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

**Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana
associada às plantas**

Fernando Dini Andreote

Tese apresentada, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia. Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2007

**Fernando Dini Andreote
Engenheiro Agrônomo**

**Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana
associada às plantas**

Orientador:

Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia. Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Andreote, Fernando Dini

Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas / Fernando Dini Andreote. - - Piracicaba, 2007.
201 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Análise multivariada 2. Ecologia microbiana 3. Microrganismo endofíticos
4. Rizosfera 5. Técnicas moleculares I. Título

CDD 632.32

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*Aos meus pais, Fernando e
Fátima, que acreditaram em mim
desde o início e me deram o que o
ser humano pode possuir de
melhor; a educação*

DEDICO

*Aos meus irmãos Francisco e Ana
Paula, por me apoiarem em todas as
minhas decisões e dividirem comigo
todos os meus momentos*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

No dicionário agradecer significa *mostrar gratidão por; render graças; recompensar*.

Desta maneira, após dez anos de história no laboratório de genética de microrganismos da ESALQ/USP, dificilmente farei jus a todos que merecem aqui meu sincero agradecimento. No entanto, desafiando a memória, irei listar aqui as pessoas e agências de fomento que devem ser lembradas na conclusão desta etapa de minha vida. Meus sinceros agradecimentos:

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelas concessões das bolsas de doutorado, de estágio de doutorado no exterior e pelo financiamento do material de pesquisa, respectivamente;

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela confiança e ensinamentos nestes dez anos de convivência;

Ao Dr. Welington Luiz de Araújo, por ter me dado a primeira oportunidade e posteriormente ter se tornado grande amigo e ponto de referência nos momentos de decisões da minha vida;

À Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner, pela presença e total apoio durante este período, e pela cuidadosa leitura da tese, não deixando passar os erros de português;

Ao Dr. Leo van Overbeek, pela orientação e confiança durante o estágio de doutorado realizado no Plant Research International, em Wageningen na Holanda;

Aos também supervisores na Holanda Jan Dirck van Elsas e Arjen Speksnijder, por todo o apoio e ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Isaías Olivio Geraldi pelo empenho prestado para a obtenção da bolsa de PDEE junto a CAPES;

Aos doutores Carlos Alberto Labate e Itamar Soares de Melo, fundamentais no desenvolvimento do trabalho e em minha formação;

Aos funcionários e colegas do Departamento de Genética da ESALQ/USP;

A todos os colegas de trabalho que fazem parte ou passaram pelo laboratório de genética de microrganismos: Adalgisa Torres, Ademir, Ágata Giancoli, Aldo Procópio, Aline S. Romão, Ana Paula Pallu, Anderson Ferreira, André Lima, Andrea Bogas, Antonio Sérgio Ferreira Filho, Armando Dias, Carlos Eduardo Ceroni (K-du), Carlos Ivan Aguilar, Cláudia Gai, Cristina S. Maki, Danice Luvizotto, Fernanda Sebastianes, Fernando Barcellos, Heloíze Milano, Joelma Marcon, José Antonio da Silva (vulgo Zezo), Júlia Kuklinsky-Sobral, Léa Fávaro, Leonardo Souza, Luciana Ávila, Luciana Cursino, Manuella Dourado, Marcelo Gullo, Maria Beatriz Calderan, Maria Carolina Quecine, Marise Suzuki, Mayra Martins, Michele Silva, Paulo Lacava, Priscilla Rossetto, Renata Assis, Ricardo Yara, Rodrigo Mendes, Rodrigo Stuart, Rudi Procópio, Tais Lana, Uira Belmonte, Vanessa e Walter Maccheroni Jr.;

Aos colegas do *cluster Biointeractions and Plant Healthy*: Ulisses, Radi, Francesca, Els, Carin, Ilya, Ingrid, Mirjam, Joeke, Ronald e Hanna;

Ao pessoal do laboratório da Universidade de Mogi das Cruzes, Professores Luis Nunes, Regina, Vivian e Marcos e alunos Flávia, Fernanda, Aline, Emy e Stella;

Aos meus grandes amigos “Tozado” e “Azeitona” pelos momentos de alegria e pela amizade, que hoje revela a certeza que temos no potencial uns dos outros;

Às famílias Dini, Andreote e Sacilotto (em especial à Fátima e Juliana), cada qual a sua maneira, presentes em minha vida, me apoiando durante esta etapa;

Aos meus amigos e companheiros de Holanda, Xico, Paula, Bia, Veia e Rodrigo Taketani (vulgo Prego), por dividirem comigo os momentos longe de casa e por me aguentarem com fome durante nossas viagens;

Às minhas grandes amigas brasileiras de Wageningen, Carol e Betânia, pelos momentos inesquecíveis que vivemos e pela grande amizade;

À comunidade brasileira em Wageningen, pelos momentos que passamos, festas, jantares, além das eternas discussões sobre nosso país e nossos futuros; e às pessoas que me visitaram em Wageningen: Bia, meu primo Julianio, minha mãe, Thais, minha irmã Paula e meu cunhado Cardena, por levarem um pouco do Brasil até mim.

Aos demais amigos que estiveram presentes nesta etapa de minha vida: meu primo Smy, Polé, Thiaguinho, Tubaína, Jussara, Mayris e o pequeno Henrique, Isabela Dutra, família Almeida (Cris, Marcílio, Carol e Livia), Paulo Araújo, Jair, Pablo e Cris Hardoim, Joana Salles e Rodrigo Costa, e aos *mein groot vriends* Peter and Joana Zuurbier;

Ao pessoal da dança de salão (em especial ao meu professor Rafa e minhas parceiras Priscilla, Naira e Dani), grandes responsáveis por meus momentos de descontração, onde encontrei grande parte de meu equilíbrio, físico e emocional;

Enfim, à você que está em buca de seu nome, com certeza é merecedor de meus agradecimentos, e a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, meu Muito Obrigado por me mostrarem que:

“Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas não estará só”

Amyr klink

“Ao se caminhar para um objetivo, sobretudo um grande e distante objetivo, as menores coisas se tornam fundamentais. Uma hora perdida é uma hora perdida, e quando não se tem um rumo definido é muito fácil perder horas, dias ou anos, sem dar conta disso.”

Amyr Klink (Cem dias entre céu e mar)

SUMÁRIO

RESUMO.....	17
ABSTRACT	19
LISTA DE FIGURAS.....	21
LISTA DE TABELAS	31
1 INTRODUÇÃO	33
1.1 Revisão de Literatura.....	35
1.1.1 A diversidade bacteriana	35
1.1.2 As comunidades bacterianas associadas às plantas.....	36
1.1.2.1 A comunidade bacteriana na rizosfera	36
1.1.2.2 A comunidade bacteriana endofítica	37
1.1.3 Métodos de estudo das comunidades bacterianas	40
1.1.3.1 Isolamento e culturabilidade de comunidades bacterianas	40
1.1.3.2 Microbiologia molecular no estudo de comunidades bacterianas.....	41
1.1.3.2.1 Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA – <i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>).....	42
1.1.3.2.2 Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (DGGE- <i>Denaturing</i> <i>Gradient Gel Electrophoresis</i>).....	42
1.1.3.2.3 Análise multivariada aplicada aos perfis de PCR-DGGE	43
1.1.3.2.4 Bibliotecas de DNAr	44
1.1.3.2.5 PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	45
1.1.4 Fatores que influenciam na composição das comunidades bacterianas.....	46
1.1.4.1 Impacto de plantas transgênicas sobre comunidades microbianas	46
1.1.4.2 Inoculação de bactérias na composição das comunidades associadas às plantas	49
1.1.5 Interações planta-bactéria	50
1.1.5.1 A técnica de metabolômica no estudo da resposta de plantas	51
Referências	53
2 EFEITOS DO CULTIVO DE TABACO TRANSGÊNICO NA DIVERSIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA	63
Resumo	63
Abstract	65

2.1 Introdução	67
2.2 Desenvolvimento	69
2.2.1 Material e Métodos	69
2.2.1.1 Material vegetal.....	69
2.2.1.2 Isolamento da comunidade bacteriana	70
2.2.1.3 Caracterização dos isolados por meio da técnica de ARDRA	70
2.2.1.4 Análise por meio da técnica de PCR-DGGE	71
2.2.1.5 Análise estatística	72
2.2.2 Resultados.....	73
2.2.2.1 Isolamento e caracterização da comunidade bacteriana.....	73
2.2.2.2 Análise por PCR-DGGE.....	78
2.2.3 Discussão.....	82
Referências.....	87
3 A COMUNIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA DE EUCALIPTOS	
TRANSGÊNICOS E CONVENCIONAIS	89
Resumo.....	89
Abstract.....	91
3.1 Introdução	93
3.2 Desenvolvimento	95
3.2.1 Material e Métodos	95
3.2.1.1 Material vegetal e amostragem.....	95
3.2.1.2 Isolamento da comunidade bacteriana	96
3.2.1.3 Extração de DNA das colônias selecionadas para caracterização.....	96
3.2.1.4 Caracterização dos isolados por ARDRA.....	96
3.2.1.5 Identificação dos isolados por sequenciamento do gene 16S DNAr	97
3.2.1.6 Extração de DNA de amostras ambientais	97
3.2.1.7 PCR em tempo real.....	99
3.2.1.8 Obtenção dos perfis de DGGE.....	100
3.2.1.9 Análise dos perfis de DGGE.....	101
3.2.1.10 Construção da biblioteca grupo específica do gene 16S RNAr.....	101
3.2.1.11 Análise da biblioteca grupo específica do gene 16S RNAr.....	102

3.2.2 Resultados.....	103
3.2.2.1 Quantificação de bactérias por isolamento	103
3.2.2.2 Caracterização por ARDRA e ocorrência dos grupos bacterianos	103
3.2.2.3 Diversidade da comunidade cultivável de <i>Methylobacterium</i> spp. em rizoplano de eucalipto.....	108
3.2.2.4 PCR em tempo real.....	109
3.2.2.5 Diversidade das comunidades bacterianas da rizosfera e do rizoplano por DGGE	110
3.2.2.6 Análise das bibliotecas grupo-específico do gene 16S RNAr.....	115
3.2.3 Discussão.....	117
Referências	123
4 EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS NA COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA DA RAIZ E ENDOFÍTICA DE <i>Solanum tuberosum</i> E NO METABOLISMO DA PLANTA HOSPEDEIRA	127
Resumo	127
Abstract	129
4.1 Introdução	131
4.2 Desenvolvimento	133
4.2.1 Material e Métodos.....	133
4.2.1.1 Linhagens bacterianas utilizadas e obtenção de mutantes resistentes à rifampicina	133
4.2.1.2 BOX-PCR.....	133
4.2.1.3 Inoculação de bactérias.....	134
4.2.1.4 Cultivares de batata utilizados e cultivo das plantas.....	134
4.2.1.5 Isolamento da comunidade bacteriana	135
4.2.1.6 Extração de DNA das amostras de raiz e caule	136
4.2.1.7 PCR e eletroforese em gradiente desnaturante (PCR-DGGE)	136
4.2.1.8 Análise das imagens dos géis de PCR-DGGE	137
4.2.1.9 Análise de correlação entre a intensidade relativa de bandas e a densidade da população de <i>Pseudomonas</i>	137
4.2.1.10 Correlação dos perfis de PCR-DGGE com as variáveis ambientais.....	137

