueado em meio NFbHPN e LA para contagem de colônias. Em meio NFHPN-lactato foram obtidas  $7,3 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de colmo e em meio LA  $2,4 \times 10^7$  UFC por grama de colmo.

## 6 DISCUSSÃO

As plantas constituem um complexo ecossistema onde a comunidade microbiana interage continuamente, competindo por nutrientes, água e abrigo nos tecidos do hospedeiro. As bactérias endofíticas podem exercer um papel importante no desenvolvimento das culturas de interesse agrônômico, promovendo um maior crescimento vegetal ou protegendo essas culturas contra doenças (STURZ et al., 2000). Por outro lado, as plantas proporcionam um ambiente seguro para esses microrganismos (LODEWYCKX et al., 2002). Portanto, o conhecimento da diversidade endofítica, além de ser importante para a compreensão da ecologia microbiana na planta, pode ser aplicado para melhorar a produtividade e facilitar o manejo dessas culturas.

Desde o isolamento da bactéria diazotrófica *Beijerinckia fluminensis* em 1958 em rizosfera de cana-de-açúcar, muitos estudos tem focado a caracterização e isolamento de organismos fixadores de nitrogênio nessa planta (RUSCHEL & DÖBEREINER, 1958). Sabe-se que este grupo de bactérias pode trazer muitos benefícios à cultura da cana-de-açúcar, seja pela fixação de nitrogênio e consequente diminuição no uso de adubos nitrogenados ou pela promoção de crescimento vegetal. As bactérias endofíticas mais comumente encontradas em raízes, colmos e folhas cana-de-açúcar são *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp e de *Azospirillum* spp (JAMES et al., 1994; BALDANI et al. 1986, REIS-Jr et al., 2000).

No presente estudo, a comunidade endofítica bacteriana no colmo de cana-de-açúcar foi analisada principalmente por métodos independentes de cultivo. A maioria das sequências obtidas de bactérias associadas ao colmo de cana-de-açúcar foi identificada como pertencente à classe das  $\gamma$ -Proteobacterias. Dentro dessa classe, as sequências foram divididas entre as famílias Pseudomonadaceae e Enterobacteriaceae.

Baseados nessa dominância de  $\gamma$ -Proteobacterias e no resultado obtido a partir da fórmula de cobertura da biblioteca de 16S rRNA, que foi de aproximadamente 85%, nós concluímos que a diversidade de bactérias endofíticas na amostra analisada é baixa. Em raiz de arroz, por exemplo, SUN et al. (2008) encontraram as classes alfa, beta, gamma, delta, e epsilon de Proteobacteria, o filo Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides (CFB), Firmicutes, Deinococcus-Thermus e Acidobacteria.

A principal crítica ao tipo de abordagem cultivo-independente para análise da diversidade recai sobre a forte tendência dada pelas condições e os oligonucleotídeos usados na reação da PCR (SUZUKI & GIOVANNONI, 1996). É consenso que esta metodologia permite avaliar os organismos predominantes na amostra. Entretanto, os oligonucleotídeos utilizados nesse trabalho possuem 100% de complementariedade com as regiões correspondentes aos gene 16S rRNA dos principais diazotróficos encontrados em cana-de- açúcar e já foram utilizados para amplificação da maioria destes diazotróficos a partir de colônias isoladas (SOARES-RAMOS et al., 2003).

Além disso, a análise da diversidade de bactérias endofíticas do colmo de cana-de-açúcar a partir do isolamento de bactérias em meio de cultivo também mostrou a presença marcante e predominância de Enterobactérias, confirmando os resultados obtidos pelas análises independentes de cultivo. Neste último caso o isolamento foi realizado utilizando o meio batata, o que também pode gerar uma tendência nos grupos de organismos observados.

Vários trabalhos mostraram a presença de bactérias diazotróficas em cana de açúcar em uma quantidade que varia de cerca de  $10^4$  a  $10^6$  por grama de peso fresco (REIS-Jr et al., 2000). Neste caso as bactérias foram isoladas em meio semi-seletivo semi-sólido sem fonte de nitrogênio, o que elimina aqueles organismos incapazes de fixar nitrogênio, mesmo que predominem na comunidade. Desta forma, enquanto a abordagem independente de cultivo sofre tendência devido á reação da PCR, permitindo a observação dos organismos predominantes na amostra, a abordagem

dependente de cultivo é muito influenciada pela composição dos meios de cultura utilizados e por características dos organismos, como crescimento rápido.

As bactérias diazotróficas (já mencionadas acima) frequentemente isoladas em grande número em cana-de-açúcar e apontadas como responsáveis pela contribuição da fixação de nitrogênio, não foram encontradas em nossa amostra. A ausência dessas bactérias neste trabalho pode ser devido à sua baixa população em relação às bactérias identificadas, o que demandaria um maior esforço de seqüenciamento para sua observação. Apesar da identificação de espécies de bactérias através da sequência do gene 16S rRNA ser controversa e ambígua, a identificação de grupos taxonômicos em níveis mais altos, como família, ordem e outros não deixa dúvida. As principais bactérias diazotróficas associadas à cana de açúcar pertencem às classes alfa (*Azospirillum* e *Gluconacetobacter*) e beta (*Herbaspirillum*) das Proteobacterias, enquanto o grupo predominante das Enterobactérias identificadas no presente trabalho pertence à classe gama das Proteobactérias.

É possível que a composição das comunidades endofíticas da cana-de-açúcar possa ser dependente da localização geográfica, manejo da cultura, idade e genótipo da planta.

Esta é a primeira vez que a comunidade endofítica de cana de açúcar cultivada no Estado do Paraná é estudada e nos dois casos (método dependente quanto idenpendente de cultivo) foram utilizadas plantas adultas, o que permite levantar a hipótese de baixa prevalência de bactérias diazotróficas em cana neste estágio de desenvolvimento e/ou nas regiões coletadas. Outra possibilidade é que este grupo de bactérias esteja presente, mas seja minoritário e seria revelado através de cultivo em meio seletivo.

Em concordância com este trabalho, Suman e colaboradores (2001) obtiveram contagens baixas de bactérias endofíticas diazotróficas por grama de tecido fresco comparado aos endofíticos totais (SUMAN et al., 2001). Estes autores mostraram

que a incidência de endofíticos diazotróficos é 0,02% a 3,86% em cana de açúcar da Índia. Em um outro estudo foi mostrado que aproximadamente 90% das bactérias isoladas de plantas de arroz desinfetada externamente foram não-diazotróficas (Barraquio et al., 1997).

Por outro lado, foi demonstrada a presença de *Azospirillum* spp e *Herbaspirillum* spp em colmo de raízes de milho sequenciando clones de uma biblioteca de *nifH* obtido pela amplificação do DNA vegetal (ROESCH et al, 2008). Trabalhos usando a abordagem independente de cultivo, onde são analisados os genes 16S rRNA e *nifH* indicam que a diversidade total de bactérias é maior que a diversidade das bactérias diazotróficas (CHOWDHURY et al., 2008).

Espécies do gênero *Enterobacter* (gênero encontrado no presente trabalho) são encontradas numa ampla gama de espécies vegetais. Estas bactérias estão muitas vezes relacionadas à promoção do crescimento vegetal, têm potencial para degradação de hidrocarbonetos e podem ainda fixar nitrogênio (KÄMPFER et al., 2005; PHILIPS et al., 2008; PRAKAMHANG et al., 2009). Outras enterobactérias já foram descritas em cana-de-açúcar usando meio seletivo de isolamento (MIRZA et al., 2001; LOIRET et al., 2004). Entretanto, essa é a primeira descrição de bactérias endofíticas utilizando biblioteca gênica de 16S rRNA.

Curvas de rarefação com diferentes níveis de dissimilaridade foram construídas para estimar se a comunidade endofítica da amostra de cana-de-açúcar estudada foi bem representada. Os resultados mostraram que ao nível de dissimilaridade das sequências de 16S rRNA de 3%, a amostra de sequências ainda não atingiu a saturação, porém a curva do coletor mostra que o número de sequências amostradas foi suficiente. Esses dados juntamente com o cálculo da cobertura da biblioteca demonstraram que os grupos mais abundantes foram resgatados, indicando uma baixa diversidade de bactérias endofíticas no colmo da cana-de-açúcar variedade RB 72454 cultivada no noroeste do Estado do Paraná.



A avaliação da diversidade em diferentes estágios do desenvolvimento, com e sem adubação nitrogenada, e submetida a diferentes condições de umidade e temperatura não foi possível porque as sequências dos clones dessas bibliotecas continham, em sua maioria (~95% das sequências), genes com alta identidade com genes 18S rRNA mitocondriais. Como já mencionado, o DNA da mitocôndria possui genes ribossomais 18S que são muito parecidos com o gene 16S rRNA de eubactérias (Newton, 1988). Apesar de a maioria das sequências dos clones possuírem maior identidade (*best hit*) com uma sequência de bactéria não cultivada, elas eram também muito parecidas (alta identidade, alta cobertura, valor *E* baixo) com sequências do gene 18S de mitocôndrias de diferentes plantas. Isso pode indicar que, apesar do par de primers amplificar o gene 16S rRNA de bactérias e não produzir uma banda sobressalente no gel, o DNA da cana-de-açúcar foi amplificado, clonado e sequenciado. E observando a sequência das bactérias do banco de dados que apresentaram alta identidade com a dos clones, aquelas são todos de organismos não-cultivados, ou seja, que pode ser também oriunda de DNA de planta e erroneamente classificada como de bactéria. Para solucionar esse problema, novas bibliotecas poderão ser feitas com o par de oligonucleotídeos 27f-1492r, que amplifica o gene inteiro e uma banda adicional de 2,0 kb. A banda de 1,5 kb, correspondente ao gene 16S rRNA de bactéria, poderia ser purificada e clonada.

Essa é uma das primeiras descrições das comunidades bacterianas em colmo de cana-de-açúcar baseada em biblioteca do gene 16S rRNA e que revela a abundância relativa dos diferentes microrganismos. Uma vez que a população de bactérias inoculadas para promoção de crescimento vegetal pode ser influenciada por vários fatores, incluindo populações bacterianas residentes (OLIVEIRA et al., 2009), a predominância das famílias Pseudomonadaceae e Enterobacteriaceae observada aqui deve ser considerada no planejamento de programas de inoculação.

## 7 CONCLUSÕES

As análises por meio de métodos cultivo-dependentes e cultivo-independentes empregados se mostraram eficientes para o estudo da diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar.

Foi observada uma prevalência de bactérias endofíticas pertencentes às famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae da classe  $\gamma$ -Proteobacteria.

Os resultados obtidos indicam que os grupos de bactérias dominantes foram recuperados, refletindo uma baixa diversidade das bactérias endofíticas na planta analisada.

Bactérias endofíticas diazotróficas frequentemente encontradas associadas à cana-de-açúcar tais como *Herbaspirillum seropedicae*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* e *Azospirillum brasilense* não foram recuperados com a amostragem utilizada.

A observação do efeito da idade da planta e adubação nitrogenada sobre a dinâmica da população de bactérias foi prejudicada por conta da aparente amplificação de genes com alta identidade com genes ribossomais mitocondriais de plantas.

Os resultados corroboram um conhecimento prévio de que a diversidade de bactérias endofíticas pode ser influenciada por diversos fatores, tais como órgão, estágio de desenvolvimento, localização geográfica e genótipo da planta.

E, como muitas sequências dos clones tiveram alta identidade com sequências do gene 16S rRNA de bactérias relacionadas com promoção de crescimento vegetal e degradação de substâncias tóxicas, há nessa planta um potencial reservatório de microrganismos ainda a ser explorado.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARY, T.B., JOSEPH, C.M., YANG, G.P., PHILIPS, D.A., NELSON, L.M. Evaluation of the bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. **Canadian J Microbiol**, v. 47, p. 916-924, 2004.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AMANN, R. I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews** v. 59, p. 143-169, 1995.

ARAUJO, W.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.

ASIS, C.A.; ADACHI, K. Isolation of endophytic *Pantoea agglomerans* and nonzotrophic *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 19-23, 2003.

BARON, S., JAMES, D.A., SUSMAN, M., KENNEDY, C.A., SINLGETON, M.J.D., SCHUENKE, S. **Medical Microbiology**, 4 ed., 1996.

BECKING, J.H. Identification of the endophyte of *Dryas* in *Rubus* (Rosaceae). **Plant and Soil**, v.78, p. 105-28, 1984.

BELL, T., NEWMAN, J. A., SILVERMAN, B. W., TURNER, S.L., LILLEY, A.K. The contribution of species richness and composition to bacterial services. **Letters in nature**. v. 436, 2005.

BERG, G., KRECHEL, A., DITZ, M., SIKORA, R. A., ULRICH, A., HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 215-229, 2004.

BALDANI, J.I. Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz. Itaguaí, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1984. 110p. (Tese de Mestrado).

BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D., SELDIN, L., DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. a root associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. System. Bacteriol.**, v.36, p.86-39, 1986.

- BALDANI J. I., CARUSO, L., BALDANI, V. L. D., GOI, S. R., DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, p. 911-922, 1997.
- BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation in sugar cane: a key to energetically viable biofuel production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.14, p.263-279, 1995.
- BODDEY, R. M., URQUIAGA, S., ALVES, B. J. R., REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139-149, 2003.
- BAIS, H.P, WEIR, T.L., PERRY, L.G., GILROY, S., VIVANCO, J.M.. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annu. Rev. Plant Biol.** V. 57, p. 233–266, 2006.
- BARRAQUIO, W.L., REVILLA, L., LADHA, J.K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, v.194, p.15-24, 1997.
- BURSE, A., WEINGART, H., ULLRICH, M. S. The phytoalexin-inducible multi-drug efflux pump, AcrAB, contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 17, p.43-54, 2004.
- BUSSE, H. J., DENNER, E. B. M., LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. **Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 3-38, 1996.
- CABARELLO-MELLADO, J., MARTINEZ-ROMERO, E Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1532-1537, 1994.
- CAVALLI-SFORZA, L.L., EDWARDS, A.W.F.. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. **American Journal of Human Genetics** 19:233-257, 1967.
- CHARENTREUIL, C., GIRAUD, E., PRIN, Y., LORQUIN, J., B., A., GILLIS, M., DE LAJUDIE, P., DREYFUS, B. Photosynthetic *Bradyrhizobia* Are Natural Endophytes of the African Wild Rice *Oryza breviligulata*, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5437-5447, 2000.
- CHERNIN, L., ISMAILOV, Z., HARAN, S., CHET, I. Chitinolytic Enterobacter agglomerans Antagonistic to Fungal Plant Pathogens. **Appl Environ Microbiol.** v. 61, n.5, p.1720-1726, 1995.
- CHELIUS, M.K., TRIPLETT, E.W. The diversity of *Archaea* and *Bacteria* in the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**. v. 41, p. 252-263, 2001.
- CHO, K.M., HONG, S.Y., LEE, S.M., KIM, Y.H., KAHNG, G.G., LIM YP, KIM H, YUN HD. Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. **Microb. Ecol.** v. 54, n. 2, p.341-51, 2007.

CHOUDHARY, D.K., JOHRI, B.N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiological Research**, v. 164, p. 493-513, 2008.

CHOWDHURY, S.P., SCHMID, M., HARTMANN, A., TRIPATHI, A.K. Diversity of 16S-rRNA and *nifH* genes derived from rhizosphere soil and roots of an endemic drought tolerant grass, *Lasiurus indicus*. **European Journal of Soil Biology**, V. 45, p. 114-122, 2009

COELHO, C.H.M., MEDEIROS, A.F.A., POLIDORO, J.C., XAVIER, R.P., RESENDE, A., QUESADA, D.M.Q., ALVES, B.J.R., BODDEY, R., URGUAGA, S. Identificação de genótipos de cana-de-açúcar quanto ao potencial de contribuição de fixação biológica de nitrogênio. **Agronomia**, v. 37, p. 37-40, 2003.

CONN, V. M., FRANCO, M. M. F. Analysis of the Endophytic Actinobacterial Population in the Roots of Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequencing of 16S rRNA Clones. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1787-1794, 2004.

COUILLEROT, O., PRIGENT-COMBARET, C., CABALLERO-MELLADO, J., MOËNNE-LOCCOZ, Y. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. **Lett Appl Microbiol.** v.48, n.5, p.505-12, 2009.

COUTINHO T.A., VENTER S.N. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. **Mol Plant Pathol.** V.10, N. 3, P.325-35. 2009

CURTIS, T.P., SLOAN, W.T. Microbiology: Exploring microbial diversity-a vast below. **Science.** v.26, n.309, p.1331-3, 2005

CRUZ, L.M. Caracterização e análise filogenética molecular de novos isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio. Curitiba, 2001. 168p. **Tese** (Doutorado em Bioquímica)-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

DALTON, D.A., KRAMER, S., AZIOS, N., FUSARO, S., CAHILL, E., KENNEDY, C. Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*ammophila arenaria* and *elymus mollis*) from Oregon. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, p. 469-479, 2004.

DEKHIL, B., CAHILL, M., STACKEBRANDT, E., e SLY, L.I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. Nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.47, p. 915-916. 1997.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions, endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. **Ciência e cultura**, v. 44, n. 5, 1992.

DÖBEREINER, J., RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Lisboa, v.1, p.261-272, 1958.

DÖBEREINER, J., BALDANI, V.L.D. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília:Embrapa-SPI, Itaguaí, RJ.Embrapa-CNPAB, 1995.

DONG Z., CANNY, M.J., MCCULLY, M.E., ROBOREDO, M.R., CABADILLA, C.F., ORTEGA, E., RODES. R. A Nitrogen-Fixing Endophyte of Sugarcane Stems. A New Role for the Apoplast. **Plant Physiol.** v. 105, p. 1139-1147, 1994

ECKERT, B.; WEBER, O.B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 17–26, 2001

EBELGATY, A., NISHIOKA, K., SATO, T., SUZUKI, H., YE, B., HAMADA, T., ISAWA, T., MITSUI, H., MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5284-5293, 2001.

EWING B, HILLIER L, WENDL MC, GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.**, v. 8, n. 3, p.175-85, 1998.

FELSEISTEN,J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1988.

FELSKE, A., AKKERMANS, A.D.L Prominent occurrence of ribosomes from an uncultured bacterium of the Verrucomicrobiales cluster in grassland soils. **Letters in Appl. Microbiol.** v. 26, p. 219-223, 1998.

FOX, G. E.; PECKMAN, K. J.; WOESE, C. R. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. **Inst.J.Syst. Bacteriol**, v. 27, p. 44-57, 1977.

FRANKLIN, R.B., TAYLOR, D. R., MILLS, A. L.Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Journal of Microbiological Methods**, v. 35, p. 225–235, 1999.

GERMIDA, J. J., SICILIANO, S. D., FREITAS, R., SEIB, A. M. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 43-50, 1998.

GIANNELLA RA. Pathogenesis of acute bacterial diarrheal disorders. **Annu Rev Med.** v.32, p.341-57, 1981.

GILLIS, M., TRAN, V., BARDIN, R., GOOR, M., HERBBAR, P., WILLEMS, A., SEGERS, P., KERSTERS, K., HEULIN, T., FERNANDEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp.: nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 274-289, 1995.

GRANT, S.G.N., JESSEET, J., BLOOMT, F.R, HANAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants.

GUPTA, R.S. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. **FEMS Microbiol Rev.** v. 24, p.367-402, 2000

HALL, B.G. **Phylogenetic trees made easy : a how-to manual**. 3rd ed. Sunderland, Mass. : Sinauer Associates, 2008.

HALLMMAN et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.** V. 43, p. 895-914, 1997.

HEAD, I. M., SAUNDERS, J. R.; PICKUP, J. Microbial evolution, diverdity and ecology: a decade of ribosomal RRNA anaylis of uncultivated organisms. **Microb. Ecology**, v. 35, p. 1-21, 1998.

HEATHER L. TYLER, ERIC W. TRIPLETT. Plants as a Habitat for Beneficial and/or Human Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v. 46, p. 53-73, 2008.

HORNER-DEVINE, M.C., CARNEY, K.M.,BOHANNAN, B.J.M. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proc. R. Soc. Lond. B.* , v. 271, p. 113-122. 2003

HUGENHOLTZ, P, GOEBEL BM, PACE NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **J Bacteriol.**, v. 180, n. 18, p. 4765-74, 1996.

JAMES, E. K., OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 1, p. 77-119, 1997.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research** , v. 65, p. 197-209, 2000.

JIMENEZ-SALGADO, T., FUENTES-RAMIREZ, L. E., TAPIA-HERNANDEZ, A., MASCARUA, M. A., MARTINEZ-ROMERO, E., CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 63, 3676–3683. 1997.

JOLY, H. B. **Introdução à taxonomia vegetal**. 11 ed., São Paulo, Editora Nacional, 1993.

KAMMAS, K. M., AGERON, E., GRIMONT, P. A. D. KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res. Microbiol.** v. 140, p. 679-694, 1989.

KELLER, M., ZENGLER, K. Tapping into microbial diversity. **Nature Reviews Microbiology** v.2, p.141-150, 2004.

KENNEDY, I. R., CHOUDHURY, A.T.M.A., KECSKÉS, M.L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth be better exploited? **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

KIRCHOFF, G., SCHLOTTER, M., ABMUS, B., HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biol. Biochem.**, n. 5, p. 853-862, 1996.

KUKLINSKY-SOBRAI, J., ARAUJO, W. L., MENDES, R., GERALDI, I. O., PIZZIRANI-KLEINER, A. A., AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

LACAVA, P. T., ARAÚJO, W. L., MARCON, J., MACCHERONI, W., AZEVEDO, J. L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 55-59, 2004.

LANE, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115-175. In E. Stackebrandt and Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley-Interscience, West Sussex, England.

LIFSHITZ, R., KLOEPPER, J.W., SCHER, F.M., TIPPING, E.M., LALIBERTÉ, M. Nitrogen-Fixing Pseudomonads Isolated from Roots of Plants Grown in the Canadian High Arctic. *Appl Environ Microbiol.* v.51, n.2, p.251-255, 1986.

LIN, S.Y., YOUNG, C.C., HUPFER, H., SIERING, C., ARUN, A.B., CHEN, W.M., LAI W.A., SHEN, F.T., REKHA, P.D. e YASSIN, A.F. *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 59, p. 761-765, 2009.



LODEWYCK C., VANGRONSVELD, J., PORTEOUS, F., MOORE, E.R.B., TAGHAVI S., MEZGEAY, M., VAN DER LIE, D. Endophytic bacteria and their potential application. **Crit Rev Plant Sci**, v. 86, p.583–606, 2002.

LOIRET, F. G. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **J Appl Microbiol.**, v. 97, n. 3, p.504-11, 2004.

LOVELL, C. R., PICENO, Y. M., QUATTRO, J. M., BAGWELL, C. E. Molecular analysis of diazotroph diversity in the rizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p.3814-3822, 2000.

LOVELAND-CURTZE, J., MITEVA, V.I., BRENCHLEY, J.E. *Herminiimonas glaciei* sp. nov., a novel ultramicrobacterium from 3042 m deep Greenland glacial ice. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 59, p.1272-1277, 2009.

LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 155-173, 1994.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J.P. Brock Biology of microorganisms. 8 ed. London, UK. 1997

MAGALHÃES, F.M., BALDANI, J.I., SOUTO, S.M., KUYKENDALL, J.R., DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **An. Acad. Brasil Ciênc.**, v. 55, p. 417-430, 1983.

MAGNANI, G.S. Diversidade de bacterias endofiticas em cana-de-açucar. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica)-Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 92p, 2005.

MEHNAZ, S., WESELOWSKI, B., LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 57, p.620-624, 2007.

MIRZA S.M., AHMAD, W., LATIF, F. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant Soil**, v. 237, p.47–54, 2001.

MOCALI, S., BERTELLI, E., DI CELLO, F., MENGONI, A., SFALANGA, A., VILIANI, F., CACIOTTI, A., TEGLI, S. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, n. 154, p. 105-114, 2003.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 2764-2769, 1996.

NEWTON, K.J. Plant mitochondrial genomes: organization, expression and variation. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**,v. 39, p.503-532, 1988.

NOCKER, A., BURR, M., CAMPER, A.K. Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. **Microbial Ecology**, v. 54, p. 276-289, 2007.

OLIVARES, F. L., BALDANI, V. L. D., REIS, V. M., BALDANI, J. I., DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. In roots, stems and leaves, predominantly of Gramineae. **Biol. Fertil. Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.

Oliveira, A.L.M., Stoffels, M., Schmid, M., Reis, V.M., Baldani, J.I., Hartmann, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology** v. 45, p. 106-113, 2009.

OLSEN, G.J., WOESE, C.R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **FASEB, J.** 7, P. 113-123, 1993.

OLSEN, G. J.; WOOSE, C. R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **J. Bacteriol.**, v. 176(1) p. 1–6, 1994.

ØVREÅS, L.; TORSVIK. "Microbial Diversity and Community Structure in Two Different Agricultural Soil Communities". **Microb. Ecol.** v. 36, p. 303-31, 1998.

PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J.. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Adv. Microb. Ecol.**, v. 9, p. 1-55, 1986.

PERIN, L., MARTÍNEZ-AGUILAR. L., PAREDES-VALDEZ. G., BALDANI, J.I., ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., REIS, V.M., CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **Int J Syst Evol Microbiol.** v.56, n. 8, p.1931-7, 2006.