4.2.1.11 Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS)	138
4.2.1.12 Análise dos dados de LC-MS	139
4.2.2 Resultados	139
4.2.2.1 Obtenção dos mutantes resistentes à rifampicina	139
4.2.2.2 Colonização das plantas pelas espécies bacterianas avaliadas	139
4.2.2.3 Alterações nos perfis de PCR-DGGE	143
4.2.2.4 Correlação entre as variáveis ambientais e os perfis de DGGE	149
4.2.2.5 Alterações no perfil metabólico de plantas inoculadas com a linhagem P9 ^{FP}	153
4.2.3 Discussão	155
Referências	161
5 CULTURABILIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA DE	
<i>Solanum tuberosum</i>	165
Resumo	165
Abstract	167
5. 1 Introdução	169
5.2. Desenvolvimento	171
5.2.1 Material e Métodos	171
5.2.1.1 Amostragem e preparo das amostras de rizosfera	171
5.2.1.2 Preparo dos meios de cultivo	171
5.2.1.3 Quantificação de bactérias	172
5.2.1.4 Construção da biblioteca de clones do gene 16S RNAr a partir do DNA rizosférico	173
5.2.1.5 Sequenciamento dos isolados e clones	173
5.2.1.6 Análise de diversidade e rarefação	174
5.2.1.7 Filogenia das sequências e ocorrência em diferentes meios de cultivo	175
5.2.2 Resultados	175
5.2.2.1 Isolamento da comunidade bacteriana	175
5.2.2.2 Filogenia das microcolônias	179
5.2.2.3 Diversidade, riqueza e rarefação	180
5.2.2.4 Ocorrência de gêneros nos diferentes meios de cultivo	182
5.2.2.5 Isolamento de grupos bacterianos possivelmente não descritos	184

5.2.3 Discussão.....	186
Referências	191
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	193
ANEXOS.....	197

RESUMO

Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas

A interação entre bactérias e plantas resulta na ocorrência de vários processos biológicos no ambiente e pode ser regulada por diferentes fatores. Considerando que um recíproco reconhecimento ocorre entre as espécies de bactérias e plantas, alterações nos fatores bióticos e abióticos interferem diretamente nesta interação levando a modificações na composição das comunidades bacterianas associadas às plantas. No presente trabalho foram avaliados diferentes fatores que estão diretamente relacionados a este assunto. Atualmente, a aplicação de técnicas de microbiologia molecular permite acessar alterações causadas nestas comunidades de maneira independente do cultivo bacteriano. Desta maneira, foi demonstrado que na rizosfera de plantas de tabaco, os diferentes estágios de desenvolvimento são os principais determinantes da composição da comunidade bacteriana em detrimento do genótipo das plantas, sejam estas transgênicas ou convencionais. Utilizando plantas transgênicas e convencionais de eucalipto de diferentes genótipos, foi verificado que diferentes plantas não transgênicas podem apresentar comunidades bacterianas mais distintas do que quando os clones não transgênicos são comparados com os transgênicos. No entanto, efeitos específicos podem ocorrer na interação bactéria-planta, como o observado pela inibição da população de *Methylobacterium* spp. em plantas transgênicas de eucalipto TR-15. Avaliando o efeito da inoculação de bactérias endofíticas na composição de comunidades bacterianas associadas à plantas de batata de diferentes cultivares, os resultados mostram que a inoculação de *Pseudomonas putida* altera a comunidade bacteriana de maneira similar a alteração da variedade da planta. Os demais isolados avaliados, classificados como *Paenibacillus* sp. e *M. mesophilicum*, causam menores alterações na composição das comunidades bacterianas. Adicionalmente foi demonstrado que a colonização das plantas de batata pelo endófito *P. putida* resulta em pequena alteração no perfil metabólico da planta hospedeira. Por fim, buscando melhores métodos de isolamento da comunidade bacteriana da rizosfera de batata, os resultados mostraram que a mimetização do ambiente pode resultar em melhor acesso da diversidade bacteriana por meio de isolamento e cultivo das espécies componentes desta comunidade.

Palavras-chave: Rizosfera, Endofíticos, Ecologia microbiana, Técnicas moleculares, Análise multivariada

ABSTRACT

Determinant factors in the composition of bacterial communities with plants associated

The plant-bacteria interactions result in the occurrence of biological process in the environment and might be regulated by different factors. Considering that a reciprocal recognition occur amongst bacteria and plants species, shifts in biotic and abiotic factors interfere directly on these interactions, leading to modifications in the composition of bacterial communities to plants associated. In the present work different factors related to this subject were evaluated. Nowadays, the applications of techniques of molecular microbiology allow assessing the shifts caused on these communities by a culture independent approach. On this way, it was demonstrated that in rhizosphere of tobacco plants, different stages of plants development are main determinants of bacterial community composition rather than the plants genotypes, transgenic or not. Using plants transgenic or not, carrying different genotypes, it was verified that different non-transgenic plants could harbor bacterial communities more distinct than those observed in association with transgenic plants. However, specific effects could be observed like the inhibition of *Methylobacterium* spp. population in eucalyptus transgenic plants TR-15. Considering the effect of endophytic bacteria inoculation in the composition of bacterial communities associated to different cultivars of potato plants, the results show that inoculation of *Pseudomonas putida* causes similar shifts in the bacterial community similarly to those observed when different cultivars are considered. Other evaluated strains, classified as *Paenibacillus* sp. and *M. mesophilicum*, caused minor alterations in the composition of bacterial communities. In addition, it was demonstrated that plant colonization by endophytic *P. putida* results in small effects on the metabolic profile of host plant. At least, aiming better methodologies for bacteria isolation from potato rhizosphere, the results show that mimicking the natural environment could result in a better assessment of bacterial diversity by isolation of species present in this community.

Key-words: Rhizosphere, Endophytes, Microbial ecology, Molecular techniques, Multivariate analysis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Isolamento da porção cultivável da comunidade bacteriana da rizosfera e do rizoplano de plantas comuns e transgênicas de tabaco. Densidade da comunidade bacteriana isolada da rizosfera de plantas com um (A) e três (B) meses de cultivo; densidade bacteriana isolada do rizoplano de plantas com um (C) e três (D) meses de cultivo. Os símbolos indicam plantas comuns (WT); CAB1 e CAB2 e plantas TRP. São apresentadas as densidades dos diferentes grupos morfológicos de colônias observados; colônias amarelas (Y), colônias brancas (W) e colônias com morfologia de crescimento de actinomicetos (A). As barras indicam o desvio padrão obtido no experimento realizado com três repetições biológicas por tratamento. As letras indicam a diferença estatística ($p < 0.05$) na densidade da comunidade bacteriana total, observada entre diferentes plantas..... 74
- Figura 2.2 - Ocorrência dos grupos filogenéticos identificados a partir dos haplótipos de ARDRA observados dentro de cada um dos morfotipos de colônias bacterianas isoladas da rizosfera e do rizoplano de tabaco. Os nomes no eixo x indicam os grupos Y, W e A, que são formados por colônias amarelas, brancas e com característica de actinomicetos, respectivamente.... 75
- Figura 2.3 - Porcentagem dos grupos bacterianos identificados como principais componentes da comunidade bacteriana da rizosfera e do rizoplano de tabaco em plantas convencionais (WT) ou transgênicas (CAB1, CAB2 e TRP). (A) Grupo Y; (B) Grupo W; (C) Grupo A..... 77

Figura 2.4 - Análise de PCR-DGGE em amostras de rizosfera de plantas convencionais (WT) e transgênicas (CAB1, CAB2 e TRP) de tabaco. Perfis de DGGE das plantas em estado vegetativo (A) e de florescimento (B), onde os marcadores de corrida são representados por M. O perfil obtido também gerou a análise de componentes principais (PCA) na amostra de plantas em estado vegetativo (C) e a análise de correlação canônica (CCA) comparando os diferentes fatores que determinam a composição da comunidade bacteriana (D). Todas as variáveis ambientais utilizadas são apresentadas, porém as indicadas com * foram significantes ($p < 0.05$) utilizando o teste de permutação de Monte Carlo. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos..... 79

Figura 2.5 - Análise de PCR-DGGE em amostras de rizoplane de plantas convencionais (WT) e transgênicas (CAB1, CAB2 e TRP) de tabaco. Perfis de DGGE das plantas em estado vegetativo (A) e de florescimento (B), onde os marcadores de corrida são representados por M. O perfil obtido também gerou a análise de PCA na amostra de plantas em estado vegetativo (C) e a análise de CCA comparando os diferentes fatores que determinam a composição da comunidade bacteriana (D). Todas as variáveis ambientais utilizadas são apresentadas, porém as indicadas com * foram significantes ($p < 0.05$) utilizando o teste de permutação de Monte Carlo. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos..... 80

- Figura 2.6 - Filogenia das bandas de DGGE selecionadas por apresentarem ocorrência preferencial para as diferentes plantas de tabaco utilizadas, após um mês do cultivo das mesmas. O alinhamento das sequências e a filogenia foram realizados com base na sequência parcial, de 324 pares de base obtido das bandas, que foram comparados com sequências presentes no GenBank. A escala apresentada indica a divergência entre as diferentes sequências utilizadas na construção da árvore filogenética. A sequência de *Streptomyces* sp. foi utilizada para enraizar a árvore, como grupo externo..... 82
- Figura 3.1 - Densidade da população bacteriana total e de isolados similares a *Methylobacterium* spp no rizoplano de plantas de eucalipto. Os valores são referentes a media de quatro repetições, e as barras indicam o desvio padrão das amostras do mesmo genótipo de planta..... 105
- Figura 3.2 - Filogenia de isolados representantes do haplótipos de ARDRA encontrados na comunidade bacteriana da rizosfera e do rizoplano de plantas de eucalipto, demonstrando a filogenia dos haplótipos A e F (A), B, E e H (B), G (C) e C, D e I (D). A filogenia é baseada no agrupamento das sequências por similaridade de acordo com o coeficiente de Neighbor Joinning utilizando a sequência parcial do gene 16S DNAr, de aproximadamente 600 pares de bases. Os códigos apresentados são referentes ao registro das sequências no *GenBank*. Nas árvores são observados os valores de *bootstrap* realizado com 100 subamostragens no grupo de sequências. A sequência do gene 16S DNAr de *E. coli* foi utilizada como grupo externo, para enraizamento das árvores 106
- Figura 3.3 - Ocorrência dos grupos taxonômicos classificados por ARDRA na rizosfera (A) e no rizoplano (B) de plantas de eucalipto com os diferentes genótipos avaliados..... 107

- Figura 3.4 - Filogenia dos isolados de espécies *Methylobacterium* isolados do rizoplane de plantas comuns e transgênicas de eucalipto. A filogenia é baseada na sequência parcial de 1423 pares de base do gene 16S DNAr. As sequências dos isolados foram avaliadas em relação a similaridade com as sequências de *Methylobacterium* spp. presentes no *GenBank*, e foram correlacionadas com base no agrupamento por Neighbor-joining. A sequência de *Bradyrhizobium* sp. foi utilizada como grupo externo, para enraizamento da árvore filogenética. Os valores de bootstrap também são apresentados, sendo calculados por 100 subamostragens no grupo de sequências..... 108
- Figura 3.5 - Quantificação absoluta por PCR em tempo real de ácidos nucleicos filogeneticamente afiliados a grupos bacterianos alvos do primer 2F, que seleciona para um subgrupo da classe α -proteobactéria, que inclui o gênero *Methylobacterium*, em amostras de rizoplane de eucalipto. As amostras de WT17 foram utilizadas como referência., tendo portanto quantificação igual a 1. Nas demais amostras as barras indicam o erro padrão obtido de quarto repetições..... 109
- Figura 3.6 - PCA baseado nos perfis de PCR-DGGE obtidos a partir de amostras de rizosfera das plantas de eucalipto. Grupos bacterianos componentes da comunidade total da rizosfera foram acessados por meio de primer específicos para α -proteobactéria (A), β -proteobactéria (B) e actinomicetos (C). Os valores indicam a porcentagem da variância explicada nos eixos..... 111
- Figura 3.7 - PCA baseado nos perfis de PCR-DGGE obtidos a partir de amostras de rizoplane das plantas de eucalipto. Grupos bacterianos componentes da comunidade total da rizosfera foram acessados por meio de primer específicos para α -proteobactéria (A), β -proteobactéria (B) e actinomicetos (C). Os valores indicam a porcentagem da variância explicada nos eixos..... 112