PEDROSA, F.O., YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*)genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntrC* (*glnG*) type genes. **FEMS Microbiol. Lett**, v. 55, p. 95–101, 1984.

PENG, G., WANG, H., ZHANG, G., HOU, W., LIU, Y., WANG, E.T., TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, p.1263-1271, 2006.

PERRIG, D.; BOIERO, M.L.; MASCIARELLI, O.A.; PENNA, C.; RUIZ, O.A.; CASSÁN, F.D. LUNA, M.V. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense* and implications for inoculant formulation. **Appl Microbiol Technol**, 2007.

PILLAY, V. J., NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato

(*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 354-361, 1997.

PIÑÓN D, CASAS M, BLANCH M, FONTANIELLA B, BLANCO Y, VICENTE C, SOLAS MT, LEGAZ ME. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. **Res Microbiol.** v.153, n. 6, p.345-51, 2002.

POSTGATE, J. R. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge: Cam. Univ. Press, 1982.

PRAKAMHANG, J., K. MINAMISAWA, K., TEAMTAISONG, N. BOONKERD, N. TEAUMROONG The Communities of Endophytic Diazotrophic Bacteria in Cultivated Rice (*Oryza Sativa* L.) **Appl. Soil Ecol.** v. 42, p.141-149, 2009

QUADT-HALLMANN, A., BENHAMOU, N., KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 577-582, 1997.

QUEZADO-DUVAL, A. M., GUIMARAES, C. M. N., MARTINS, O. M. . Occurrence of *Pseudomonas corrugata* Causing Pith Necrosis on tomato Plants in Goiás, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 59, 2007.

RAMESH, R., JOSHI, A. A., GHANEKAR, M. P. Pseudomonads: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.) **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n.1, 2009.

RAPPÉ, M. S., GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**. v. 57, p. 369-394, 2003.

REIS-JUNIOR, F.B., SILVA, L.G., REIS, V.M., DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesq. agropec. bras.** v.35, p. 985-995, 2000.

REIS, V. M. Biological Dinitrogen Fixation in Gramineae and Palm Trees. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 19, n.3, p. 227-247, 2000.

RENNIE, R.J., DE FREITAS, J.R., RUSCHEL, A.P. AND VOSE, P.B. Isolation and identification of N<sub>2</sub>-fixing bacteria associated with sugarcane (*Saccharum sp*) **Can. J. Microbiol.**, v. 28, p.462 -467, 1982.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.)(Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v.37, n.1,p.43-51, 1987.

ROESCH, L. F. W., CAMARGO, F. A. O., BENTO, F. M., TRIPLETT, E. W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant Soil**, 302:91-104, 2008.

ROSSELÓ-MORA, R., AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

ROSENBLUETH, M., MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial Endophytes and Their Interactions with hosts. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 19, p. 827-837, 2006.

SAIKI, R., GELFAND, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. and Erlich, H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p.487-91, 1988.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol.** v.4, p.406–425, 1987.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual 2 ed. New York, Cold Spring Harbor laboratory, 1989.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J.. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 71, p.1501-1506, 2005.

SESSITSCH, A., REITER, B., PFEIFER, U., WILHELM, E. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomyces*-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.39, p. 23-32, 2002.

SHARMA VK, NOVAK J (1998). Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by *in vitro* co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). **Can. J. Microbiol.** v. 44, p. 528–536.

SHEN, X., XIA, J.J., JIANG, C.J., HE, L.Y., QIAN, M. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution*, v. 156, p. 1164–1170, 2008.

SOARES-RAMOS, J., RAMOS, H.J.O., CRUZ, L. M., CHUBATSU, L. S., PEDROSA, F. O., RIGO, L. U., SOUZA, E. M. Comparative molecular analysis of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 537-543, 2003.

SPANGENBERG, J.H. Biodiversity pressure and the driving forces behind. **Ecological Economics**, v 1, p. 146-158, 2007.

STACKEBRANDT, E.; MURRAY, I R. G. E. e TRUPER, H. G. *Proteobacteria* classis nov. a Name for the Phylogenetic Taxon That Includes the “Purple Bacteria and Their Relatives **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY**, p. 321-325,1988.

STURZ, A.V., CHRISTIE, B.R., NOWAK, J. Bacterial Endophytes: Potential Role in Developing Sustainable Systems of Crop Production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1 – 30, 2000.

SUMAN, A., SHASANY, A. K., SINGH, M., SHAHI, H. N., GAUR, A., KHANUJA, S. P. S. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 39-45, 2001.

SUN, L., QIU, F., ZHANG, X., DAI, X., DONG, X., SONG, W. Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. **Microb Ecol.** V.55, p.415–424, 2008.

SUZUKI, M.T.; GIOVANNONI, S.J .Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Appl Environ Microbiol**, v. 62, p. 625–630, 1996.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution.** v. 24, p.1596-1599, 2007.

TAN, Z.; HUREK, T. & REINHOLD-HUREK, B. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on nifH gene pools in roots of rice. **Environ. Microbiol.**, v. 5, p. 1009-1015, 2003.

TARRAND, J. J., KRIEG, N.R., DOBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Can. J. Microbiol.** v.24, p.967-980, 1978.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucl Acids Res.** v.25, p.4876–4882, 1997.

TIAN, X., CAO, L., TAN, H., HAN, W., CHEN, M., LIU, Y., ZHOU, S.. Diversity of cultivated and uncultivated Actinobacterial endophytes in stems and roots of rice. **Microbial Ecology**, v. 53, p.700-707, 2007

TYLER, H.L., TRIPPLET, E.W. Plants as a Habitat for Beneficial and/or Human Pathogenic Bacteria, **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 53-73, 2008.

URETA, A., ALVAREZ, B., RÁMON, A., VERA, M. A., MARTÍNÉZ-DRETS, G. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. **Plant and Soil**, v. 127, p. 271-277, 1995.

URQUIAGA, S., CRUZ, K.H.S., BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v.56, p.105-114, 1992.

URQUIAGA, S., LIMA, R.M.L., XAVIER, R.P., RESENDE, A.S., ALVES. B.J.R., BODDEY, R. Avaliação da eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio em diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Agronomia**, v. 37, p. 55-58, 2003.

VAN DE PEER, Y.; CHAPELLE, S.; De WACHTER, R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucleic Acids Res**, v. 24, n 17, p. 3381-3391, 1996.

VANDENKOORNHUYSE, P. et al. Active root-inhabiting microbes identified by rapid incorporation of plant-derived carbon into RNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 104, p.16970–16975, 2007.

VERMA, S. C., LADHA, J. K., TRIPATHI, K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R.M.; EVANS, H. J. **Biological Nitrogen Fixation**, New York, London, Chapman e Hall, 1992.

WHITTAKER, R. New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. **Science**, v. 163, p. 150–160, 1969.

WISE, M. G., MCARTHUR, J. V., SHIMKETS, L. J. Bacterial diversity of a Carolina bay as determined by 16S rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa. **Appl. Environ. Microbiol.** v.63, p. 1505-1514, 1997.

WHITMANN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. Prokaryotes: The unseen majority, **PNAS**, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WOESE, C.R. 1987. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.** v. 51, p. 221–271, 1987.

WOESE, C. R., KANDLER, O, WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. **Proc. Natl Acad. Sci.** v. 87, p. 4576–4579, 1990.

WOESE, .C.R. The use of ribosomal RNA in reconstructing evolutionary relationships among bacteria. In: Selander RK, Clark AG, Whittam TS (eds) *Evolutionary at the molecular level*. p. 1–24, 1991.

XIE, C., YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 1435-1438, 2005.

YOUNG, C.C., HUPFER, H., SIERING, C., HO, M.J., ARUN, A.B., LAI, W.A., REKHA P.D., SHEN, F.T., HUNG M.H., CHEN, W.M., YASSIN, A.F. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 959-963, 2008.

ZHANG, J. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** . v.50, p. 743–749. 2000.

ZINNIEL, D. K., LAMBRECHT, P., HARRIS, N. B., FENG, Z., KUCZMARSKI, D., HIGLEY, P., ISHIMARU, C. A., ARUNAKUMARI, A., BARLETTA, R. G., VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2198-2208, 2002.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING. L. Molecules as documents of evolutionary history. **J.Theor Biol**, v. 8, p. 357-366, 1965.

# **ANEXOS**



## ÍNDICE DOS ANEXOS

TABELA 16 RESULTADOS DA PESQUISA DE HOMOLOGIA DE SEQUÊNCIA DOS CLONES 16S RRNA DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	128
FIGURA 24 MAPA DO PLASMÍDEO UTILIZADO PARA A CLONAGEM DOS PRODUTOS DE PCR.....	138
TABELA 17 LISTA DE SEQUÊNCIAS COM ALTA HOMOLOGIA COM UM CLONE DA BIBLIOTECA DE 16S rRNA DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR CA22.....	139
TABELA 18 LISTA DE SEQUÊNCIAS COM ALTA HOMOLOGIA COM UM CLONE DA BIBLIOTECA DE 16S RRNA DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR DA AMOSTRA CA23.....	140
TABELA 19 LISTA DE SEQUÊNCIAS COM ALTA HOMOLOGIA COM UM CLONE DA BIBLIOTECA DE 16S RRNA DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR CA62.....	141
TABELA 20 LISTA DE SEQUÊNCIAS COM ALTA HOMOLOGIA COM UM CLONE DA BIBLIOTECA DE 16S RRNA DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR CA63.....	142
CÓPIA DO ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA GMR.....	143

**TABELA 16. RESULTADOS DA PESQUISA DE HOMOLOGIA DE SEQUÊNCIA DOS CLONES 16S rRNA DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Sequência	Tamanho	Identificação pelo BLASTn	% de identidade	Fonte
CA01011A01	427 bp	Uncultured bacterium	97%	Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest
CA01011A02	397 bp	<i>Pantoea</i> sp.	99%	Copper-resistant endophytic bacteria isolation from the plant grown in copper mine
CA01011A03	340 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Sequence of full 16S rRNA of <i>Pseudomonas putida</i> HR5.1 isolated from Danang soil in Viet Nam
CA01011A05	469 bp	<i>Pseudomonas monteilii</i>	100%	Thermotolerant PGP <i>P. monteilii</i> s. GAP-P1
CA01011A07	361 bp	Enterobacteriaceae bacterium M506	100%	Diversity of endophytic bacteria isolated from stems of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes
CA01011A08	490 bp	Enterobacteriaceae	99%	Diversity of endophytic bacteria isolated from stems of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes
CA01011A09	396 bp	<i>Enterobacter</i> sp	99%	Detection of acetyl monoglyceride as a metabolite of newly isolated glycerol-assimilating bacteria
CA01011A10	464 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	100%	Plant growth promoting activit. of isolate PS9
CA01011A11	471 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	100%	Thermotolerant plant growth promoting <i>Pseudomonas putida</i> strain AKM-P7
CA01011B01	468 bp	<i>Pseudomonas entomophila</i>	100%	Abiotic stress tolerant, exopolysaccharide producing, plant growth promoting <i>Pseudomonas monteilii</i> strain WAPP53 under drought stress
CA01011B02	490 bp	<i>Pseudomonas entomophila</i>	99%	Abiotic stress tolerant, exopolysaccharide producing, plant growth promoting <i>Pseudomonas monteilii</i> strain WAPP53 under drought stress
CA01011B03	487 bp	<i>Pseudomonas monteilii</i>	100%	Thermotolerant plant growth promoting <i>Pseudomonas monteilii</i> strain GAP-P1
CA01011B04	468 bp	<i>Pseudomonas entomophila</i>	100%	Thermotolerant plant growth promoting <i>Pseudomonas monteilii</i> strain GAP-P1
CA01011B05	407 bp	<i>Enterobacter</i> sp. 'MS 412'	99%	Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with <i>Juncus effusus</i> L.
CA01011B06	482 bp	Enterobacteriaceae	99%	Diversity of endophytic bacteria isolated from stems of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes
CA01011B07	441 bp	<i>Klebsiella</i> sp	98%	Genetic variability of exopolysaccharide producing bacteria from grapevine in Turkey
CA01011B08	355 bp	<i>Enterobacter</i> sp	100%	Microbial diversity in a natural ZnS-producing biofilm dominated by sulfate-reducing bacteria in a subsurface acid mine drainage system (RDP)
CA01011B09	442 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Thermotolerant plant growth promoting <i>Pseudomonas putida</i> strain AKM-P7
CA01011B10	391 bp	<i>Pseudomonas entomophila</i>	99%	Abiotic stress tolerant, exopolysaccharide producing, plant growth promoting <i>Pseudomonas monteilii</i> strain WAPP53 under drought stress
CA01011B11	396 bp	<i>Pseudomonas entomophila</i>	100%	Abiotic stress tolerant, exopolysaccharide producing, plant growth promoting <i>Pseudomonas monteilii</i> strain

				WAPP53 under drought stress
CA01011B12	360 bp	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99%	Occurrence and resistance of pathogenic bacteria along the Tiete River downstream of Sao Paulo in Brazil
CA01011C01	392 bp	<i>Pseudomonas entomophila</i>	99%	Abiotic stress tolerant, exopolysaccharide producing, plant growth promoting <i>Pseudomonas monteilii</i> strain WAPP53 under drought stress
CA01011C02	340 bp	Uncultured bacteria (Enterobacteriaceae)	99%	Phylogenetic analysis of the microbial community inhabiting a high temperature mud pool from the Taupo Volcanic Zone, North Island, New Zealand
CA01011C03	400 bp	Enterobacteriaceae bacterium	99%	Detection of acetyl monoglyceride as a metabolite of newly isolated glycerol-assimilating bacteria
CA01011C04	490 bp	<i>Pseudomonas monteilii</i>	100%	Thermotolerant plant growth promoting <i>Pseudomonas monteilii</i> strain GAP-P1
CA01011C05	358 bp	<i>Enterobacter ludwigii</i>	100%	Characterization of phosphate-solubilizing bacteria from tea rhizosphere
CA01011C06	485 bp	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Isolation and characterization of degradation bacteria for PAHs obtained from activated sludge
CA01011C08	434 bp	<i>Pantoea agglomerans</i>	100%	Isolation and identification of microorganisms performing decarboxylation of substituted cinnamic acid
CA01011C09	351 bp	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp.	96%	Novel prokaryotic diversity in sediments of two Tunisian multipond solar saltern
CA01011C10	365 bp	Enterobacteriaceae bacterium	99%	Diversity of endophytic bacteria isolated from stems of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes
CA01011C11	397 bp	Uncultured bacterium (Enterobacteriaceae)	99%	Bacterial Community within a gut of a Japanese pine sawyer, <i>Monochamus alternatus</i>
CA01011C12	440 bp	Uncultured bacterium	99%	Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest
CA01011D01	340 bp	<i>Pseudomonas</i> sp.	98%	DDT degradation strain <i>Pseudomonas ddt-2</i>
CA01011D02	402 bp	<i>Enterobacter</i> SP	95%	<i>Enterobacter</i> spp. suppress <i>Rhizoctonia solani</i> through siderophore production
CA01011D03	358 bp	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	Association of insecticidal microorganisms with larvae of Myrmeleon bore
CA01011D05	340 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Phylogenetic Analysis of Denitrified Bacteria in Sewage
CA01011D06	431 bp	Uncultured bacterium (gamma-proteob.)	96%	Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest
CA01011D08	354 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	98%	Isolation of chlorpyrifos-degrading bacteria
CA01011D09	398 bp	Enterobacteriaceae bacterium	100%	Diversity of endophytic bacteria isolated from stems of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes
CA01011D10	501 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Thermotolerant plant growth promoting <i>Pseudomonas putida</i> strain AKM-P7
CA01011D12	387 bp	Uncultured bacterium	98%	Molecular Investigation of the Endosymbiont Populations of the Pink Sugarcane Mealybug, <i>Saccharicoccus sacchari</i>
CA01011E01	421 bp	<i>Pseudomonas entomophila</i>	99%	Abiotic stress tolerant, exopolysaccharide producing, plant growth promoting <i>Pseudomonas monteilii</i> strain WAPP53 under drought stress
CA01011E02	362 bp	<i>Enterobacter cloacae</i>	100%	Association of insecticidal microorganisms with larvae of Myrmeleon bore
CA01011E03	436 bp	Enterobacteriaceae bacterium	99%	Diversity of endophytic bacteria isolated from stems of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes
CA01011E05	431 bp	<i>Pantoea</i> SP	100%	Diversity of diazotrophic bacteria associated with sugarcane in Guangxi, P.R. China

CA01011E08	340 bp	<i>Citrobacter freundii</i>	97%	Characteristics of Antibiotic Resistant Bacteria in Urban Sewage and River
CA01011E11	392 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	98%	Occurrence of glufosinate resistance and analysis of natural glufosinate resistance gene transfer from Bt176 maize into soil bacterium <i>Bacillus pumilus</i> S1
CA01011E12	345 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Occurrence of glufosinate resistance and analysis of natural glufosinate resistance gene transfer from Bt176 maize into soil bacterium <i>Bacillus pumilus</i> S1
CA01011F03	472 bp	<i>Enterobacter</i> sp	100%	Phylogenetic analysis of <i>Enterobacter</i> sp.
CA01011F04	354 bp	Enterobacteriaceae bacterium	100%	Diversity of endophytic bacteria isolated from stems of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes
CA01011F05	400 bp	Enterobacteriaceae bacterium	99%	Detection of acetyl monoglyceride as a metabolite of newly isolated glycerol-assimilating bacteria
CA01011F06	354 bp	Enterobacteriaceae bacterium	99%	Diversity of endophytic bacteria isolated from stems of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes
CA01011F07	362 bp	<i>Pseudomonas entomophila</i>	99%	Abiotic stress tolerant, exopolysaccharide producing, plant growth promoting <i>Pseudomonas monteilii</i> strain WAPP53 under drought stress
CA01011F08	357 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Isolation of chlorpyrifos-degrading bacteria
CA01011F11	354 bp	<i>Enterobacter</i> sp	99%	Screening and Toxicity of Micro-organisms for Killing <i>Oncomelania hupensis</i>
CA01011G01	354 bp	<i>Pseudomonas corrugata</i>	97%	Genetic Diversity of Siderophore Isolated from Cotton Rhizosphere in Xinjiang, China
CA01011G02	354 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	100%	Plant growth promoting activities of isolate PS9
CA01011G03	442 bp	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	99%	Isolation and characterization of a pnp-degradation strain from a polluted farmland
CA01011G04	434 bp	bacterium G9	99%	Microbial Communities in the Hawaiian Archipelago: A Microbial Diversity Hotspot
CA01011G05	395 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	100%	Thermotolerant plant growth promoting <i>Pseudomonas putida</i> strain AKM-P7
CA01011G07	360 bp	Enterobacteriaceae bacterium	99%	Diversity of endophytic bacteria isolated from stems of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes
CA01011G10	354 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	100%	Phylogenetic Analysis of Denitrogenated Bacteria in Sewage
CA01011H02	354 bp	Enterobacteriaceae bacterium	99%	High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms
CA01011H03	430 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	100%	Occurrence of glufosinate resistance and analysis of natural glufosinate resistance gene transfer from Bt176 maize into soil bacterium <i>Bacillus pumilus</i> S1
CA01011H05	409 bp	<i>Enterobacter</i> sp	99%	Molecular ecology using the ecological indicators species of arsenic-contaminated abandoned mine areas
CA01011H06	436 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Plant growth promoting activities of isolate PS-9
CA01011H07	431 bp	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98%	Isolation and characterization of degradation bacteria for PAHs obtained from activated sludge
CA01011H09	354 bp	Enterobacteriaceae bacterium	98%	Diversity of endophytic bacteria isolated from stems of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes
CA01011H11	354 bp	<i>Enterobacter</i> sp	97%	Characteristics of Antibiotic Resistant Bacteria in Urban Sewage and River
CA01013A03	354 bp	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	Environmental isolates from New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013A04	354 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	100%	New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013A05	354 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	94%	The cell ultrastructure changes of some heavy metal resistant pseudomonads under the influence of Co,

				Cu, Cd, Pb, Ni
CA01013A06	354 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	90%	Environmental isolates from New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013A07	354 bp	<i>Pantoea</i> sp		Diversity of diazotrophic bacteria associated with sugarcane in Guangxi, P.R. China
CA01013A09	390 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	99 %	New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013B01	354 bp	<i>Enterobacter</i> sp	100%	Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the Enterobacteriaceae
CA01013B02	392 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	99%	DDT degradation strain <i>Pseudomonas</i> ddt-2
CA01013B03	420 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	99 %	New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013B04	431 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	99 %	New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013B05	354 bp	<i>Enterobacter</i> sp	100%	Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the Enterobacteriaceae
CA01013B08	357 bp	Enterobacteriaceae bacterium	99%	Diversity of endophytic bacteria isolated from stems of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes
CA01013B10		<i>Pantoea</i> sp	97%	Diversity of diazotrophic bacteria associated with sugarcane in Guangxi, P.R. China
CA01013B11	517 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	99 %	New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013B12	354 pb	<i>Enterobacter</i> sp	100%	Microbial diversity of traditional soy paste and soy sauce during fermentation
CA01013C01	354 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	95%	DDT degradation strain <i>Pseudomonas</i> ddt-2
CA01013C02	354 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	99%	Microbial degradation of the organophosphate pesticide, omethoate
CA01013C07	354 bp	<i>Pantoea</i> sp	99 %	Diversity of diazotrophic bacteria associated with sugarcane in Guangxi, P.R. China
CA01013C10		Uncultures bacterium		Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome
CA01013C11	468 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Isolation of chlorpyrifos-degrading bacteria
CA01013C12	487 bp	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	99%	Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonization by members of the Enterobacteriaceae
CA01013D01	536 bp	<i>Pantoea</i> sp	99%	Diversity of diazotrophic bacteria associated with sugarcane in Guangxi, P.R. China
CA01013D03	521 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	98%	Environmental isolates from New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013D04	354 bp	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	99%	Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the Enterobacteriaceae
CA01013D11	354 bp	Enterobacteriaceae	99%	Vários hits com diferentes gêneros
CA01013D12		<i>Pseudomonas</i> sp	99%	DDT degradation strain <i>Pseudomonas</i> ddt-2
CA01013E01	466 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	99%	Environmental isolates from New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013E02	654 bp	Uncultures bacterium	97%	Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome
CA01013E04	499 bp	<i>Pseudomonas</i> sp		
CA01013E05	354 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	95%	Environmental isolates from New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013E06		<i>Pantoea</i> sp		
CA01013E10	354 bp	<i>Enterobacter aerogenes</i>	91%	Microbial diversity of traditional soy paste and soy sauce during fermentation
CA01013F01	513 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	91%	The cell ultrastructure changes of some heavy metal resistant pseudomonads under the influence of Co, Cu, Cd, Pb, Ni
CA01013F02	417 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	99%	Environmental isolates from New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013F03	417 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	100%	DDT degradation strain <i>Pseudomonas</i> ddt-2
CA01013F04	447 bp	Uncultured bacterium	99%	Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome

CA01013F05	354 bp	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	100%	Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the Enterobacteriaceae
CA01013F06	356 bp	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99%	Microbial diversity of traditional soy paste and soy sauce during fermentation
CA01013F07	366 bp	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	99%	Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the Enterobacteriaceae
CA01013F08	354 bp	Uncultured bacterium	100%	Microbiological Assessment of Circulation Mud Fluids During the First Operation of Riser Drilling by the Deep-Earth Research Vessel
CA01013F10	413 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	100%	DDT degradation strain <i>Pseudomonas</i> ddt-2
CA01013F11	463 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	100%	Environmental isolates from New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013F12	354 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	100%	Environmental isolates from New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013G01	523 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	99%	DDT degradation strain <i>Pseudomonas</i> ddt-2
CA01013G02	386 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	100%	Environmental isolates from New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013G11	480 bp	<i>Enterobacter cloacae</i>	99%	Water Availability Is a Critical Determinant of a Population Shift from Proteobacteria to Actinobacteria during Start-Up Operation of Mesophilic Fed-Batch Composting
CA01013G12	502 bp	<i>Pantoea</i> sp		Diversity of diazotrophic bacteria associated with sugarcane in Guangxi, P.R. China
CA01013H02	399 bp	<i>Pantoea</i> sp	100%	Diversity of diazotrophic bacteria associated with sugarcane in Guangxi, P.R. China
CA01013H03	454 bp	Uncultured bacterium	96%	Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest
CA01013H04	408 bp	<i>Enterobacter aerogenes</i>	100%	Microbial diversity of traditional soy paste and soy sauce during fermentation
CA01013H05	354 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	100%	Environmental isolates from New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013H06	510 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	97%	Environmental isolates from New Zealand pulp and paper wastewater
CA01013H09	354 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	100%	DDT degradation strain <i>Pseudomonas</i> ddt-2
CA01013H10	357 bp	<i>Citrobacter</i> sp	100%	Hydrogen production from autofermentation of vegetable refuses
CA01014A03	358 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Thermotolerant plant growth promoting <i>Pseudomonas putida</i> strain AKM-P7
CA01014A05	400 bp	<i>Enterobacter</i> sp	100%	Microbial diversity of traditional soy paste and soy sauce during fermentation
CA01014B03	399 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Plant growth promoting activities of isolate PS9
CA01014B05	396 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Plant growth promoting activities of isolate PS9
CA01014B07	354 bp	<i>Enterobacter</i> sp	99%	Phylogenetic analysis of <i>Enterobacter</i> sp
CA01014B09	354 bp	<i>Enterobacter</i> sp	100%	Microbial diversity of traditional soy paste and soy sauce during fermentation
CA01014B10	354 bp	<i>Enterobacter</i> sp	99%	Characterization of phosphate-solubilizing bacteria from tea rhizosphere
CA01014B12	469 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Occurrence of glufosinate resistance and analysis of natural glufosinate resistance gene transfer from Bt176 maize into soil bacterium <i>Bacillus pumilus</i> S1
CA01014C04	501 bp	<i>Pantoea agglomerans</i>	99%	Occurrence and resistance of pathogenic bacteria along the Tiete River downstream of Sao Paulo in Brazil
CA01014C05	354 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	91%	The cell ultrastructure changes of some heavy metal resistant pseudomonads under the influence of Co, Cu, Cd, Pb, Ni
CA01014C07	354 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Phylogenetic Analysis of Denitrogenated Bacteria in Sewage
CA01014D01	430 bp	<i>Pseudomonas entomophila</i>	99%	Abiotic stress tolerant, exopolysaccharide producing, plant growth promoting <i>Pseudomonas monteilii</i> strain WAPP53 under drought stress