- Figura 3.8 - Análise de componentes principais baseada nos perfis de PCR-DGGE obtidos a partir de amostras de rizosfera (A) e de rizoplano (B) de plantas de eucalipto para o grupo bacteriano selecionado pelo primer 2F, que é composto de um subgrupo da classe das α - proteobactéria, contendo o gênero *Methylobacterium*. Três repetições de cada genótipo de planta são apresentadas e os valores indicam a porcentagem da variância explicada nos eixos..... 113
- Figura 3.9 - Índices de diversidade de Shannon calculados a partir dos perfis de PCR-DGGE das diferentes plantas utilizando o primer 2F como seletivo para o subgrupo de α - proteobactéria em amostras de rizosfera e rizoplano. Os índices foram calculados considerando a intensidade das bandas como frequência de espécies dentro de cada amostra. As barras indicam o desvio padrão observado em três repetições de cada tratamento..... 114
- Figura 3.10 - Análise dos clones do gene 16S DNAr das bibliotecas obtidas a partir de DNA do rizoplano de plantas não transgênicas (WT17) e transgênicas (TR-15) de eucalipto. As afiliações das sequências são apresentadas aos níveis de ordens dentro da classe das α -proteobactéria (A) e de famílias dentro da ordem Rhizobiales (B). As sequências foram classificadas de acordo com o *RDPQuery* junto ao Ribosomal Data Project..... 116
- Figura 3.11 - Rarefação das sequências componentes das bibliotecas de DNA do rizoplano de plantas de eucalipto não transgênicas WT17 (A) e transgênicas TR-15 (B). Diferentes níveis de similaridade para determinação dos filotipos, indicando a análise para isolados (1.00), espécies (0.99 or 0.97), gêneros (0.95), famílias (0.92) e ordens (0.90)..... 117
- Figura 4.1 - Perfil de BOX-PCR dos mutantes resistentes à rifampicina. No gel de agarose são apresentados além dos marcadores de fragmento de DNA (M), os perfis de BOX-PCR das linhagens (P9, E119 e SR1.6/6) e dos respectivos mutantes (P9^{rp}, E119^{rp} e SR1.6/6^{rp})..... 140

- Figura 4.2 - Agrupamento por similaridade dos perfis de DGGE obtidos de amostras de raiz das diferentes cultivares de batata. Além da comunidade bacteriana total (A), também foram acessadas separadamente as populações de *Paenibacillus* spp. (B) e α -proteobactérias (C). O agrupamento foi determinado baseado na correlação de Pearson que considera as curvas densitométricas de cada amostra na análise de similaridade. As barras indicam o desvio padrão no agrupamento e os valores nos ramos indicam a correlação cofenética das amostras..... 144
- Figura 4.3 - Agrupamento por similaridade dos perfis de DGGE obtidos de amostras de endofíticos de caule das diferentes cultivares de batata. Além da comunidade bacteriana total (A), também foram acessadas separadamente as populações de *Paenibacillus* spp. (B) e α -proteobactérias (C). O agrupamento foi determinado baseado na correlação de Pearson que considera as curvas densitométricas de cada amostra na análise de similaridade. As barras indicam o desvio padrão no agrupamento e os valores nos ramos indicam a correlação cofenética das amostras..... 145
- Figura 4.4 - Agrupamento por similaridade dos perfis de DGGE obtidos de amostras de raiz de plantas da cultivar Robijn. Os perfis foram obtidos por meio de amplificação com primer específico para *Paenibacillus* spp nas amostragens realizadas após um (A) e dois (B) meses após inoculação. O agrupamento foi determinado baseado na correlação de Pearson que considera as curvas densitométricas de cada amostra na análise de similaridade. As barras indicam o desvio padrão no agrupamento e os valores nos ramos indicam a correlação cofenética das amostras. A seta indica a banda presente exclusivamente em amostras de plantas inoculadas com E119^{TP} (*Paenibacillus* sp.)..... 146

- Figura 4.5 - Agrupamento por similaridade dos perfis de DGGE obtidos de amostras da cultivar Eersteling comparando plantas controle com as inoculadas com P9^{TP} (*Pseudomonas putida*). Os perfis foram obtidos de amostras de raiz e endofíticas de caule por meio de amplificação com primer universal e específico para *Pseudomonas* spp. nas amostragens realizadas após um e dois meses após inoculação. O agrupamento foi determinado por correlação de Pearson que considera as curvas densitométricas de cada amostra na análise de similaridade. As barras indicam o desvio padrão no agrupamento e os valores nos ramos indicam a correlação cofenética das amostras. As setas indicam a banda referente a P9^{TP}..... 147
- Figura 4.6 - Agrupamento por similaridade dos perfis de DGGE obtidos de amostras da cultivar Robijn comparando plantas controle com as inoculadas com P9^{TP} (*Pseudomonas putida*). Os perfis foram obtidos de amostras de raiz e endofíticas de caule por meio de amplificação com primer universal e específico para *Pseudomonas* spp. nas amostragens realizadas após um e dois meses após inoculação. O agrupamento foi determinado por correlação de Pearson que considera as curvas densitométricas de cada amostra na análise de similaridade. As barras indicam o desvio padrão no agrupamento e os valores nos ramos indicam a correlação cofenética das amostras. As setas indicam a banda referente a P9^{TP}..... 148
- Figura 4.7 - Agrupamento por similaridade dos perfis de DGGE obtidos de amostras da cultivar Karnico comparando plantas controle com as inoculadas com P9^{TP} (*Pseudomonas putida*). Os perfis foram obtidos de amostras de raiz e endofíticas de caule por meio de amplificação com primer universal e específico para *Pseudomonas* spp. nas amostragens realizadas após um e dois meses após inoculação. O agrupamento foi determinado por correlação de Pearson que considera as curvas densitométricas de cada amostra na análise de similaridade. As barras indicam o desvio padrão no agrupamento e os valores nos ramos indicam a correlação cofenética das amostras. As setas indicam a banda referente a P9^{TP}..... 148

- Figura 4.8 - Análise de correlação entre a intensidade relativa de bandas de DGGE calculada pelo programa GelComparII e densidade populacional de P9^{TP} isolada das comunidades bacterianas de raiz (A) e endofíticas de caule (B) de batata. São apresentados dados utilizando primers universais e específicos para *Pseudomonas* spp. para obtenção dos perfis de DGGE. Os valores nas retas indicam a correlação linear (R^2) entre as variáveis quantificadas..... 149
- Figura 4.9 - Análise de correlação canônica (CCA) entre o perfil de bandas de DGGE, obtidos com primers universais em amostras de raiz e endofíticas de caule, e os fatores ambientais. São apresentadas análises dos isolamentos realizados de raiz após um (A) e dois (B) meses e de endofíticos de caule um (C) e dois (D) meses de inoculação cultivo das plantas em casa-de-vegetação. Todos os fatores ambientais são apresentados, porém apenas os marcados com * foram significantes para determinar a composição das comunidades bacterianas ($p < 0,05$) de acordo como o teste de permutação de Monte Carlo. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância correlacionada no respectivo eixo..... 152
- Figura 4.10 - Análise de correlação canônica (CCA) entre o perfil de bandas de DGGE de amostras de endofíticos de caule realizados com primers específicos para a população de *Pseudomonas* spp. e os fatores ambientais. São apresentadas análises das amostras de raízes após um (A) e dois (B) meses de cultivo das plantas, e as amostras de caule, também obtidas de plantas com um (C) e dois (D) meses de cultivo das plantas em casa-de-vegetação. Todos os fatores ambientais são apresentados, porém apenas os marcados com * foram significantes para determinar a composição das comunidades bacterianas ($p < 0,05$) de acordo como o teste de permutação de Monte Carlo. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância correlacionada no respectivo eixo..... 153

Figura 4.11 -	Distribuição de dados da análise de LC-MS comparando os dados de plantas controle com as plantas inoculadas com P9 ^{TP} . Os dados apontam os picos diferenciais nas diferentes cultivares e em ambos os tecidos avaliados.....	154
Figura 4.12 -	Perfil cromatográfico dos picos diferencialmente quantificados em caule (A) e folhas (B) de plantas inoculadas com a linhagem P9 ^{TP} de <i>Pseudomonas putida</i> . A coloração verde e vermelha indicam, respectivamente, a diminuição e o aumento na intensidade dos picos em plantas inoculadas em relação a plantas controle. A clusterização foi feita por correlação de <i>Pearson</i> a partir dos perfis das diferentes amostras (vertical) e dos diferentes picos (horizontal).....	156
Figura 5.1 -	Porcentagem da comunidade bacteriana total da rizosfera de plantas de batata isolada nos diferentes meios de cultivo. São apresentados dados obtidos após seis 15 dias de incubação das placas de cultivo. Os dados são média de sete repetições e as barras indicam o desvio padrão das amostras...	177
Figura 5.2 -	Número estimado de colônias em placa de cultivo com diluição da amostra 10 ⁵ ao longo do tempo nos diferentes meios de cultivo avaliados (considerando amostra inicial de 1g de rizosfera). Os dados são apresentados com contagens separadas para colônias observadas a olho nú e para aquelas observadas em estereoscópio (65X de aumento). A) R2A, B) Oligotrófico, C) Catalase e D) Extrato de rizosfera. As barras indicam os erros padrões obtidos a partir de sete repetições biológicas.....	178
Figura 5.3 -	Filogenia de microcolônias baseada na similaridade observada em 354 pb do gene 16S rRNA. Os códigos apresentados com os nomes de espécies são referentes ao código das sequências no GenBank. A escala representa a divergência entre as sequências. A sequência parcial do gene ribossomal 16S de <i>E.coli</i> 16S é utilizado como grupo externo, para enraizamento da árvore.....	179

- Figura 5.4 - Análise de rarefação de filotipos componentes das comunidades bacterianas isoladas nos diferentes meios de cultivo e de clones componentes da biblioteca construída a partir de DNA de solo. As análises são baseadas em sequências parciais do gene 16S ribossômico. As similaridades consideradas determinam as rarefações em diferentes níveis taxonômicos.... 180
- Figura 5.5 - Frequência dos gêneros bacterianos nas sequências de colônias obtidas nos meios de cultura (R2A, OL, CAT e REXT) e nos clones da biblioteca. A identificação dos gêneros foi feita por análise de similaridade das sequências no RDP Query considerando a sequência com maior similaridade presente no banco de dados..... 182
- Figura 5.6 - DCA demonstrando a ocorrência dos diferentes gêneros bacterianos dentre os isolados obtidos nos diferentes meios de cultivo. A proximidade entre os nomes dos gêneros e os pontos, que indicam os meios, é diretamente proporcional ao isolamento preferencial dos gêneros nos meios de cultivo. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada no eixo..... 183

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Estudos demonstrando os fatores que afetam a composição de comunidades bacterianas.....	47
Tabela 2.1 - Filogenia dos isolados representantes dos quatro haplótipos de ARDRA mais frequentes dentro de cada grupo morfológico isolado de amostras de rizosfera e rizoplane de plantas de tabaco. A classificação foi baseada em análise comparativa da sequência parcial do gene 16S rRNA com os bancos de dados do <i>Ribosomal Data Project (RDP)</i> e com análise por <i>Blastn</i> no <i>GenBank</i>	76
Tabela 2.2 - Variância explicada por cada uma das variáveis ambientais nas comunidades de rizosfera e rizoplane. A composição das comunidades foi avaliada por meio de perfis de bandas de DGGE obtidos com amplificação com <i>primers</i> para o domínio Bacteria.....	81
Tabela 3.1 - <i>Primers</i> usados neste capítulo para diferentes alvos de amplificação a partir do DNA de isolados, clones e amostras ambientais.....	98
Tabela 3.2 - Densidade da comunidade bacteriana isolada da rizosfera e do rizoplane de plantas transgênicas e não transgênicas de eucalipto. Os valores indicam a média, em Log10, de quatro repetições, seguidos dos valores de desvio padrão obtido das repetições.....	104
Tabela 4.1 - Características das cultivares de batata (<i>S. tuberosum</i>) utilizadas no experimento de inoculação com as espécies bacterianas.....	135
Tabela 4.2 - Densidade da comunidade bacteriana cultivável da raiz de plantas de batata. Os dados apresentados são referentes a comunidade total e da população das linhagens inoculadas nas diferentes cultivares de batata, nos períodos de um e dois meses após inoculação. Os valores indicam a média, em Log10, de quatro repetições, seguidos dos valores de desvio padrão obtido das repetições.....	141

Tabela 4.3 - Densidade da comunidade bacteriana cultivável endofítica de caule de plantas de batata. Os dados apresentados são referentes a comunidade total e da população das linhagens inoculadas nas diferentes cultivares de batata, nos períodos de um e dois meses após inoculação. Os valores indicam a média, em Log10, de quatro repetições, seguidos dos valores de desvio padrão obtido das repetições.....	142
Tabela 4.4 - Variância no perfil de bandas explicada por cada uma das variáveis ambientais nas comunidades bacterianas da raiz e endofíticas de caule de plantas de batata. Os dados avaliados foram gerados por meio da amplificação com <i>primers</i> para o domínio Bacteria.....	151
Tabela 4.5 - Variância no perfil de bandas explicada por cada uma das variáveis ambientais nas populações de <i>Pseudomonas</i> da raiz e endofíticas de caule de plantas de batata. Os dados avaliados foram gerados por meio da amplificação com <i>primers</i> específicos para o gênero <i>Pseudomonas</i>	151
Tabela 4.6 - Número de picos diferencialmente quantificados diferencialmente em plantas de batata inoculadas com o isolado P9 ^{TP} de <i>Pseudomonas</i> sp (num total de 5463).....	155
Tabela 5.1 - Densidade da comunidade bacteriana de plantas de batata, quantificada por contagem total e por isolamento em diferentes meios de cultivo. Os dados apresentados são referentes as contagens realizadas em placas com 16 dias de incubação para o desenvolvimento de colônias.....	176
Tabela 5.2 - Índices de diversidade e riqueza obtidos a partir da análise das sequências parciais do gene 16S RNAr dos isolados e dos clones da biblioteca.....	181
Tabela 5.3 - Isolados de diferentes meios de cultura com classificação possivelmente relacionada a grupos bacterianos não descritos. As sequências selecionadas apresentaram similaridades inferiores à 95% com as sequências presentes no banco de dados do <i>Ribosomal Data Project II</i>	185

1 INTRODUÇÃO

Na natureza, as bactérias são principalmente encontradas compondo comunidades bacterianas, que podem ser formadas por algumas ou milhares de diferentes espécies. Estes grupos de espécies podem ocupar os nichos terrestres colonizando o ambiente de maneira associada livre ou formando biofilmes, sendo em ambos os casos o equilíbrio entre as espécies determinado por diferentes fatores, que quando alterados, levam diretamente a alterações na composição da comunidade bacteriana.

Em plantas, comunidades bacterianas são encontradas em associação com diferentes tecidos vegetais, podendo atuar em processos essenciais para o desenvolvimento vegetal, como por exemplo, no auxílio para a obtenção de nutrientes, promovendo o crescimento vegetal por meio de produção de fitormônios, ou até mesmo protegendo contra patógenos, seja por antibiose direta ou pela indução de resistência sistêmica vegetal.

Dentre as comunidades bacterianas em associação com as plantas, serão destacadas as comunidades bacterianas da rizosfera e endofíticas. A rizosfera é a fração do solo que sofre influência da liberação de exudatos de raiz, onde bactérias presentes no solo, e que tem a capacidade de responder a esta liberação aumentam suas respectivas populações e passam a interagir de maneira mais intensa com a espécie vegetal em desenvolvimento. Os endófitos são bactérias que colonizam os tecidos internos das plantas sem características patogênicas. Desta maneira, estas bactérias podem ser de extrema importância na suplementação nutricional das plantas e na interação direta com fitopatógenos que coexistem neste ambiente. Vale ressaltar que algumas bactérias da rizosfera são capazes de colonizar as plantas endofiticamente, mostrando a especificidade da interação bactéria-plantas. A colonização de plantas por bactérias endofíticas pode causar alterações, que podem ocorrer no nível transcricional, traducional ou catalítico do metabolismo vegetal.

Estas comunidades bacterianas em interação com as plantas respondem rapidamente a alterações neste ambiente, seja esta alteração relativa à planta hospedeira ou aos componentes desta comunidade. Desta forma, as comunidades bacterianas podem ser usadas como indicadores de alterações ambientais, sendo estas comunidades as primeiras a serem afetadas em caso de impactos ambientais, que podem posteriormente atingir outras espécies componentes do ecossistema.

Os genótipos das plantas cultivadas são considerados como importantes fatores para determinar a composição das comunidades bacterianas associadas às plantas. A presença de espécies bacterianas no ambiente também é um importante fator na determinação da composição da comunidade bacteriana.

Para determinar estas alterações muitas metodologias estão disponíveis, dentre as quais as técnicas de microbiologia molecular compõem uma alternativa de grande interesse, por permitir a avaliação total da comunidade bacteriana, não limitando a análise à fração cultivável de espécies bacterianas. No entanto, uma melhor culturabilidade de comunidades bacterianas é de grande interesse, sendo a suplementação de moléculas essenciais e a mimetização do ambiente os pontos mais explorados para obter melhor representação das comunidades bacterianas do ambiente por meio de isolamento e cultivo de seus componentes.

Desta maneira, no presente trabalho avaliamos diferentes fatores que interferem na ocorrência qualitativa e quantitativa de espécies em comunidades bacterianas associadas à diferentes espécies vegetais. No presente trabalho são verificados tanto os efeitos do cultivo de plantas convencionais de diferentes genótipos, bem como os efeitos do cultivo de plantas transgênicas na composição destas comunidades. Avaliamos também o efeito da inoculação de bactérias em plantas para determinar a composição destas comunidades, sendo conjuntamente nesta etapa avaliado o perfil metabólico de plantas colonizadas pelo isolado inoculado, com o objetivo de determinar alterações no metabolismo da planta hospedeira. Por fim exploramos a mimetização do ambiente rizosférico para o isolamento de espécies bacterianas deste ambiente.

1.1 Revisão de Literatura

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein

1.1.1 A diversidade bacteriana

Os microrganismos compõem uma das maiores fontes de diversidade genética disponível entre os seres vivos, no entanto, esta diversidade ainda encontra-se pouco descrita e explorada (PROSSER et al., 2007). Dentre os microrganismos, podem ser destacadas as bactérias, que representam um dos três domínios (Archaea, Bacteria e Eucarya) da árvore filogenética atualmente considerada (WOESE, 1994). As bactérias apresentam longa história evolutiva, permitindo a elas ocupar os mais diferentes nichos da biosfera, sendo encontradas em praticamente todos os ambientes terrestres. As bactérias representam a maior biomassa viva no planeta e são responsáveis por muitos processos essenciais para a manutenção da vida nas condições ambientais atuais. Esta grande diversidade genética e metabólica faz destes microrganismos uma fonte potencial de bioprodutos (RODRIGUEZ-VALERA, 2004).

Além da diversidade de espécies bacterianas, existe também a diversidade de genes que estão presentes dentro de uma mesma espécie. A espécie genômica bacteriana é definida como o total de genes da linhagem caracterizada da espécie, que é dividido em dois componentes: (i) o ‘grupo essencial’ de genes, que estão presentes em pelo menos 95% das linhagens e são fundamentais para o processo vital celular e (ii) o ‘grupo auxiliar’ de genes, que pode ser encontrado em 1 a 95% das linhagens, sendo estes genes ligados à adaptação da espécie em diferentes ambientes. O ‘grupo essencial’ é mantido nas espécies pelas especiações e descendência vertical, sendo diferentes de uma espécie para outra, enquanto que o ‘grupo auxiliar’ não identifica a espécie por ser diferente em cada linhagem, sendo este grupo de genes também transmitidos por transferência horizontal ou lateral de genes (BOUCHER; NESBO; DOOLITTLE, 2001).

Desta forma observa-se que a diversidade bacteriana não é de forma alguma estática, sendo observada uma alta capacidade reprodutiva, com ciclos vitais muito curtos, o que leva a alta capacidade adaptativa, com rápida alteração no perfil destas comunidades devido a alterações do ambiente (ABBY; DAUBIN, 2007). Além desta grande capacidade em perpetuar a espécie,

baseada na rápida reprodução e adaptação, a capacidade de adquirir DNA por transferência lateral de genes, aumenta ainda mais a diversidade e conseqüentemente a adaptabilidade das bactérias aos ambientes terrestres (KONSTANTINIDIS; RAMETTE; TIEDJE, 2006).

1.1.2 As comunidades bacterianas associadas às plantas

1.1.2.1 A comunidade bacteriana na rizosfera

Dentre todos os ambientes existentes e estudados, certamente, a rizosfera é aquela que desperta maior atenção, bem como exige uma maior quantidade de técnicas e de conhecimento para seu satisfatório estudo e compreensão. Isto faz com que este seja o sistema mais complexo a ser avaliado, o que apesar de gerar dificuldades no desenvolvimento da pesquisa também é um dos que mais resultam em dados importantes ao estudo aplicado e convertido em vantagens na produção agrícola ou na preservação da biodiversidade e do meio ambiente.

O termo rizosfera é definido como a região do solo que sofre influência do desenvolvimento das raízes. Esta faixa de solo recebe das plantas várias substâncias que são liberadas quando as raízes estão em desenvolvimento, como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, isoflavonóides, hormônios e enzimas de plantas (PIERSON, 2000). Estas substâncias fazem deste ambiente um local com alta concentração de nutrientes disponíveis para o desenvolvimento de microrganismos, resultando em uma alta atividade microbiana neste nicho. Estes microrganismos rizosféricos estão associados com os processos de decomposição e de ciclagem de nutrientes no sistema solo-planta (GERMIDA; SICILIANO; SEIB, 1998; KHAN; ZAIDI; WANI, 2007), além de estarem envolvidos com a sanidade da planta hospedeira (DE BOER; KOWALCHUK; VAN VEEN, 2006).

Algumas destas bactérias podem atuar negativamente no desenvolvimento vegetal, inibindo o crescimento, causando murchas, reações necróticas ou até mesmo distorção de folhas e raízes (SCHIPPERS; BAKKER; BAKKER, 1987). Entretanto, existem as bactérias benéficas às plantas, que incluem desde os íntimos simbioses, como rizóbios, até as espécies saprofíticas de vida livre, que atuam aumentando a disponibilidade de nutrientes ou suprimindo o desenvolvimento de potenciais fitopatógenos. Muitas destas bactérias produzem auxinas, etileno, citocininas, vitaminas e outras substâncias diretamente envolvidas com o desenvolvimento

vegetal, e que podem atuar positivamente sobre a produtividade no campo (SCHIPPERS; BAKKER; BAKKER, 1987).

O conhecimento da dinâmica populacional de comunidade bacteriana da rizosfera é de grande interesse para determinar os fatores que determinam qualitativa e quantitativamente a composição destas comunidades. O perfil de espécies que se associam a rizosfera ou a uma raiz vegetal pode ser afetado por diversos fatores como os compostos exsudados pela raiz ou a disponibilidade de água e nutrientes (KOZDROJ; VAN ELSAS, 2000; BAUDOIN; BENIZRI; GUCKERT, 2003). Estes fatores são alterados ao longo do desenvolvimento da planta, o que sugere a ocorrência de uma sucessão de espécies bacterianas colonizando ativamente a rizosfera e interagindo com a planta (DEIGLMAYR et al., 2006). Deve-se ainda somar a esta complexidade os fatores de interação entre espécies que colonizam a mesma rizosfera em dado momento do desenvolvimento vegetal. Diferentes bactérias atuam na competição por nutrientes, colonização de nichos, além de produzirem compostos como antibióticos, sideróforos ou bacteriocinas, que podem atuar de maneira decisiva no competitivo ambiente rizosférico (KATIYAR; GOEL, 2004; FREY-KLETT et al., 2005; AN et al., 2006). Devido a estes fatores e a alta complexidade deste ambiente, as comunidades bacterianas descritas são compostas por muitas espécies, que se apresentam associadas umas as outras de diversas maneiras.