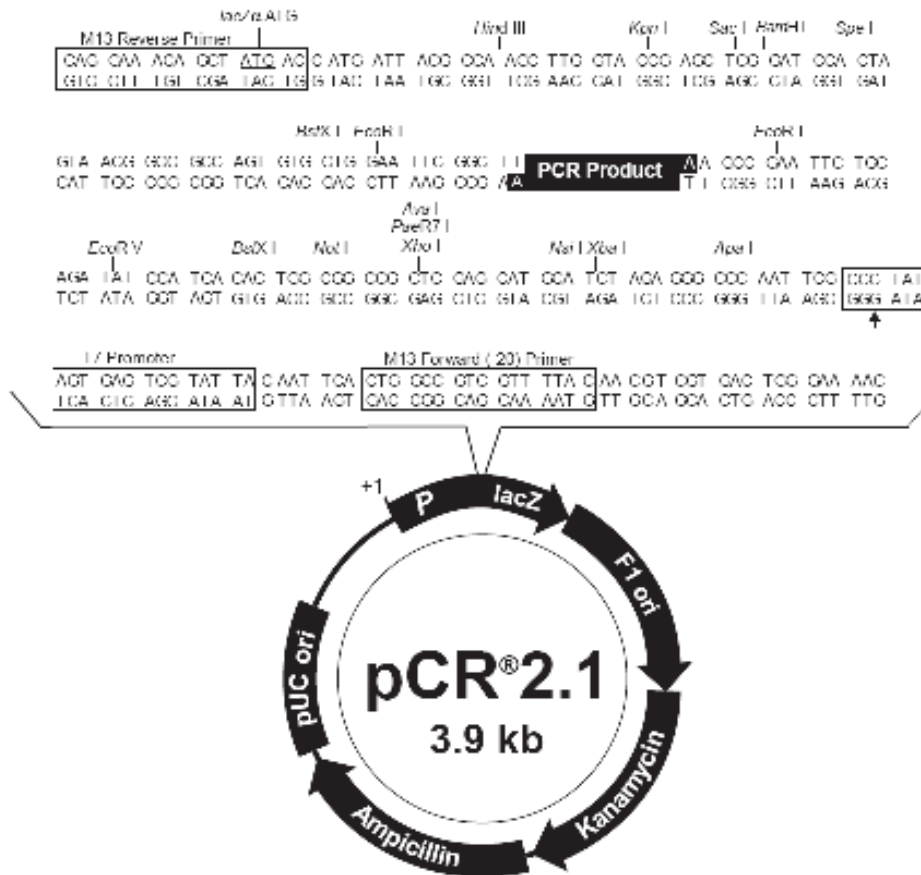
CA01014D03	436 bp	Enterobacteriaceae bacterium	99%	Diversity of endophytic bacteria isolated from stems of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes
CA01014D04	354 bp	Enterobacteriaceae bacterium	99%	Detection of acetyl monoglyceride as a metabolite of newly isolated glycerol-assimilating bacteria
CA01014D05	417 bp	<i>Enterobacter</i> sp	100%	Phylogenetic analysis of <i>Enterobacter</i> sp.
CA01014D07	354 bp	<i>Pseudomonas entomophila</i>	99%	Abiotic stress tolerant, exopolysaccharide producing, plant growth promoting <i>Pseudomonas monteilii</i> strain WAPP53 under drought stress
CA01014E01	431 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Plant growth promoting activities of isolate PS9
CA01014E03	354 bp	Enterobacteriaceae bacterium	99%	Diversity of endophytic bacteria isolated from stems of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes
CA01014E05	403 bp	<i>Pseudomonas entomophila</i>	100%	Abiotic stress tolerant, exopolysaccharide producing, plant growth promoting <i>Pseudomonas monteilii</i> strain WAPP53 under drought stress
CA01014E07	354 bp	<i>Enterobacter</i> sp	98%	Diversity of endophytic bacteria isolated from stems of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes
CA01014E11	354 bp	<i>Pantoea</i> sp		Cultivable bacterial strains isolated from susceptible population of two spotted spider mite <i>Tetranychus urticae</i>
CA01014F04	359 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Thermotolerant plant growth promoting <i>Pseudomonas putida</i> strain AKM-P7
CA01014F05	471 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	100%	Plant growth promoting activities of isolate PS9
CA01014F06	354 bp	<i>Pseudomonas</i> sp	97%	Environmental isolates from New Zealand pulp and paper wastewater
CA01014F10	354 bp	<i>Enterobacter</i> sp	100%	Microbial diversity of traditional soy paste and soy sauce during fermentation
CA01014G04	405 bp	<i>Pantoea</i> sp	99%	Diversity of diazotrophic bacteria associated with sugarcane in Guangxi, P.R. China
CA01014G05	354 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	100%	Phylogenetic Analysis of Denitrogenated Bacteria in Sewage
CA01014G06	390 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Thermotolerant plant growth promoting <i>Pseudomonas putida</i> strain AKM-P7
CA01014H02	464 bp	<i>Enterobacter aerogenes</i>	100%	Microbial diversity of traditional soy paste and soy sauce during fermentation
CA01014H03	468 bp	Enterobacteriaceae bacterium	99%	Community analysis of stem-associated bacteria in soybeans by a bacterial cell enrichment method
CA01014H04	404 bp	<i>Pantoea dispersa</i>	99%	Phylogeny and species identification of the family Enterobacteriaceae based on <i>dnaJ</i> sequences
CA01014H05	397 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	100%	Plant growth promoting activities of isolate PS9
CA01014H06	436 bp	<i>Enterobacter</i> sp	99%	Microbial diversity of traditional soy paste and soy sauce during fermentation
CA01014H08	354 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Thermotolerant plant growth promoting <i>Pseudomonas putida</i> strain AKM-P7
CA01014A01	540 bp	Uncultured bacterium	98%	Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome
CA01014A12	538 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Isolation and identification of newly isolated <i>Pseudomonas putida</i> producing cysteine
CA01014A09	540 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Isolation and identification of newly isolated <i>Pseudomonas putida</i> producing cysteine
CA01014A07	550 bp	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	Isolation and identification of newly isolated <i>Pseudomonas putida</i> producing cysteine
CA01014B08	540 bp	<i>Enterobacter</i> sp	96%	Microbial diversity of traditional soy paste and soy sauce during fermentation
CA0105XH03	483 bp	<i>Pseudomonas</i> SP	99%	mangrove sediment
CA0105XF06	472 pb	<i>Pseudomonas</i> SP	99%	mangrove sediment

CA0105XA08	557 pb	Uncultured <i>Citrobacter</i>	100%	spacecraft assembly clean room floor
CA0105XG10	483 pb	<i>Pseudomonas SP</i>	98%	mangrove sediment
CA0105XG11	382 pb	<i>Pseudomonas monteilli</i>	98%	water sample
CA0105XE12	531 pb	<i>Pseudomonas SP</i>	98%	mangrove sediment
CA0105XF12	549 pb	<i>Pseudomonas SP</i>	100%	mangrove sediment
CA0105XC01	555 pb	<i>Pseudomonas SP</i> GQ284545.1	97%	mangrove sediment
CA0105XG01	502 bp	<i>Pseudomonas SP</i>	96%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> in marine environments
CA0105XD02	518 pb	<i>Pseudomonas SP</i>	99%	mangrove sediment
CA0105XE02	537 pb	<i>Pseudomonas sp</i>	99%	mangrove sediment
CA0105XF02	572 pb	Uncultured/ <i>Pseudomonas SP</i>	98%	mangrove sediment
CA0105XF04	463 pb	<i>Klebsiella oxytoca</i>	98%	Biodegradation of 2-chlorobenzoic acid by locally isolated and characterized bacterium, <i>Klebsiella oxytoca</i> Mutah-01
CA0105XG05	479 pb	<i>Pseudomonas sp</i>	98%	mangrove sediment
CA0105XA06	336 pb	<i>Pseudomonas SP</i>	97%	Genetic Affiliation of Nitrogen-fixing Bacteria Associated with Root Nodules of <i>Acacia salicina</i> and <i>Acacia stenophylla</i> Growing in Southeastern Australia
CA0105XC06	565 pb	<i>Pseudomonas sp</i>	99%	mangrove sediment
CA0105XF06	642 pb	<i>Pseudomonas sp</i>	99%	pulp and paper wastewater
CA0105XB08	377 pb	<i>Pseudomonas sp</i>	99%	mangrove sediment
CA0105XF08	371 pb	<i>Enterobacter SP</i>	99%	Enteric bacteria of field-collected Colorado potato beetle larvae inhibit growth of the entomopathogens <i>Photorhabdus temperata</i> and <i>Beauveria bassiana</i>
CA0105XH08	608 pb	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	16S rDNA sequence of chlorobenzene-degrading bacteria
CA0105XB09	319 pb	<i>Pseudomonas SP</i>	99%	mangrove sediment
CA0105XH09	447 pb	<i>Pseudomonas SP</i>	98%	mangrove sediment
CA0105XB10	335 pb	<i>Pseudomonas sp</i>	99%	mangrove sediment
CA0105XH10	447 pb	<i>Pseudomonas SP</i>	99%	mangrove sediment



CA0105XA11	517 pb	<i>Pseudomonas plecossida</i>	98%	Genetic and functional diversity among fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of banana
CA0105XC11	405 pb	<i>Pseudomonas</i> SP	99%	mangrove sediment
CA0105XF11	317 pb	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	mangrove sediment
CA0105XD11	592 pb	<i>Stenotrophomonas</i> SP	99%	Diversity of endophytic bacteria isolated from stems of field-grown soybeans with different nodulation phenotypes
CA0105XE11	545 pb	<i>Pseudomonas</i> SP	99%	mangrove sediment
CA0105XA12	310 pb	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	mangrove sediment
CA23014F11	572 pb	<i>Asaia bogorensis</i>	100%	Identification of Thai isolates assigned to the genus <i>Asaia</i> based on 16S rDNA restriction analysis
CA22011E07	367 pb	<i>Asaia bogorensis</i>	99%	Identification of Thai isolates assigned to the genus <i>Asaia</i> based on 16S rDNA restriction analysis
CA22011F03	530 pb	<i>Devosia albogilva</i>	97%	<i>Devosia albogilva</i> sp. nov. and <i>Devosia crocina</i> sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site
CA23013B02	249 pb	<i>Defluviobacter lusatiensis</i>	97%	Analysis of microbial diversity associated with autotrophic denitrification in granular sludge
CA62011B11	530 pb	<i>Achromobacter</i> sp.	98%	Isolation of Oil-Degrading Bacteria from Various Ecological Sources
CA62012A02	482 pb	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	97%	Endophytic bacteria in plants from alpine grasslands
CA63012F03	584 pb	Uncultured bacterium	99%	Phylogenetic diversity and evolutionary relationships between rare and abundant members of the bacterial community in tallgrass prairie soil

FIGURA 24 MAPA DO PLASMÍDEO UTILIZADO PARA A CLONAGEM DOS PRODUTOS DE PCR



**Comments for pCR®2.1**  
3929 nucleotides

- LacZ $\alpha$  gene: bases 1-545
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- Multiple Cloning Site: bases 234-355
- T7 promoter: bases 362-381
- M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
- f1 origin: bases 546-983
- Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
- Ampicillin resistance ORF: bases 2128-2989
- pUC origin: bases 3134-3807

TABELA 17 - LISTA DE SEQUÊNCIAS COM ALTA HOMOLOGIA COM UM CLONE DA BIBLIOTECA DE 16S RRNA DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR CA22