Uma estrutura complexa como um biofilme rizosférico é algo que precisa ter um mecanismo muito eficiente de sinalização molecular, para que os componentes deste sistema reconheçam quando e como devem se associar ou se desligar deste complexo. A sinalização entre microrganismos rizosféricos é conhecida em alguns casos, onde são observadas alterações na biossíntese de compostos dos microrganismos quando da presença de outras espécies. Um dos sistemas mais conhecidos de comunicação entre bactérias é o sistema de *quorum sensing*, onde pequenas moléculas podem atuar inibindo ou estimulando a expressão de genes que determinam a interação entre os membros de uma comunidade bacteriana e seu comportamento em relação a planta hospedeira (LIU et al., 2007).

1.1.2.2 A comunidade bacteriana endofítica

Além das bactérias associadas às plantas na região da rizosfera, existem também as bactérias que colonizam o interior da planta, as quais são denominadas de bactérias endofíticas.

Uma definição simples define bactérias endofíticas como aquelas isoladas de tecidos de plantas superficialmente desinfetados (HALLMANN et al., 1997). Utilizando uma definição mais completa, temos os endófitos definidos como microrganismos que colonizam os tecidos internos da planta, sem causar danos aparentes ao hospedeiro e sem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO, 2000). Alguns critérios para reconhecimento de verdadeiros endófitos foram descritos (REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998), onde os autores destacam a importância não apenas do isolamento, mas também da posterior análise de colonização das plantas pelos isolados candidatos a endófitos.

As bactérias endofíticas possuem, da mesma forma que patógenos, a capacidade de penetrar na planta e colonizar sistematicamente o hospedeiro, podendo habitar o apoplasto, vasos condutores e ocasionalmente o meio intracelular (QUADTHALLMANN; KLOEPPER, 1996; QUADTHALLMANN; HALLMANN; KLOEPPER, 1997). Com esta colonização sistêmica da planta, estas bactérias podem alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro, além de atuar sobre as populações de outros microrganismos presentes no interior da planta (ANDREOTE et al., 2006). Muitas revisões acessam tanto o comportamento ecológico, bem como as aplicações de endófitos (HALLMANN et al., 1997; STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000; ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006).

Dentre as bactérias endofíticas mais estudadas, utilizadas para o controle biológico, destacam-se os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*. Entretanto, um grande número de bactérias apresenta antagonismo contra vários tipos de fungos e bactérias fitopatogênicas. A comunidade bacteriana endofítica de batata (*Solanum tuberosum*) foi amplamente estudada, tendo sido verificada a alta ocorrência de isolados que apresentam antibiose ao fungo patogênico *Rhizoctonia solani* (STURZ; CHRISTIE; MATHESON, 1998). Técnicas independentes de cultivo, como o PCR-DGGE foram também aplicadas no estudo e descrição destas comunidades (GARBEVA et al., 2001; ARAUJO et al., 2002; RASCHE et al., 2006b). Em arroz a presença de bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas* com atividade sobre os patógenos *Achlya klesbiana* e *Phytophthora blight* foi verificada (ADHIKARI et al., 2001).

A atividade endofítica no controle biológico pode ser resultado de vários fatores, como produção de antibióticos, promoção de crescimento e indução de resistência sistêmica (MADHAIYAN et al., 2004). A produção de antibióticos é considerada um importante fator de antagonismo nas raízes, onde também atuam outros compostos, como enzimas que impedem o

desenvolvimento de patógenos (BUCHENAUER, 1998). Foi constatado também o controle de patógenos por parasitismo, onde uma linhagem de *Burkholderia cepacia*, isolada de aspargos colonizou os espaços intercelulares de raízes de banana, levando ao controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (PAN et al., 1997). Os autores observaram *in vitro*, que esta bactéria coloniza a superfície da hifa do patógeno, causando protuberâncias, que resultam em deformação do micélio e conseqüente redução no potencial patogênico do fungo. Em tomate, a aplicação da bactéria *Pseudomonas* sp. (linhagem PsJN) induziu resistência sistêmica a *Verticilium dahliae*, mostrando que a colonização do endófito é capaz de ativar o sistema defesa da planta, resultando na resistência ao patógeno (SHARMA; NOWAK, 1998; KAVINO et al., 2007). Alguns autores sugerem que a penetração ativa da bactéria endofítica no hospedeiro, com hidrólise de celulose, pode causar uma reação de hipersensibilidade, ativando os mecanismos de defesa da planta (QUADTHALLMANN; BENHAMOU; KLOEPPER, 1997).

O gênero *Methylobacterium* também é descrito como endófito de plantas, sendo encontrado em muitas espécies, como citros (ARAUJO et al., 2001; ARAUJO et al., 2002), pinus (PIRTTILA et al., 2000), crotalária (SY et al., 2001), arroz (MADHAIYAN et al., 2004) e amendoim (MADHAIYAN et al., 2006b). Além de endófitos, as espécies do gênero *Methylobacterium* ocupam também outros habitats, incluindo solo, água, superfícies de folha, nódulos, grãos, ar entre outros. Estudos anteriores têm demonstrado que *Methylobacterium* spp. coloniza ativamente a superfície de folhas de diferentes hospedeiros (CHANPRAME; TODD; WIDHOLM, 1996). Em citros, espécies de *Methylobacterium* têm sido consistentemente isoladas como endófito de ramos (ARAUJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004), e nesta planta esta população interage com o patógeno *Xylella fastidiosa* (ARAUJO et al., 2002). Essas populações estimulam o desenvolvimento dos sintomas da CVC por favorecimento no desenvolvimento de *X. fastidiosa* (LACAVA et al., 2004). Espécies do gênero *Methylobacterium* são descritas como promotoras de crescimento vegetal (MADHAIYAN et al., 2006a) ou indutoras de resistência sistêmica (MADHAIYAN et al., 2006b).

A espécie *M. extorquens* também é amplamente encontrada em associação com as plantas, sendo recentemente estudada por meio da técnica de proteômica (GOURION; ROSSIGNOL; VORHOLT, 2006), onde os autores identificaram proteínas exclusivamente expressas por esta espécie quando colonizando a filosfera de plantas. Os autores encontraram 45 proteínas mais abundantes em células bacterianas em contato com as folhas do que àquelas crescendo em meio

de cultivo. Dentre as proteínas diferencialmente quantificadas foram verificadas as presenças de proteínas de resposta a stress, além de dois domínios de resposta, PhyR e um fator C-terminal, sendo este último referente a um mecanismo de resposta presente apenas em bactérias pertencentes à classe α -proteobactéria (GOURION; ROSSIGNOL; VORHOLT, 2006).

1.1.3 Métodos de estudo das comunidades bacterianas

1.1.3.1 Isolamento e culturabilidade de comunidades bacterianas

O isolamento em meio de cultivo é a metodologia mais amplamente utilizada no estudo das comunidades bacterianas presentes nos mais diferentes ambientes. Muitos parâmetros influenciam a atividade e a densidade das populações que compõem as comunidades bacterianas (RASCHE et al., 2006a). A alta diversidade bacteriana presente neste nicho torna difícil a exploração e o conhecimento detalhado deste ambiente. As dificuldades encontradas são principalmente devido a falta de representatividade observada na comparação entre as comunidades criadas e cultivadas pelo ambiente com as comunidades bacterianas que são obtidas em meios de cultivo (FELSKE et al., 1999; EILERS et al., 2000). Com isto foi determinado que apenas uma pequena porção da diversidade microbiana total é acessada por meio de técnicas baseadas em cultivo (TYSON; BANFIELD, 2005).

Desta maneira, o desenvolvimento das técnicas de cultivo deve ser alvo de estudos, buscando uma melhor representatividade das comunidades bacterianas na forma de isolados e permitindo a exploração de funções microbianas desconhecidas (HAMAKI et al., 2005). A modificação das condições de cultivo, como alteração da atmosfera, da disponibilidade de nutrientes e na suplementação de moléculas sinalizadoras pode resultar em uma melhor acessibilidade da comunidade bacteriana do solo por meio de técnicas de cultivo (STEVENSON et al., 2004). Mimetizar o ambiente resulta no cultivo de espécies anteriormente não cultiváveis, como descrito na aplicação de extrato de solo ao meio de cultura com baixos níveis de nutrientes, o que levou no isolamento de espécies bacterianas não descritas (HAMAKI et al., 2005). Também utilizando meios de cultivo com baixa disponibilidade de nutrientes, isolados pertencentes aos grupos *Verrucomicrobium* e *Acibacteria* foram obtidos em placas de cultivo (JANSSEN et al., 2002). Em ambientes aquáticos a suplementação dos cultivos com moléculas

sinalizadoras, como adenosina monofosfato cíclica (AMP cíclica) ou acil-homoserina lactonas (AHLs), resultou numa maior culturabilidade da comunidade bacteriana (BRUNS; CYPIONKA; OVERMANN, 2002; BRUNS et al., 2003). De maneira geral, as tentativas mais promissoras baseiam-se na mimetização do ambiente, fornecendo às bactérias em estudo as condições naturais encontradas no ambiente. No entanto, a combinação de técnicas independentes de cultivo são atualmente, essenciais em estudos que visam acessar alterações nas comunidades bacterianas devido à alterações no ambiente.

1.1.3.2 Microbiologia molecular no estudo de comunidades bacterianas

A aplicação de técnicas baseadas na detecção e análise da diversidade de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) presentes em amostras ambientais é fundamental nos estudos de diversidade microbiana, principalmente por permitir a análise de maneira independente do cultivo das bactérias presentes nas amostras, o que exclui todos os problemas e limitações devidos a baixa culturabilidade das comunidades bacterianas. No entanto, a biologia molecular pode também ser utilizada de maneira complementar aos dados de isolamento, como por exemplo, na caracterização de isolados por padrões de restrição de determinados genes, como a técnica de Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA), onde o polimorfismo de genes ribossomais é acessado.

A maioria das técnicas moleculares aplicadas a estudos microbiológicos baseia-se nas diferenças de composição dos genes ribossomais. Em bactérias, o gene 16S ribossomal (16S DNAr) é o mais amplamente utilizado, sendo considerado uma das mais importantes moléculas para o estudo de filogenia e ecologia microbiana (LOUWS; RADEMAKER; DE BRUIJN, 1999). O sequenciamento desse gene permite a identificação de microrganismos no nível de gênero e possivelmente no nível de espécie, como também pode permitir correlações entre o genótipo e o ambiente estudado (CHENEBY et al., 2000).

A diversidade bacteriana foi acessada em vários ambientes baseando-se nos genes 16S DNAr dos seus componentes, revelando a grande diversidade que deixa de ser explorada quando apenas os métodos baseados em cultivo são aplicados (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998; PROSSER et al., 2007). Utilizando técnicas independentes de cultivo baseadas em seqüências do gene 16S DNAr foram também descritas as comunidades bacterianas de folhas de árvores da

mata Atlântica, que têm 400 filotipos bacterianos em cada espécie de árvore (LAMBAIS et al., 2006) e a comunidade bacteriana do oceano, sendo estimado a presença de valores próximo a vinte uma mil sequências diferentes compondo esta comunidade (SOGIN et al., 2006).

1.1.3.2.1 Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA - *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*)

Uma das formas de avaliar a variabilidade genética de uma população é pela técnica ARDRA, a qual consiste na amplificação e posterior digestão do DNAr com enzimas de restrição, formando grupos de acordo com a similaridade das bandas observadas. Estas alterações nos perfis de bandas mostram a diversidade entre e dentro dos grupos bacterianos cultivados, agrupando os indivíduos de genótipos semelhantes (MOCALI et al., 2003; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). Os genes de DNAr utilizados são considerados cronômetros evolutivos, pois são genes que apresentam uma taxa de mutação mínima, sendo que o produto da expressão é funcional e essencial para a vida do organismo. Além disso, estes genes apresentam sítios diferenciais de evolução rápida ou lenta, permitindo a avaliação das relações filogenéticas entre organismos em diferentes distâncias filogenéticas.