Accession	Description
<a href="#">EU133393.1</a>	Uncultured bacterium clone FFCH13347 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">DQ984518.1</a>	Sorghum bicolor mitochondrion, complete genome
<a href="#">EU365401.1</a>	Bambusa oldhamii mitochondrion, complete genome
<a href="#">EU534409.1</a>	Triticum aestivum cultivar Chinese Yumai mitochondrion, complete genome
<a href="#">FJ390733.1</a>	Uncultured bacterium clone Ontario1285 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">FJ390643.1</a>	Uncultured bacterium clone Ohio15071 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">FJ390543.1</a>	Uncultured bacterium clone Ohio121826 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">EF664750.1</a>	Uncultured proteobacterium clone GASP-MB1W1_C05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">EF664441.1</a>	Uncultured proteobacterium clone GASP-MA4W3_H07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">AP008982.1</a>	Triticum aestivum mitochondrial DNA, complete genome
<a href="#">Z14078.1</a>	T.aestivum mitochondrion fMet, 18S, 5S repeat unit DNA
<a href="#">K01229.1</a>	Wheat mitochondrial small subunit (18S) rRNA gene (complete)
<a href="#">Z14060.1</a>	T.aestivum mitochondrion fMet, 18S, 5S repeat unit DNA
<a href="#">Z14059.1</a>	S.cereale mitochondrion fMet, 18S, 5S repeat unit DNA
<a href="#">FJ390553.1</a>	Uncultured bacterium clone Ohio12351 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">FJ837499.1</a>	Uncultured bacterium clone YO00361D04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">AK224092.1</a>	Oryza punctata cDNA, clone: BBS10A05, expressed in shoot apical meristem of BB genome
<a href="#">BA000029.3</a>	Oryza sativa Japonica Group mitochondrial DNA, complete genome
<a href="#">DQ167400.1</a>	Oryza sativa (japonica cultivar-group) cultivar Nipponbare mitochondrion, complete genome
<a href="#">DQ167807.1</a>	Oryza sativa (japonica cultivar-group) isolate PA64S mitochondrion, complete genome
<a href="#">DQ167399.1</a>	Oryza sativa (indica cultivar-group) isolate 93-11 mitochondrion, complete genome
<a href="#">AK109513.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:002-104-H01, full insert sequence
<a href="#">AK106331.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:002-101-F07, full insert sequence
<a href="#">AK064232.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:002-104-H07, full insert sequence
<a href="#">AK060528.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:001-020-G04, full insert sequence
<a href="#">AL713949.4</a>	Oryza sativa chromosome 12, . BAC OJ1521_B04 of library Monsanto from chromosome 12 of cultivar Nipponbare of ssp. japonica of Oryza sativa (rice), complete sequence

Legenda: foi mostrado o resultado de somente um clone nessa figura.

TABELA 18 - LISTA DE SEQUÊNCIAS COM ALTA HOMOLOGIA COM UM CLONE DA BIBLIOTECA DE 16S RRNA DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR DA AMOSTRA CA23

Accession	Description
<a href="#">EU133393.1</a>	Uncultured bacterium clone FFCH13347 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">DQ984518.1</a>	Sorghum bicolor mitochondrion, complete genome
<a href="#">EU365401.1</a>	Bambusa oldhamii mitochondrion, complete genome
<a href="#">EU534409.1</a>	Triticum aestivum cultivar Chinese Yumai mitochondrion, complete genome
<a href="#">FJ390733.1</a>	Uncultured bacterium clone Ontario1285 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">FJ390543.1</a>	Uncultured bacterium clone Ohio121826 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">EF664750.1</a>	Uncultured proteobacterium clone GASP-MB1W1_C05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">EF664441.1</a>	Uncultured proteobacterium clone GASP-MA4W3_H07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">AP008982.1</a>	Triticum aestivum mitochondrial DNA, complete genome
<a href="#">Z14078.1</a>	T.aestivum mitochondrion fMet, 18S, 5S repeat unit DNA
<a href="#">K01229.1</a>	Wheat mitochondrial small subunit (18S) rRNA gene (complete)
<a href="#">Z14060.1</a>	T.aestivum mitochondrion fMet, 18S, 5S repeat unit DNA
<a href="#">Z14059.1</a>	S.cereale mitochondrion fMet, 18S, 5S repeat unit DNA
<a href="#">FJ837499.1</a>	Uncultured bacterium clone YO00361D04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">BA000029.3</a>	Oryza sativa Japonica Group mitochondrial DNA, complete genome
<a href="#">DQ167400.1</a>	Oryza sativa (japonica cultivar-group) cultivar Nipponbare mitochondrion, complete genome
<a href="#">DQ167807.1</a>	Oryza sativa (japonica cultivar-group) isolate PA64S mitochondrion, complete genome
<a href="#">DQ167399.1</a>	Oryza sativa (indica cultivar-group) isolate 93-11 mitochondrion, complete genome
<a href="#">AK109513.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:002-104-H01, full insert sequence
<a href="#">AK106331.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:002-101-F07, full insert sequence
<a href="#">AK060528.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:001-020-G04, full insert sequence
<a href="#">AK064232.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:002-104-H07, full insert sequence
<a href="#">AL713949.4</a>	Oryza sativa chromosome 12, . BAC OJ1521_B04 of library Monsanto from chromosome 12 of cultivar Nipponbare of ssp. japonica of Oryza sativa (rice), complete sequence
<a href="#">DQ984517.1</a>	Tripsacum dactyloides cultivar Pete mitochondrion, complete genome
<a href="#">DQ645538.1</a>	Zea perennis mitochondrion, complete genome

Legenda: foi mostrado o resultado de somente um clone nessa figura.

TABELA 19 - LISTA DE SEQUÊNCIAS COM ALTA HOMOLOGIA COM UM CLONE DA BIBLIOTECA DE 16S RRNA DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR CA62

Accession	Description
<a href="#">EU133393.1</a>	Uncultured bacterium clone FFCH13347 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">DQ984518.1</a>	Sorghum bicolor mitochondrion, complete genome
<a href="#">EU365401.1</a>	Bambusa oldhamii mitochondrion, complete genome
<a href="#">EU534409.1</a>	Triticum aestivum cultivar Chinese Yumai mitochondrion, complete genome
<a href="#">FJ390733.1</a>	Uncultured bacterium clone Ontario1285 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">FJ390543.1</a>	Uncultured bacterium clone Ohio121826 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">EF664750.1</a>	Uncultured proteobacterium clone GASP-MB1W1_C05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">EF664441.1</a>	Uncultured proteobacterium clone GASP-MA4W3_H07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">AP008982.1</a>	Triticum aestivum mitochondrial DNA, complete genome
<a href="#">Z14078.1</a>	T.aestivum mitochondrion fMet, 18S, 5S repeat unit DNA
<a href="#">K01229.1</a>	Wheat mitochondrial small subunit (18S) rRNA gene (complete)
<a href="#">Z14060.1</a>	T.aestivum mitochondrion fMet, 18S, 5S repeat unit DNA
<a href="#">Z14059.1</a>	S.cereale mitochondrion fMet, 18S, 5S repeat unit DNA
<a href="#">FJ837499.1</a>	Uncultured bacterium clone YO00361D04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">BA000029.3</a>	Oryza sativa Japonica Group mitochondrial DNA, complete genome
<a href="#">DQ167400.1</a>	Oryza sativa (japonica cultivar-group) cultivar Nipponbare mitochondrion, complete genome
<a href="#">DQ167807.1</a>	Oryza sativa (japonica cultivar-group) isolate PA64S mitochondrion, complete genome
<a href="#">DQ167399.1</a>	Oryza sativa (indica cultivar-group) isolate 93-11 mitochondrion, complete genome
<a href="#">AK109513.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:002-104-H01, full insert sequence
<a href="#">AK106331.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:002-101-F07, full insert sequence
<a href="#">AK060528.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:001-020-G04, full insert sequence
<a href="#">AK064232.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:002-104-H07, full insert sequence
<a href="#">AL713949.4</a>	Oryza sativa chromosome 12, . BAC OJ1521_B04 of library Monsanto from chromosome 12 of cultivar Nipponbare of ssp. japonica of Oryza sativa (rice), complete sequence
<a href="#">DQ984517.1</a>	Tripsacum dactyloides cultivar Pete mitochondrion, complete genome
<a href="#">DQ645538.1</a>	Zea perennis mitochondrion, complete genome
<a href="#">AL606445.2</a>	Oryza sativa genomic DNA, chromosome 4, BAC clone: OSJNBa0070O11, complete sequence
<a href="#">EU943646.1</a>	Zea mays clone 1671421 mRNA sequence
<a href="#">DQ490951.2</a>	Zea mays subsp. mays genotype CMS-S mitochondrion, complete genome
<a href="#">DQ645539.1</a>	Zea mays subsp. parviglumis mitochondrion, complete genome
<a href="#">DQ645536.1</a>	Zea mays subsp. mays genotype CMS-C mitochondrion, complete genome
<a href="#">DQ490953.1</a>	Zea mays subsp. mays genotype CMS-T mitochondrion, complete genome
<a href="#">DQ490952.1</a>	Zea mays subsp. mays genotype male-fertile NA mitochondrion, complete genome
<a href="#">AY506529.1</a>	Zea mays strain NB mitochondrion, complete genome
<a href="#">M10248.1</a>	Maize mitochondrial 18S ribosomal RNA gene
<a href="#">X00794.1</a>	Maize mitochondrial gene for 18S rRNA
<a href="#">AL117265.3</a>	Oryza sativa genomic DNA, chromosome 4, BAC clone: H0811D08, complete sequence

TABELA 20 - LISTA DE SEQUÊNCIAS COM ALTA HOMOLOGIA COM UM CLONE DA BIBLIOTECA DE 16S RRNA DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR CA63

Accession	Description
<a href="#">EU133393.1</a>	Uncultured bacterium clone FFCH13347 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">DQ984518.1</a>	Sorghum bicolor mitochondrion, complete genome
<a href="#">EU365401.1</a>	Bambusa oldhamii mitochondrion, complete genome
<a href="#">EU534409.1</a>	Triticum aestivum cultivar Chinese Yumai mitochondrion, complete genome
<a href="#">FJ390733.1</a>	Uncultured bacterium clone Ontario1285 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">FJ390543.1</a>	Uncultured bacterium clone Ohio121826 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">EF664750.1</a>	Uncultured proteobacterium clone GASP-MB1W1_C05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">EF664441.1</a>	Uncultured proteobacterium clone GASP-MA4W3_H07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">AP008982.1</a>	Triticum aestivum mitochondrial DNA, complete genome
<a href="#">Z14078.1</a>	T.aestivum mitochondrion fMet, 18S, 5S repeat unit DNA
<a href="#">K01229.1</a>	Wheat mitochondrial small subunit (18S) rRNA gene (complete)
<a href="#">Z14060.1</a>	T.aestivum mitochondrion fMet, 18S, 5S repeat unit DNA
<a href="#">Z14059.1</a>	S.cereale mitochondrion fMet, 18S, 5S repeat unit DNA
<a href="#">FJ837499.1</a>	Uncultured bacterium clone YO00361D04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
<a href="#">BA000029.3</a>	Oryza sativa Japonica Group mitochondrial DNA, complete genome
<a href="#">DQ167400.1</a>	Oryza sativa (japonica cultivar-group) cultivar Nipponbare mitochondrion, complete genome
<a href="#">DQ167807.1</a>	Oryza sativa (japonica cultivar-group) isolate PA64S mitochondrion, complete genome
<a href="#">DQ167399.1</a>	Oryza sativa (indica cultivar-group) isolate 93-11 mitochondrion, complete genome
<a href="#">AK109513.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:002-104-H01, full insert sequence
<a href="#">AK106331.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:002-101-F07, full insert sequence
<a href="#">AK060528.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:001-020-G04, full insert sequence
<a href="#">AK064232.1</a>	Oryza sativa Japonica Group cDNA clone:002-104-H07, full insert sequence
<a href="#">AL713949.4</a>	Oryza sativa chromosome 12, . BAC OJ1521_B04 of library Monsanto from chromosome 12 of cultivar Nipponbare of ssp. japonica of Oryza sativa (rice), complete sequence
<a href="#">DQ984517.1</a>	Tripsacum dactyloides cultivar Pete mitochondrion, complete genome
<a href="#">DQ645538.1</a>	Zea perennis mitochondrion, complete genome
<a href="#">AL606445.2</a>	Oryza sativa genomic DNA, chromosome 4, BAC clone: OSJNBa0070011, complete sequence
<a href="#">EU943646.1</a>	Zea mays clone 1671421 mRNA sequence
<a href="#">DQ490951.2</a>	Zea mays subsp. mays genotype CMS-S mitochondrion, complete genome

## Diversity of Endophytic Bacteria from Brazilian sugarcane

G. S. Magnani<sup>1</sup>; C. M. Didonet<sup>3</sup>; L.M. Cruz<sup>1</sup>; C. F. Picheth<sup>2</sup>; F.O. Pedrosa<sup>1</sup>; E.M. Souza<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Patologia Médica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

<sup>3</sup> Universidade de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

\* Corresponding author: Emanuel Maltempi de Souza

[souzaem@ufpr.br](mailto:souzaem@ufpr.br)

Tel:(+55 41) 3361-1667

Fax:(+55 41)3361-1578

C. Postal 19046, 81531-990, Curitiba, PR, Brasil

### Running title: Microbial diversity in sugar cane

#### Abstract

Endophytic bacteria live inside plant tissues without causing disease. Studies of endophytes in sugarcane focused on the isolation of diazotrophic bacteria. In this work the endophytic bacterial diversity of stem and leaves of sugarcane was evaluated using molecular and biochemical methods.