1.1.3.2.2 Gel de Eletroforese em Gradiente Desnaturante (DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

O PCR-DGGE é um método de estudo utilizado em levantamentos e comparações na composição e diversidade de comunidades microbianas (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000). A técnica de DGGE separa *amplicons* de PCR de tamanhos similares com base na diferença de composição de sequências em um gel com gradiente de desnaturação (MUYZER; DEWAAL; UITTERLINDEN, 1993). A técnica apresenta alta resolução na qual um grande número de amostras pode ser rapidamente comparado revelando a dinâmica de comunidades microbianas (MUYZER; SMALLA, 1998).

No início do desenvolvimento da técnica as comparações entre comunidades bacterianas eram feitas utilizando iniciadores ou *primers* para o domínio Bacteria, os chamados *primers* universais (MUYZER; DEWAAL; UITTERLINDEN, 1993; HEUER et al., 1997).

Posteriormente, alguns *primers* grupo-específico foram descritos, tendo como principais vantagens a acessibilidade de determinadas populações bacterianas separadamente e também uma melhor definição de perfis nas análises de comunidades bacterianas complexas, como as presentes no solo e na rizosfera. Alguns *primers* selecionam grandes grupos bacterianos, como as classes α , β -proteobactéria (GOMES et al., 2001) ou actinomicetos (HEUER et al., 1997). De maneira mais específica, *primers* foram desenvolvidos para acessar populações mais restritas, como por exemplo gêneros, dentre os quais podem ser citados os *primers* específicos para os gêneros *Pseudomonas* (WIDMER et al., 1998; GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004; MILLING et al., 2004), *Paenibacillus* (DA SILVA et al., 2003) e *Burkholderia* (SALLES; DE SOUZA; VAN ELSAS, 2002). Todos estes *primers*, tanto universais como os grupo específicos, foram desenvolvidos tendo como base o gene 16S ribossomal.

No entanto, alguns trabalhos mostram o desenvolvimento de *primers* para DGGE tendo como base outros genes. O primeiro gene opcional a ser considerado para desenvolvimento de *primers* de DGGE foi o da RNA polimerase, sendo o gene *rpoB* alvo utilizado como base dos *primers* (PEIXOTO et al., 2002). Alguns genes funcionais também foram considerados nesta linha de desenvolvimento, como os genes *nifH* (ROSADO et al., 1998) e o gene *mxoF* (HENCKEL; FRIEDRICH; CONRAD, 1999). Com esta gama de *primers* disponíveis, o estudo de comunidades bacterianas baseado em análise de DGGE é uma interessante ferramenta, que pode suprir informações importantes sobre alterações em sua composição.

1.1.3.2.3 Análise multivariada aplicada aos perfis de PCR-DGGE

Com a ampla utilização da técnica de PCR-DGGE no estudo de comunidades bacterianas, a simples comparação visual entre os perfis das comunidades passou a não fornecer toda informação possível de ser obtida por meio da aplicação desta técnica. Desta maneira os perfis de DGGE foram utilizados para aplicação de diferentes técnicas de análise, que se iniciou por comparação das curvas densitométricas e, posteriormente, na utilização dos dados (qualitativos ou quantitativos) gerados em análise multivariada.

A aplicação da análise multivariada em estudos de comunidades bacterianas é recente, tendo como principal vantagem a avaliação conjunta de vários fatores envolvidos na determinação da composição das comunidades bacterianas de forma conjunta. Os fatores

determinantes da comunidade de bactérias de solo foram os primeiros a serem estudados utilizando esta estratégia (STEENWERTH et al., 2002). Posteriormente, a influência do histórico do solo e do cultivo de diferentes espécies de plantas na determinação da comunidade de *Burkholderia* spp. foi determinada por meio da utilização da análise multivariada (SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004). A seleção de componentes da população de *Pseudomonas* spp. em rizosfera de plantas também foi estudada por análise multivariada (COSTA et al., 2006). Neste estudo os autores determinam por análise multivariada o efeito rizosférico como determinante da composição da população de *Pseudomonas* spp. ao invés dos locais de cultivo.

Para aplicação da técnica de análise multivariada em dados de PCR-DGGE, as imagens dos géis, normalizadas e convertidas, são transformadas em matrizes de presença/ausência de bandas que passam a ser tratadas como espécies. Da mesma maneira, as intensidades relativas das bandas são consideradas a frequência de ocorrência destas espécies nas comunidades bacterianas a serem avaliadas (SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004).

1.1.3.2.4 Bibliotecas de DNAr

A técnica de construção e sequenciamento de bibliotecas de clones de genes ribossomais é uma ferramenta de alta sensibilidade no estudo de comunidades microbianas, que possibilita a comparação entre genótipos de microrganismos não cultiváveis, que representam 99% do total de espécies presentes em amostras ambientais (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005).

A comunidade fúngica do solo de florestas foi caracterizada por meio da aplicação desta técnica, onde os autores identificaram uma grande diversidade, obtendo 412 filotipos com a análise de 863 sequências clonadas (O'BRIEN et al., 2005). Utilizando a mesma técnica para estudos de comunidades bacterianas foi possível determinar a enorme diversidade de bactérias que colonizam a superfície de folhas de árvores na floresta Atlântica (LAMBAIS et al., 2006). Neste trabalho, os autores mostram por comparação de bibliotecas de clones de diferentes espécies de árvores, que as comunidades bacterianas do filoplano são diferentes em cada uma das espécies avaliadas, o que eleva significativamente a diversidade bacteriana a ser explorada neste ambiente.

De maneira similar, porém utilizando a técnica de piro sequenciamento, a comunidade bacteriana presente no perfil de profundidade do oceano foi descrita (SOGIN et al., 2006), onde

os autores também descrevem uma rara e inexplorada diversidade de espécies compondo estas comunidades. Retomando como enfoque as comunidades bacterianas associadas às plantas, as bibliotecas de clones foram utilizadas também para estudar as comunidades de bactérias e Archaeas associadas às plantas de milho (CHELIUS; TRIPLETT, 2001), fornecendo não apenas dados de grupos componentes desta comunidade, mas também a abundância de grupos encontrados em relação ao número de sequências avaliadas.

1.1.3.2.5 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A PCR em tempo real (qPCR) é uma ferramenta altamente sensível capaz de detectar e quantificar os produtos de amplificação de uma reação de PCR. Esta detecção é realizada por meio de marcadores fluorescentes presentes na reação de amplificação. O marcador fluorescente mais comumente utilizado é o corante SYBR Green I, o qual possui a capacidade de se intercalare à dupla fita de DNA e emitir o sinal fluorescente, quando excitado, no comprimento de onda de 494 a 521nm. O sinal emitido é então quantificado e utilizado para determinar a quantidade de amplificação presente neste momento na reação. Com o decorrer da amplificação, quando um valor arbitrário de amplificação é atingido, é alcançado o valor chamado de Ct (limiar do ciclo de detecção - *cycle threshold*). Este valor de Ct é o utilizado na estimativa de quantidade de DNA presente inicialmente na reação de PCR.

Utilizando a técnica de qPCR vários grupos e espécies de bactérias têm sido alvos de quantificação. O patógeno bacteriano *Xylella fastidiosa* de citros foi quantificado por meio da aplicação desta técnica (OLIVEIRA et al., 2002). Bactérias não patogênicas associadas às plantas também foram quantificadas por qPCR, como por exemplo a colonização endofítica de *Catharanthus roseus* por *Methylobacterium mesophilicum* (LACAVA et al., 2006). Em *Brassica oleracea*, a população da bactéria promotora de crescimento vegetal *Enterobacter radicincitans* teve sua população monitorada por meio de qPCR em combinação com hibridização *in situ* (RUPPEL; RUHLMANN; MERBACH, 2006), determinando não apenas sua quantidade como também sua localização no interior da planta hospedeira. Além da quantificação da população de grupos bacterianos, a técnica de qPCR também é amplamente aplicada a estudos de expressão gênica microbiana, sendo utilizada em importantes determinações, como por exemplo a descrição

da fixação de nitrogênio predominantemente realizada por Archaeas em solos (LEININGER et al., 2006).

1.1.4 Fatores que influenciam na composição das comunidades bacterianas

As comunidades bacterianas são em sua maioria bastante complexas e sensíveis a alterações ambientais. Considerando as associações entre bactérias e plantas, estas podem ser sensíveis a alterações bióticas ou abióticas (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990). As interações estabelecidas entre as diversas espécies bacterianas e as plantas determinam a composição das comunidades bacterianas, que são sensíveis dentre outros fatores, à alterações nos genótipos da planta (HEUER et al., 2002; DUNFIELD; GERMIDA, 2004), do microrganismo (ANDREOTE et al., 2004) ou da presença de patógeno como *X. fastidiosa* (ARAUJO et al., 2002) (Tabela 1.1).

1.1.4.1 Impacto de plantas transgênicas sobre comunidades microbianas

As comunidades bacterianas associadas às plantas podem interagir aumentando o crescimento, controlando patógenos ou melhorando seu desempenho da planta hospedeira em condições adversas (SCHIPPERS; BAKKER; BAKKER, 1987; HALLMANN et al., 1997) e influenciando o crescimento vegetal de plantas cultivadas posteriormente na mesma área (BEVER; WESTOVER; ANTONOVICS, 1997).

O genótipo da planta afeta diretamente a associação de bactérias à rizosfera, principalmente por alterações nos exudados de raiz liberados e disponibilizados para os grupos bacterianos (KOZDROJ; VAN ELSAS, 2000). O principal exemplo do papel do genótipo da planta atuando sobre a interação com bactérias é o estudo da interação de rizóbios com leguminosas, onde a seleção ocorre qualitativa e quantitativamente em relação ao genótipo das plantas e das linhagens de rizóbios avaliadas (SMITH; GOODMAN, 1999).

Tabela 1.1 - Estudos demonstrando os fatores que afetam a composição de comunidades bacterianas

Fator avaliado	Populações avaliadas e afetadas	Referência
Tipo de solo	Comunidade bacteriana	(OVREAS; TORSVIK, 1998)
Tempo de cultivo	Comunidade endofítica	(MOCALI et al., 2003)
Uso do solo	<i>Burkholderia</i> spp.	(SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004)
	Comunidade da rizosfera, população capaz de oxidar amônio	(ALVEY et al., 2003)
	Comunidade do solo	(FENG et al., 2003)
Espécie de planta	<i>Burkholdeira</i> spp.	(SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004)
	<i>Pseudomonas</i> spp.	(COSTA et al., 2006)
	Actinomicetos	(SHIROKIKH et al., 2006)
Genótipo da planta	Comunidade bacteriana endofítica	(KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004)
Transgenia da planta hospedeira	Comunidade rizosférica	(CASTALDINI et al., 2005; FANG et al., 2005)
	Comunidade bacteriana do solo	(DEVARE; JONES; THIES, 2004)
	Comunidade bacteriana do solo e associada à planta	(LOTTMANN et al., 1999; DUNFIELD; GERMIDA, 2004; RASCHE et al., 2006a; RASCHE et al., 2006b)
	Comunidade total, α e β -proteobactérias e actinomicetos	(HEUER; SMALLA, 1999; HEUER et al., 2002)
Inoculação de bactérias	<i>Pantoea agglomerans</i>	(ANDREOTE et al., 2004)
	α e β -proteobactérias	(ANDREOTE et al., 2006)
	Comunidade bacteriana da rizosfera	(WANG et al., 2007)

No entanto, poucos estudos foram realizados para se avaliar o efeito de plantas geneticamente modificadas sobre a comunidade microbiana associada. Acredita-se que o cultivo destas plantas possa gerar mudanças na atividade microbiana devido às diferenças na quantidade e composição dos exsudados liberados pelas raízes ou devido às alterações de práticas de cultivo para estas plantas culturas transgênicas (MOTAVALLI et al., 2004).

Considerando alterações nas comunidades bacterianas devido ao cultivo de plantas transgênicas, foi observado que plantas de batata geneticamente modificadas, expressando o gene *gbss* (*granule bound starch synthase gene*), o qual é responsável por um dos passos da síntese de amido, apresentam uma diferente população de bactérias do gênero *Pseudomonas* na rizosfera (MILLING et al., 2004). A comunidade bacteriana da filosfera de plantas de batata alteradas geneticamente com a introdução do gene da síntese de lisozima foi também avaliada (HEUER; SMALLA, 1999). Esta enzima atua sobre as bactérias, tornando as plantas transgênicas mais resistentes aos patógenos bacterianos. Os autores observaram um aumento da colonização destas plantas por bactérias do grupo de *Erwinia* e redução na colonização de *Agrobacterium* e de bactérias gram-positivas. Os efeitos do cultivo de morangueiros transgênicos expressando um gene de quitinase de arroz sobre outras plantas e sobre a microbiota do solo foram avaliados (ASAO; ARAI; NISHIZAWA, 2003). De acordo com os resultados obtidos não houve diferença entre as plantas transgênicas e as não-transgênicas. O efeito do transgene sobre a comunidade bacteriana é muitas vezes difícil de ser isolado, o que dificulta a análise de seu impacto. Para isso a manutenção das condições ambientais de forma rigorosa auxiliaria no estudo isolado do efeito do transgene sobre a comunidade bacteriana. A população fúngica de solo de plantas de algodão, alteradas geneticamente expressando a endotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, apresentou um aumento transiente em sua contagem total em relação à linhagem convencional (DONEGAN et al., 1995). Em outros estudos, porém, não foram observados efeitos na atividade da comunidade microbiana de plantas transgênicas quando comparadas às plantas convencionais. A comunidade bacteriana de plantas de milho geneticamente modificadas, expressando o gene para a endotoxina (gene *cry3Bb*), não apresentou alterações significativas em relação à variedade isogênica não-transgênica (DEVARE; JONES; THIES, 2004).

Alguns trabalhos já têm sido realizados buscando avaliar a persistência dos efeitos do cultivo destas plantas em comunidade microbianas. Em estudo com dois anos de cultivo de canola geneticamente modificada, foram analisadas diferentes amostras da rizosfera de plantas

transgênicas e não transgênicas, abrangendo todo o ciclo de desenvolvimento da planta os resultados mostraram que houve variação na comunidade microbiana em função tanto da variedade de canola (transgênica e não transgênica) como da época de desenvolvimento. Porém essa variação foi temporária, pois quando as comunidades microbianas foram mensuradas após o inverno não foi observada diferença entre as comunidades microbianas de solos onde foi feita a colheita e em solos não cultivados (DUNFIELD; GERMIDA, 2004). Esse efeito temporário também foi observado no estudo com batata geneticamente modificada (GRIFFITHS; GEOGHEGAN; ROBERTSON, 2000).

1.1.4.2 Inoculação de bactérias na composição das comunidades associadas às plantas

As comunidades bacterianas associadas às plantas são compostas de grande número de espécies (ARAÚJO et al., 2001; CHELIUS; TRIPLETT, 2001; LAMBAIS et al., 2006). Estes grupos bacterianos estão em associação e equilíbrio compondo estas comunidades. Desta maneira, a inoculação de bactérias interfere direta e indiretamente neste ambiente, levando a alterações na composição destas comunidades (ANDREOTE et al., 2004; ANDREOTE et al., 2006).

O efeito da inoculação de bactérias na composição das comunidades bacterianas associadas à raiz de *C. roseus* foi previamente estudada (ANDREOTE et al., 2006), mostrando que a inoculação de *M. mesophilicum* causa alterações na comunidade bacteriana endofítica da raiz e do caule, verificadas por meio da alteração nos perfis de PCR-DGGE para os grupos das α e β -proteobactérias. A inoculação de isolados solubilizadores de fosfato em plantas de milho e soja resultam no aumento da comunidade microbiana, além de causar alterações nos perfis de PCR-DGGE das comunidades avaliadas (WANG et al., 2007). No entanto, os autores descrevem as espécies de plantas cultivadas como principais fatores determinantes da composição das comunidades microbianas, quando comparadas à inoculação de bactérias.

Algumas espécies bacterianas envolvidas no controle de pragas e fitopatógenos também apresentam efeitos sobre outras bactérias componentes das comunidades bacterianas associadas às plantas. Em plantas de morangueiro, a inoculação de *Serratia plymuthica* e *Streptomyces* sp. leva não apenas ao controle do patógeno *Verticillium dahliae* mas também à alterações na composição da comunidade bacteriana da rizosfera das plantas (SCHERWINSKI; WOLF;

BERG, 2007). De maneira similar, em um experimento mais longo, o efeito da inoculação de *Pseudomonas putida* WCS358r na composição das comunidades bacterianas e fúngicas da rizosfera foi avaliada (VIEBAHN et al., 2005). Apenas quando duas linhagens transgênicas desta espécie, produzindo de maneira constitutiva os agentes antimicrobianos ácido fenazínico-1-carboxílico (PCA) e diacetilfluoroglucinol (DAPG), foram aplicadas de maneira conjunta, o efeito foi observado sobre a composição da comunidade fúngica do ambiente, sendo verificada alteração na população de fungos do grupo dos ascomicetos associados às plantas (VIEBAHN et al., 2005). Como apresentado, os efeitos da inoculação de bactérias na composição de comunidades bacterianas são observados quando bactérias que apresentam características de interesse são inoculadas (ANDREOTE et al., 2006; SCHERWINSKI; WOLF; BERG, 2007), bem como quando bactérias geneticamente modificadas são utilizadas para inoculação das plantas (ANDREOTE et al., 2004; CASES; DE LORENZO, 2005; VIEBAHN et al., 2005).

1.1.5 Interações planta-bactéria

Uma grande diversidade de bactérias interage com as plantas, compondo desta maneira as comunidades conhecidamente importantes na rizosfera, no rizoplane, além das comunidades endofíticas e epifíticas, que podem atuar auxiliando o desenvolvimento vegetal, controlando patógenos ou protegendo as plantas em condições adversas (HALLMANN et al., 1997).

A interação entre plantas e bactérias é coordenada por rotas metabólicas presentes tanto na planta, como nas bactérias, onde um reconhecimento mútuo ocorre viabilizando o estabelecimento da interação. No entanto, a resposta metabólica das plantas à presença destas bactérias ainda é pouco estudada, sendo estes mecanismos ainda desconhecidos.

Alguns estudos utilizam as técnicas globais de avaliação de resposta para inferir sobre os mecanismos que regem as interações entre plantas e bactérias. Os perfis transcricionômicos das interações bactéria-planta têm sido explorados (VERHAGEN et al., 2004; WANG et al., 2005; BARNETT; FISHER, 2006). Bibliotecas de ESTs de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias endofíticas foram avaliadas para determinar o efeito da presença de *Glucanacetobacter* e *Herbaspirillum* nestas plantas (NOGUEIRA et al., 2001).

Utilizando a técnica de microarranjos de DNA, a alteração na expressão gênica de *Arabidopsis thaliana* foi avaliada, induzida pela inoculação de bactéria indutora de resistência

sistêmica (VERHAGEN et al., 2004), ou pela colonização da bactéria endofítica *Pseudomonas* sp. (WANG et al., 2005). Os autores verificaram, em ambos estudos, que um número de genes menor de 1% do total são afetados pela inoculação destas bactérias. No entanto, apesar de um pequeno número de genes serem modulados em plantas de *A. thaliana* pela inoculação de *P. fluorescens*, estas plantas apresentaram uma mais rápida resposta de defesa à posterior inoculação com o fitopatógeno *P. syringae* pv. *tomato* (VERHAGEN et al., 2004).

1.1.5.1 A técnica de metabolômica no estudo da resposta de plantas

As plantas apresentam a capacidade de responder ao estímulo externo, seja ele genético ou ambiental, biótico ou abiótico, alterando sua expressão gênica, e consequentemente seu perfil protéico e enzimático, o que altera qualitativa e quantitativamente o perfil metabólico no interior da célula. Os metabólitos são os produtos dos sistemas regulatórios celulares e o metaboloma é o conjunto de metabólitos presentes na célula vegetal em determinado momento do ciclo vital. A metabolômica é a análise compreensiva de todo o conjunto de metabólitos, que auxilia o entendimento de complexas interações moleculares em sistemas biológicos (FIEHN, 2002).

O estudo dos metabólitos presentes nas células vegetais em um determinado momento representa o conjunto de mecanismos ativados e desativados da célula com determinado genótipo em determinado ambiente. Existem vários estudos que demonstram a resposta metabólica de plantas a estímulos ambientais, principalmente em *A. thaliana* respondendo ao estresse salino (KIM et al., 2007) ou de temperatura (KAPLAN et al., 2004), além da resposta à presença de césio (LE LAY et al., 2006). Estudos que mostram alterações metabólicas devido a expressão de genes exógenos em plantas também são relatados em *A. thaliana* (TOHGE et al., 2005) e *N. tabacum* (MUNGUR et al., 2005).

Desta maneira, a técnica de metabolômica é uma atrativa alternativa para estudos de resposta da planta a modificações genéticas e ambientais. Dentre os possíveis estudos, a interação entre bactérias associadas à planta hospedeira é um campo ainda inexplorado. No entanto, como estudos mostram a dificuldade de se identificar genes ativados ou desativados devido a colonização de plantas por bactérias, pode-se sugerir que esta regulação ocorra no nível pós-transcricional, como resultado da alteração de atividade protéica e enzimática, e desta forma a

resposta da planta pode ocorrer na forma de acúmulo ou diminuição na concentração de metabólitos na célula vegetal estimulada pela presença do microrganismo.

Referências

- ABBY, S.; DAUBIN, V. Comparative genomics and the evolution of prokaryotes. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 15, p. 135-141, 2007.
- ADHIKARI, T.B.; JOSEPH, C.M.; YANG, G.P.; PHILLIPS, D.A.; NELSON, L.M. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 916-924, 2001.
- ALVEY, S.; YANG, C.H.; BUERKERT, A.; CROWLEY, D.E. Cereal/legume rotation effects on rhizosphere bacterial community structure in West African soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 37, p. 73-82, 2003.
- AN, D.D.; DANHORN, T.; FUQUA, C.; PARSEK, M.R. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 3828-3833, 2006.
- ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, p. 169-173, 2004.
- ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAUJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.
- ARAUJO, W.L.; MACCHERONI, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.
- ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4906-4914, 2002.
- ASAO, H.; ARAI, S.; NISHIZAWA, Y. Environmental risk evaluation of transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. **Seibutsu-Kogaku Kaishi**, Osaka, v. 81, p. 57-63, 2003.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, 2000.
- BARNETT, M.J.; FISHER, R.F. Global gene expression in the rhizobial-legume symbiosis. **Symbiosis**, Tel Aviv, v. 42, p. 1-24, 2006.
- BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 1183-1192, 2003.

BEVER, J.D.; WESTOVER, K.M.; ANTONOVICS, J. Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback approach. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 85, p. 561-573, 1997.

BOUCHER, Y.; NESBO, C.L.; DOOLITTLE, W.F. Microbial genomes: dealing with diversity. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 4, p. 285-289, 2001.

BRUNS, A.; CYPIONKA, H.; OVERMANN, J. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3978-3987, 2002.

BRUNS, A.; NUBEL, U.; CYPIONKA, H.; OVERMANN, J. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1980-1989, 2003.

BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection**, Berlin, v. 105, p. 329-348, 1998.

CASES, I.; DE LORENZO, V. Genetically modified organisms for the environment: stories of success and failure and what we have learned from them. **International Microbiology**, Amsterdam, v. 8, p. 213-222, 2005.

CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C. *et al.* Impact of Bt corn on rhizospheric and on beneficial mycorrhizal symbiosis and soil eubacterial communities in experimental microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 6719-6729, 2005.

CHANPRAME, S.; TODD, J.J.; WIDHOLM, J.M. Prevention of pink-pigmented methylotrophic bacteria (*Methylobacterium mesophilicum*) contamination of plant tissue cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 222-225, 1996.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, p. 252-263, 2001.

CHENEY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J.C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 121-128, 2000.

COSTA, R.; SALLES, J.F.; BERG, G.; SMALLA, K. Cultivation-independent analysis of *Pseudomonas* species in soil and in the rhizosphere of field-grown *Verticillium dahliae* host plants. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 2136-2149, 2006.