Potato-agar medium was used to isolate endophytes, and a total of thirty two isolates were selected. The DNA was extracted and the 16S rRNA gene was partially sequenced and used for molecular identification. Gram stain, catalase and oxidase tests, and the API-20E system were used to characterize the isolates. The strains were divided into five groups, based on the 16S rRNA sequence. Group I, comprised 14 representatives of the Enterobacteriaceae; group II, related to Bacilli; group III contained one representative, *Curtobacterium* sp.; group IV contained representatives of the Pseudomonadaceae family; and group V, with one isolate related to an

uncultured bacterium. Four isolates were able to reduce acetylene to ethylene. The majority of the strains isolated from the stem and leaves belonged to Enterobacteriaceae and Pseudomonaceae, respectively, suggesting that distinct bacterial groups occupy preferential niches. Overall, the results suggest that the bacterial endophytic diversity in sugarcane is more complex than previously described. The prevalence of the endophytic bacteria shown here contributes to the knowledge of taxonomic groups that occupy internal tissues of sugarcane.

Keywords: endophytic bacterium, microbial diversity, sugar cane, 16S rRNA

### Introduction

Sugarcane (*Saccharum* spp) is one of the most important crops in Brazil, with a yield of 490 M tons (2007), a quarter of the world's production. Its two main products are sugar and alcohol, a clean renewable alternative fuel. This crop is perhaps the most economically competitive source of ethanol and can effectively contribute to a cleaner environment. Ways of improving its productivity are subject to intense investigation in Brazil, chiefly because the worldwide climate change due to the intense use of greenhouse gas-producing energy sources has focused much attention on the development of sustainable energy.

Endophytic bacteria occupy internal tissues of plants without causing damage to their hosts (Hallmann *et al.* 1997). This microbial community might play an important role in agriculture by conferring advantages to the plant (Mengoni *et al.* 2003), since endophytic bacteria can contribute to plant development by producing phytohormones (Feng *et al.*, 2006), siderophores (Burd *et al.* 1998), increasing resistance to pathogens (Reiter *et al.* 2002) and parasites (Hallmann *et al.* 1997), biological nitrogen fixation (Baldani *et al.* 1996) and antibiotic production (Strobel and Daisy, 2003). Understanding the diversity of plant-bacterial associations and their role in plant development is necessary if these associations are manipulated to increase crop production, conserve biodiversity and sustain agro-ecosystems (Germida *et al.* 1998; Sturz *et al.* 1999).

Bacterial endophytes are found in a variety of plants, such as sugar beet (Dent *et al.*, 2004), prairie plants, agronomic crops (Zinniel *et al.* 2002), potato varieties (Sessitich *et al.* 2002), wheat (Germida and Siciliano 2001) and rice (Sun *et al.* 2008). The microbial community of endophytes colonizes plant tissues and is capable of establishing interactions not only among themselves but also with invaders such as pathogens, and in this way may influence the plant development. For example, Araújo *et al.* (2002) described interactions between the phytopathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* and endophytes in *Citrus sinensis*, which, apparently, restricted the development of the disease by suppressing the symptoms in inoculated plants.

In sugarcane, most of the research on endophytic bacteria has been focused on diazotrophs, of which the main representatives are *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp. (Cavalcante and Dobereiner 1988; Baldani *et al.* 1986) and *Azospirillum amazonense* (Reis-Jr *et al.*, 2000). However, the presence of diazotrophs among the total population of bacteria in sugarcane tissues seems to be low in Indian sugar cane (Suman *et al.* 2001). The aim of this work was to investigate the diversity of the putative endophytic population in stems and leaves of Brazilian sugarcane.



## Material and Methods

### Bacterial isolation and identification

Sugar cane plants were from a 4-years old plantation in the Northeast of Paraná state (Brazil). The plants were grown for livestock feeding. Sugarcane leaves and stems were collected and then separated and maintained in ice until analysis. The leaves were washed with sterile distilled water and their surface disinfested by washing with 70% ethanol. The stems were treated in the same way; and after disinfestation, were flame sterilized. Stems (10g) and leaves (10g) were macerated separately in sterile Tris-HCl 10mmol/L pH 8.0 and serially diluted to  $10^{-6}$ . One hundred microliters of these dilutions were plated on potato-agar (Döbereiner and Baldani, 1995) and incubated at 30°C for up to 5 days. Thirty-two isolates from stems and leaves of sugarcane, representing different types of colonies developed on agar, were randomly chosen, analyzed by gram stain, cytochrome oxidase activity (gram negative rods) or catalase production (gram positive cocci) (Koneman *et al.* 2001). The gram-negative rods were plated on MacConkey medium (Jones *et al.* 1946) to identify candidate Enterobacteriaceae, and then submitted to biochemical analysis using the API-20E test (bioMérieux).

### Amplification and sequencing of the 16S rRNA gene

Three milliliters of fresh cultures of the isolates in LB medium were used for DNA extraction according to Sambrook *et al.* (1989). The genomic DNA was used as a template in a polymerase chain reaction (PCR) with the primers Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') and Y2 (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3'), allowing amplification of a fragment of approximately 300 bp of the 5' end of the 16S rRNA gene. The PCR mixtures contained 50-100 ng of the template DNA, 2.5 µL Taq buffer 10X (Tris-HCl pH 8.4 200 mM, KCl 500 mM), 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTP, 4 pmol/L of each Y1 and Y2 primers, and 1.0 U of *Taq* DNA polymerase in 25 µL. The temperature cycles were: 94°C/ 30 sec (once); 94°C/20 sec, 58°C/20 sec, 72°C/1 min (30 times); and 72°C/5 min (once).

The Y1-Y2 PCR products were purified using the AutoSeq 96 system (GE HealthCare) and sequenced using dye terminator chemistry and an ABI PRISM 377 sequencer (Applied Biosystems).

#### Sequence assembly and analysis

The PHRED program was used for base calling (Ewing *et al.*, 1998). The forward and reverse sequences were assembled with the CAP3 program (Huang and Madan, 1999). Nucleotide sequence identities were determined by the BLAST and Seqmatch programs. The 16S rRNA genes have been deposited in the Genbank (EF054896-EF054920/ FJ966050-FJ966056).

#### Determination of Nitrogenase activity

To test for nitrogenase activity of the Enterobacteriaceae, 100  $\mu$ L of the cultures grown in LB were used to inoculate 4 mL of NFDM (Dixon *et al.*, 1977) medium containing 0.5 mmol/L sodium glutamate in 10 mL bottles, which were sealed with suba-seals and incubated at 30°C in a rotary shaker (120 *rpm*) for 16 hours. Acetylene (10%) was then injected into the culture vials, incubated for one hour and analyzed for ethylene by gas chromatography. To test for nitrogenase activity of the Pseudomonads, 100  $\mu$ L of the cultures grown in NfbHPN was used to inoculate 4 mL of semi-solid N-free NfbHN and the acetylene reduction activity was determined as described (Pedrosa and Yates, 1984).

## Results

#### Phenotypic characterization of the sugarcane isolates

Thirty two isolates representing all colony types developed on potato agar cultures from macerates of leaves and stems were randomly selected and stored in 50% glycerol at -20° C. Of these, 18 strains were isolated from stems (designated as CC), and 14 strains from leaves (FC). Frozen cultures were re-streaked on potato-agar and isolated colonies of each culture were selected.

Most of the isolates were gram-negative bacilli. The exceptions were strains CC18, a gram-positive coccus, and strains CC38 and CC27, which were gram-positive bacilli. All the gram negative bacilli were oxidase negative, but only 14 out of 29 of these grew on MacConkey agar; these were tested using the API-20E kit for enteric bacteria. Based on the API and oxidase results, these fourteen strains were classified as Enterobacteriaceae (Table 1), among which were *Enterobacter* (CC14, CC26, CC29, CC33, CC34, CC37, CC43, CC46, FCP2), *Pantoea* (CC16, CC21, CC47), *Kluyvera* (CC20) and *Klebsiella* (CC22). An interesting observation is that all but one strain of this group (FC2P) were isolated from sugar cane stems.

The gram-positive isolates were catalase positive.

#### Sequence Analysis

The 5' end of the 16S rRNA gene of the 32 isolates was amplified by PCR and sequenced. At least two sequencing reactions were performed for each orientation and the assembled sequences, with primer sequences removed had lengths ranging from 275 to 301 bp.

The 16S rRNA sequences were used to search the Genbank and RDP databases using Blast and SequeMatch programs, respectively. Most of the strains (28) belonged to the gamma Proteobacteria. The results allowed clustering the sugarcane endophytic bacteria into 5 distinct groups. Group I was composed of members of the Enterobacteriaceae family. The isolates of this group were related to *Pantoea* (4), *Enterobacter* (8), *Klebsiella* (1) and *Citrobacter* (1). Again, all but one strain of the enteric bacteria group (FC2P) were isolated from sugar cane stems.

Group II comprised two isolates of the *Bacilli* Class, which probably belong to the *Brevibacillus* (CC38) and *Staphylococcus* (CC18) genera. Group III had a single representative of the Actinobacteria phylum (CC27) related to *Curtobacterium*. Group IV contained 14 strains related to Pseudomonadaceae which were all isolated from leaves with 2 exceptions (CC24 and CC35). Although most Pseudomonads are oxidase positive, all the isolates in this study are oxidase negative. Group V has only one isolate, related to an uncultured bacterium.

The endophytic population in the stem is more diverse than that of the leaves: the stems harbors the largest number of 8 different genera distributed in all four groups with prevalence of Enterobacteriaceae, whereas bacterial strains isolated from leaves belonged to only 2 genera with a large predominance of *Pseudomonas*.

#### Screening for endophytic nitrogen fixing bacteria

Approximately 90% of these isolates showed no nitrogenase activity: only isolates CC22, CC26, CC29 and CC35 reduced acetylene to ethylene. Based on 16S rRNA sequence identity, these isolated were tentatively classified as *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea* and *Pseudomonas*.

### **Discussion**

Plants maintain a complex ecosystem where bacterial communities interact continuously, competing for nutrients and water in the tissues of the host. Knowledge of the diversity of endophytic bacteria is important for both ecological and biotechnological studies.

Most studies of sugarcane endophytes have focused on the diazotrophic bacteria (Caballero-Mellado and Martinez-Romero, 1994; Cavalcante and Dobereiner 1988; Olivares *et al.* 1996). Since factors other than biological nitrogen fixation can contribute significantly to the host, we investigated the diversity of bacteria from leaves and stems of sugarcane. In our study, the prevalence of diazotrophs was very low: only 10% of the isolates had nitrogenase activity. The absence of endophytic diazotrophs such as *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* spp., and *Azospirillum* spp., which have been found in great numbers in sugar cane, is most notable. This discrepancy may be due to the use of nitrogen-free medium for bacterial isolation, geographic and environmental variations or a combination of these. In a study similar to ours, Suman *et al.* 2001 isolated endophytic bacteria from several cultivars of Indian sugar cane on LGI medium and found that the prevalence of diazotrophs varied from 3.86 to 0.02 %. It is possible that by using rich medium such as potato-agar medium, which supports growth of many different

bacteria, a distinct portion of the bacterial community was assessed, suggesting a more complex ecology of sugar cane endophytes than previously reported.

In this study the fermenting gram-negative bacilli were characterized both by phenotypic identification and 16S rRNA gene sequencing. The identifications obtained by these methods agreed at the genus level in 11 out of 14 isolates. In the remaining cases, the identifications were of closely related genera. These discrepancies may be due to limited databases available for the phenotypic test systems and that the system used was designed for clinical diagnostics: the closest sequence matches to our isolates were always either plant endophytes or from other environmental sources, which are unlikely to be represented in the API-20E system database.

The *Enterobacter* genus was the most frequently found in the stems. *Enterobacter* has been identified as endophytes of several plants such as *Citrus sinensis*, soybean and crop plants (Araujo *et al.*, 2002; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004; Zinniel *et al.* 2002;). Other Enterobacteriaceae identified in sugar cane have also been previously described as endophytes. The plant growth-promoting bacteria *Kluyvera ascorbata* SUD165, resistant to heavy metals, was capable of conferring resistance to high concentrations of nickel to canola and tomato plants (Burd *et al.* 1998). Endophytic *Pantoea* was found in sugarcane (Loiret *et al.* 2004) and in soybean (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004). Representatives of these three genera have also been associated with pathogenicity (Gurtler *et al.* 2005; Medrano and Bell 2007). However, the results suggest no dominance of a particular strain, indicating that it is unlikely a pathogenic association. Furthermore, a completely different bacterial community, dominated by *Pseudomonas*, was identified in the leaves.

The two *Bacilli* genera identified in sugar cane have been identified before as endophytes: *Staphylococcus* was found associated with sweet pepper (Rasche *et al.* 2006) and *Brevibacillus* was found in cadmium contaminated soils and associated with soybean (Vivas *et al.* 2003; Sarkar 2002). *Curtobacterium*, the only representative of the Actinobacteria, was identified in orange, grape, and *Pinus* (Araujo *et al.* 2002; Bell *et al.* 1995; Idris *et al.* 2004, and interacting with the phytopathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* (Lacava 2004). To our knowledge, this is the first characterization of *Brevibacillus* and *Curtobacterium* in sugarcane.

The microbial population of the leaves, colonized predominantly by *Pseudomonaceae*, and stems of sugar cane, with prevalence of Enterobacteriaceae, were substantially different. Stems presumably offer a more stable niche for the bacteria, since they contain a greater diversity of genera: they are less exposed to drastic changes of their physicochemical conditions such as temperature, humidity, UV irradiation and nutrients in the apoplast. In contrast, the more frequent variation of the environmental conditions of the leaves can restrict growth of bacterial populations (Hirano and Upper, 2000). For example, the varying exudates of leaves imposes a metabolic versatility on bacteria, a characteristic of the *Pseudomonas* genus (Mercier and Lindow 2000; Misko and Germida 2002). This preference for different habitats has already been shown in other plants (Mocali *et al.* 2003; Sessitsch *et al.* 2002).

The results reported here suggest that the population of sugar cane endophytes can vary depending on the plant organ analysed. It is noteworthy that the relative number of diazotrophic endophytes recovered was low, perhaps reflecting the lack of selective pressure in the isolation procedure. Further studies will be necessary to thoroughly analyse the endophytic population of sugar cane, including collection of plants from different geographic origins and the use of culture-independent molecular analyses.

### **Acknowledgments**

We thank Valter A. de Baura, Roseli Prado and Julieta Pie for technical support, and M. G. Yates for reading the manuscript. This work was supported by CNPq-Instituto do Milênio, PRONEX-Fundação Araucária and CAPES.

### **References**

- Araújo WL, Marcon J, Maccheroni W Jr, Van Elsas JD, Van Vuurde JW and Azevedo J L (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl and Environ Microbiol* .68:4906-4914.
- Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L and Döbereiner J (1986). Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. *Int J Syst Bacteriol*. 36: 86-93.
- Bell CR, Dickie GA, Harvey WLG and Chan JWYF (1995). Endophytic bacteria in grapevine. *Can. J. Microbiol*. 41:46-53.
- Burd GI, Dixon DG and Glick BR (1998). A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in Seedlings. *Appl and Environ Microbiol*. 64:3663-3668.
- Cabarello-Mellado and Martinez-Romero (1994). Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl and Environ Microbiol* 60:1532-1537.

- Cavalcante VA and Döbereiner J (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 108: 21-23.
- Dent KC, Stephen JR and Finch-Savage WE (2004) Molecular profiling of microbial communities associated with seeds of *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* (sugar beet). *J Microbiol Methods*, 56:17-26.
- Dixon R, Kennedy C, Kondorosi A, Krishnapillai V and Merrick M (1977). Complementation analysis of *Klebsiella pneumoniae* mutants defective in nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 157: 189–198.
- Döbereiner J and Baldani VLD (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília:Embrapa-SPI, Itaguaí, RJ.Embrapa-CNPAB.
- Feng Y, Shen D and Song W. (2006). Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *Journal Appl Microbiol*, 100:938-945.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC and Green P (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.*, 8:175-85.
- Germida JJ, Siciliano SD, Freitas R and Seib AM (1998). Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) *FEMS Microbiol Ecol*, 26:43-50.
- Germida JJ and Siciliano SD (2001). Taxonomy diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. *Biol. Fertil. Soils*, 33:410-415.
- Gurtler JB, Kornacki JL and Beuchat LR (2005). Enterobacter sakazakii: a coliform of increased concern to infant health. *Int J Food Microbiol.* 104:1-34.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann, A, Mahaffee, WF and Kloepper, JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43:895-914.
- Hirano SS and Upper CD (2000). Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*, a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64:624-653.
- Huang X and Madan A (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9:868-77.
- Idria R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel WW and Sessitsch A (2004). Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl and Environ Microbiol.* 70:2667-77.
- Lacava PT, Araújo WL, Marcon J, Maccheroni W and Azevedo JL (2004). Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Letters in Appl Microbiol.* 39:55-59.
- Loiret FG (2004). A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *J Appl Microbiol.* 97:504-11.
- Jones WD and Kubica GP(1946). The use of MacConkey agar for differential typing of *M. fortuitum*. *Am. J. Med. Technol.* 30:182-195.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC and Winn WCJ (2001). Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido. 5ed., MEDSI Editora Médica e Científica.
- Kuklinsky-Sobral J, Araujo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA and Azevedo JL (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology.* 6:1244-1251.
- Medrano EG and Bell AA (2007). Role of *Pantoea agglomerans* in opportunistic bacterial seed and boll rot of cotton (*Gossypium hirsutum*) grown in the field. *J Appl Microbiol.* 102:134-143.

- Mengoni A, Mocali S, Surico G, Tegli S and Fani R. (2003) Fluctuation of endophytic bacteria and phytoplasmosis in elm trees. *Microbiol Res.* 158:363-369.
- Mercier, J and Lindow SE (2000) Role of Leaf Surface Sugars in Colonization of Plants by Bacterial Epiphyte. *Appl and Environ Microbiol*, 66:369-374.
- Misko A L and Germida JJ (2002). Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. *FEMS Microbiol Ecol.* 42:399-407.
- Mocali S, Bertelli E, Di Cello F, Mengoni A, Sfalanga A, Viliani F, Caciotti A and Tegli S (2003) Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. *Research in Microbiol*, 5:105-114.
- Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani J I and Döbereiner J (1996). Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves, predominantly of Gramineae. *Biol. Fertil. Soils.* 21:197-200.
- Pedrosa F O and Yates M G (1984). Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nif* and *ntf(gln)* type gene products. *FEMS Microbiol. Lett.* 23:95-101.
- Rasche F, Trondl R, Naglreiter C, Reichenauer TG and Sessitsch A (2006). Chilling and cultivar type affect the diversity of bacterial endophytes colonizing sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Can. J. Microbiol.* 52:1036-1045.
- Reis-Jr FB, Silva LG, Reis VM and Döbereiner J. (2000). Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesq. agropec.bras.* 35:1-10.
- Reiter B, Pfeifer U, Schwab H and Sessitsch A (2002). Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Ewinia carotovora* subsp. *Atroseptica*. *Appl and Environm Microbiol.* 68:2261-2268.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual 2 ed. New York, Cold Spring, Harbor laboratory.
- Sarkar PK, Hasenack B and Nout MJ (2002). Diversity and functionality of *Bacillus* and related genera isolated from spontaneously fermented soybeans (Indian Kinema) and locust beans (African Soumbala). *Int J Food Microbiol*, 25:175-186.
- Sessitsch A, Reiter B, Pfeifer U and Wilhelm E (2002). Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomyces*-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol.* 39:23-32.
- Strobel G and Daisy B (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67:491-502.
- Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, Arsenault WJ and Buchanan NA (1999). Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. *Plant Pathology.* 48:360-369.
- Suman A, Shasany AK, Singh M, Shahi HN, Gaur A and Khanuja SPS (2001). Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17:39-45.
- Sun L, Qiu F, Zhang X, Dai X, Dong X and Song W (2008). Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. *Microb Ecol.* 55:415-424.
- Vivas A, Vörös I, Biró B, Campos E, Barea JM and Azcón R (2003). Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungus (*G. mosseae*) and *Brevibacillus* sp. isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. *Environ Pollut.* 126:179-89.
- Zinniel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng Z, Kuczmarski D, Higley P, Ishimaru CA, Arunakunari A, Barletta RG and Vidaver AK (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl and Environm Microbiol.*



68:2198-2208.

TABLE 1. Molecular and physiological characterization of the endophytic bacteria isolated from

Isolate	Groups	Max identity (%)	Closest relative based on 16S rRNA gene sequence (BLAST)	Source of the best hit on BLAST	API-20E	
CC14		98%-264 nt identical	<i>Citrobacter sp</i>	Lignin degrading bacteria	<i>Enterobacter sp</i>	
CC16		100%-267 nt identical	<i>Enterobacter sp</i>	Bacteria from soy paste and soy sauce	<i>Pantoea sp</i>	
CC20		99%-266 nt identical	<i>Pantoea sp</i>	Plant- and clinic-associated <i>P. agglomerans</i>	<i>Kluyvera sp</i>	
CC21		99%-292 nt identical	<i>Pantoea</i>	Diazotrophic bacteria associated with	<i>Pantoea sp</i>	
CC22		100%-263 nt identical	<i>Klebsiella sp</i>	Wastewater treatment system reliant on N <sub>2</sub> fixation	<i>Klebsiella sp</i>	
CC26	Group I Enterobacteriaceae family	100%- 263 nt identical	<i>Enterobacter sp</i>	PGPR in rice	<i>Enterobacter sp</i>	
CC29		100%-267 nt identical	<i>Erwinia sp/Pantoea sp</i>	Diazotrophic bacteria associated with sugarcane	<i>Enterobacter sp</i>	
C33		100%-262 nt identical	<i>Enterobacter sp</i>	Urban wastewater treatment plant	<i>Enterobacter sp</i>	
CC37		98%-263 nt identical	<i>Enterobacter sp</i>	Stems of field-grown soybeans	<i>Enterobacter sp</i>	
CC43		100%-264 nt identical	<i>Enterobacter sp</i>	Bacteria from soy paste and soy sauce	<i>Enterobacter sp</i>	
CC46		97%-261 nt identical	<i>Enterobacter sp</i>	Stems of field-grown soybeans	<i>Enterobacter sp</i>	
CC47		100%-265 nt identical	<i>Pantoea sp</i>	Copper-resistant endophytic bacteria	<i>Pantoea sp</i>	
FC2P		99%-263 nt identical	<i>Enterobacter sp</i>	Stem-associated bacteria in soybeans	<i>Enterobacter sp</i>	
CC34		100%-263 nt identical	<i>Enterobacter sp</i>	Bacteria of soy paste and soy sauce	<i>Enterobacter sp</i>	
CC38	Group II Bacilli	98%-286 nt identical	<i>Brevibacillus sp</i>	Identification of a soil-born PGPR	NT	
CC18		99%-300 nt identical	<i>Staphylococcus sp</i>	Terrestrial Deep Subsurface	NT	
C27	Group III Actino-Bacteria	100%-289 nt identical	<i>Curtobacterium sp</i>	Sepsis caused by <i>Curtobacterium sp</i>	NT	
C24		98%-244 nt identical	<i>Pseudomonas sp</i>	Oil degrading bacterium	NT	
CC35		98%-244 nt identical	<i>Pseudomonas sp</i>	Oil degrading bacterium	NT	
FC5						
FC6		96%-239 nt identical	<i>Pseudomonas sp</i>	Bacteria isolated from Arctic seawater	NT	
FC10						
FC12		99%-331 nt identical	<i>Pseudomonas sp</i>	PGPR in the maize root	NT	
FC16		100%-247 nt identical	<i>Pseudomonas sp</i>	A potential biocontrol agent	NT	
FC18						
FC19	Group IV Pseudomonadaceae family	%-247 nt identical	<i>Pseudomonas sp</i>	A potential biocontrol agent	NT	
FC22		100%-247 nt identical	<i>Pseudomonas sp</i>	A potential biocontrol agent	NT	
FC23		100%-242 nt identical	<i>Pseudomonas sp</i>	Plant interactions of <i>Pseudomonas</i>	NT	
FC23		98%-243 nt identical	<i>Pseudomonas sp</i>	Bacteria from the region of a karst	NT	
FC35		98%-330 nt identical	<i>Pseudomonas sp</i>	PGPR in the maize root	NT	
FC38		98%-243 nt identical	<i>Pseudomonas sp</i>	Bacteria from the upstream region of a karst water rivulet	NT	
FC40						
			98%-242 nt identical	<i>Pseudomonas sp</i>	A potential biocontrol agent	NT
			97%-242 nt identical	<i>Pseudomonas sp</i>	Marine sediment from Arctic	NT
		97%-283 nt identical	<i>Pseudomonas sp</i>	Enhanced in situ biodegradation of toluene using a surfactant-modified zeolite support	NT	
FC26	Group V	96%-239 nt identical	Uncultured bacterium	Bacteria from the region of karst water rivulet	NT	

Brazilian sugarcane.