DA SILVA, K.R.A.; SALLES, J.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 54, p. 213-231, 2003.

DE BOER, W.; KOWALCHUK, G.A.; VAN VEEN, J.A. 'Root-food' and the rhizosphere microbial community composition. **New Phytologist**, London, v. 170, p. 3-6, 2006.

DEIGLMAYR, K.; PHILIPPOT, L.; TSCHERKO, D.; KANDELER, E. Microbial succession of nitrate-reducing bacteria in the rhizosphere of *Poa alpina* across a glacier foreland in the Central Alps. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 1600-1612, 2006.

DEVARE, M.H.; JONES, C.M.; THIES, J.E. Effect of Cry3Bb transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community: Biomass, activity, and diversity. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 837-843, 2004.

DONEGAN, K.K.; PALM, C.J.; FIELAND, V.J.; PORTEOUS, L.A.; GANIO, L.M.; SCHALLER, D.L.; BUCAO, L.Q.; SEIDLER, R.J. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus-thuringiensis* Var *Kurstaki* Endotoxin. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 2, p. 111-124, 1995.

DUNFIELD, K.E.; GERMIDA, J.J. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 806-815, 2004.

EILERS, H.; PERNTHALER, J.; GLOCKNER, F.O.; AMANN, R. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3044-3051, 2000.

FANG, M.; KREMER, R.J.; MOTAVALLI, P.P.; DAVIS, G. Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 4132-4136, 2005.

FELSKE, A.; WOLTERINK, A.; VAN LIS, R.; DE VOS, W.M.; AKKERMANS, A.D.L. Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 30, p. 137-145, 1999.

FENG, Y.; MOTTA, A.C.; REEVES, D.W.; BURMESTER, C.H.; VAN SANTEN, E.; OSBORNE, J.A. Soil microbial communities under conventional-till and no-till continuous cotton systems. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 1693-1703, 2003.

FIEHN, O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 48, p. 155-171, 2002.

FREY-KLETT, P.; CHAVATTE, M.; CLAUSSE, M.L.; COURRIER, S.; LE ROUX, C.; RAAIJMAKERS, J.; MARTINOTTI, M.G.; PIERRAT, J.C.; GARBAYE, J. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. **New Phytologist**, London, v. 165, p. 317-328, 2005.

GARBEVA, P.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN VUURDE, J.W.L.; VAN ELSAS, J.D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, p. 369-383, 2001.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 47, p. 51-64, 2004.

GERMIDA, J.J.; SICILIANO, S.D.; SEIB, A.M. Phenotypic plasticity of *Pseudomonas aureofaciens* (*lacZY*) introduced into and recovered from field and laboratory microcosm soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 27, p. 133-139, 1998.

GOMES, N.C.M.; HEUER, H.; SCHONFELD, J.; COSTA, R.; MENDONCA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, The Hague, v. 232, p. 167-180, 2001.

GOURION, B.; ROSSIGNOL, M.; VORHOLT, J.A. A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 13186-13191, 2006.

GRIFFITHS, B.S.; GEOGHEGAN, I.E.; ROBERTSON, W.M. Testing genetically engineered potato, producing the lectins GNA and Con A, on non-target soil organisms and processes. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 37, p. 159-170, 2000.

HALLMANN, J.; QUADTHALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HAMAKI, T.; SUZUKI, M.; FUDOU, R.; JOJIMA, Y.; KAJIURA, T.; TABUCHI, A.; SEM, K.; SHIBAI, H. Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 99, p. 485-492, 2005.

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, p. 1-21, 1998.

HENCKEL, T.; FRIEDRICH, M.; CONRAD, R. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1980-1990, 1999.

HEUER, H.; KROPPESTEDT, R.M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere relative to communities are negligible natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1325-1335, 2002.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HEUER, H.; SMALLA, K. Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing transgenic variants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 357-371, 1999.

JANSSEN, P.H.; YATES, P.S.; GRINTON, B.E.; TAYLOR, P.M.; SAIT, M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2391-2396, 2002.

KAPLAN, F.; KOPKA, J.; HASKELL, D.W.; ZHAO, W.; SCHILLER, K.C.; GATZKE, N.; SUNG, D. Y.; GUY, C. L. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 136, p. 4159-4168, 2004.

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

KAVINO, M.; HARISH, S.; KUMAR, N.; SARAVANAKUMAR, D.; DAMODARAN, T.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; SAMIYAPPAN, R. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1087-1098, 2007.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Les Ulis, v. 27, p. 29-43, 2007.

KIM, J.K.; BAMBA, T.; HARADA, K.; FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 415-424, 2007.

KONSTANTINIDIS, K.T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J.M. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 7286-7293, 2006.

KOZDROJ, J.; VAN ELSAS, J.D. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1405-1417, 2000.

KUKLINSKY-SOBRAL, 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**, Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

LACAVA, P.T.; ARAUJO, 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**, Oxford, v. 39, p. 55-59, 2004.

LACAVA, P.T.; LI, W.B.; ARAUJO, W.L.; AZEVEDO, J.L.; HARTUNG, J.S. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 535-541, 2006.

LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BULL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**, Washington, v. 312, p. 1917-1917, 2006.

LE LAY, P.; ISAURE, M.P.; SARRY, J.E.; KUHN, L.; FAYARD, B.; LE BAIL, J.L.; BASTIEN, O.; GARIN, J.; ROBY, C.; BOURGUIGNON, J. Metabolomic, proteomic and biophysical analyses of *Arabidopsis thaliana* cells exposed to a cesium stress. **Biochimie**, Paris, v. 88, p. 1533-1547, 2006.

LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I.; SCHUSTER, S.C.; SCHLEPER, C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, London, v. 442, p. 806-809, 2006.

LIU, X.G.; BIMEREW, M.; MA, Y.X.; MUELLER, H.; OVADIS, M.; EBERL, L.; BERG, G.; CHERNIN, L. *Quorum sensing* signaling is required for production of the antibiotic pyrrolnitrin in a rhizospheric biocontrol strain of *Serratia plymuthica*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 270, p. 299-305, 2007.

LOTTMANN, J.; HEUER, H.; SMALLA, K.; BERG, G. Influence of transgenic T4-lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant-associated bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 365-377, 1999.

LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SESHADRI, S.; CHUNG, H. Y.; YANG, J.C.; SUNDARAM, S.; SA, T.M. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Nankang, v. 45, p. 315-324, 2004.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S.P.; SA, T.M. A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 57, p. 168-176, 2006a.

MADHAIYAN, M.; REDDY, B.V.S.; ANANDHAM, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S.P.; SA, T.M. Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. **Current Microbiology**, New York, v. 53, p. 270-276, 2006b.

MILLING, A.; SMALLA, K.; MAIDL, F.X.; SCHLOTTER, M.; MUNCH, J.C. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. **Plant and Soil**, The Hague, v. 266, p. 23-39, 2004.

MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p. 808-811, 1990.

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

MOTAVALLI, P.P.; KREMER, R.J.; FANG, M.; MEANS, N.E. Impact of genetically modified crops and their management on soil microbially mediated plant nutrient transformations. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 816-824, 2004.

MUNGUR, R.; GLASS, A.D.M.; GOODENOW, D.B.; LIGHTFOOT, D.A. Metabolite fingerprinting in transgenic *Nicotiana tabacum* altered by the *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase gene. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Akron, v. p. 198-214, 2005.

MUYZER, G.; DEWAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16s Ribosomal RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek - International Journal of General and Molecular Microbiology**, Wageningen, v. 73, p. 127-141, 1998.

NOGUEIRA, E.D.; VINAGRE, F.; MASUDA, H.P. *et al.* Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 199-206, 2001.

O'BRIEN, H.E.; PARRENT, J.L.; JACKSON, J.A.; MONCALVO, J.M.; VILGALYS, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 5544-5550, 2005.

OLIVEIRA, A.C.; VALLIM, M.A.; SEMIGHINI, C.P.; ARAUJO, W.L.; GOLDMAN, G.H.; MACHADO, M.A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p. 1048-1054, 2002.

OVREAS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, p. 303-315, 1998.

PAN, M.J.; RADEMAN, S.; KUNERT, K.; HASTINGS, J.W. Ultrastructural studies on the colonization of banana tissue and *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4 by the endophytic bacterium *Burkholderia cepacia*. **Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift**, Berlim, v. 145, p. 479-486, 1997.

PEIXOTO, R.S.; COUTINHO, H.L.D.; RUMJANEK, N.G.; MACRAE, A.; ROSADO, A.S. Use of *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, p. 316-320, 2002.

PIERSON, L.S. Expanding the club: engineering plants to talk to bacteria. **Trends in Plant Science**, Kidlington v. 5, p. 89-91, 2000.

PIRTTILA, A.M.; LAUKKANEN, H.; POSPIECH, H.; MYLLYLA, R.; HOHTOLA, A. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3073-3077, 2000.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P. *et al.* Essay - The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 384-392, 2007.

QUADTHALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: Mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 577-582, 1997.

QUADTHALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: Location and interaction with other plant associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 254-259, 1997.

QUADTHALLMANN, A.; KLOEPPER, J.W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 1144-1154, 1996.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 151, p. 167-177, 2000.

RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M.H.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, p. 219-235, 2006a.

RASCHE, F.; VELVIS, H.; ZACHOW, C.; BERG, G.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 43, p. 555-566, 2006b.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, p. 29-+, 1998.

RODRIGUEZ-VALERA, F. Environmental genomics, the big picture? **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 231, p. 153-158, 2004.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 2770-2779, 1998.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, p. 827-837, 2006.

RUPPEL, S.; RUHLMANN, J.; MERBACH, W. Quantification and localization of bacteria in plant tissues using quantitative real-time PCR and online emission fingerprinting. **Plant and Soil**, The Hague, v. 286, p. 21-35, 2006.

SALLES, J.F.; DE SOUZA, F.A.; VAN ELSAS, J.D. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1595-1603, 2002.

SALLES, J.F.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: Effect of crop and land use history. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 4012-4020, 2004.

SCHERWINSKI, K.; WOLF, A.; BERG, G. Assessing the risk of biological control agents on the indigenous microbial communities: *Serratia plymuthica* HRO-C48 and *Streptomyces* sp HRO-71 as model bacteria. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 52, p. 87-112, 2007.

SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, Palo alto, v. 25, p. 339-358, 1987.

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

SHARMA, V.K.; NOWAK, J. 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). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 528-536, 1998.

SHIROKIKH, I.G.; ZENOVA, G.M.; MERSAEVA, O.V.; LAPIGINA, E.V.; LYSAK, L.V. Abundance and structure of actinomycete complexes in the rhizosphere of winter rye, oats, and red clover. **Biology Bulletin**, Lancaster, v. 33, p. 404-408, 2006.

SMITH, K.P.; GOODMAN, R.M. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 473-491, 1999.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 12115-12120, 2006.

STEENWERTH, K.L.; JACKSON, L.E.; CALDERON, F.J.; STROMBERG, M.R.; SCOW, K.M. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 1599-1611, 2002.

STEVENSON, B.S.; EICHORST, S.A.; WERTZ, J.T.; SCHMIDT, T.M.; BREZNAK, J.A. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 4748-4755, 2004.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 162-167, 1998.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, p. 1-30, 2000.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P. *et al.* Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 183, p. 214-220, 2001.

TOHGE, T.; NISHIYAMA, Y.; HIRAI, M.Y. *et al.* Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. **Plant Journal**, Oxford, v. 42, p. 218-235, 2005.

TYSON, G.W.; BANFIELD, J.F. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, p. 411-415, 2005.

VERHAGEN, B.W.M.; GLAZEBROOK, J.; ZHU, T.; CHANG, H.S.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, p. 895-908, 2004.

VIEBAHN, M.; DOORNBOS, R.; WERNARS, K.; VAN LOON, L.C.; SMIT, E.; BAKKER, P. Ascomycete communities in the rhizosphere of field-grown wheat are not affected by introductions of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 1775-1785, 2005.

WANG, G.H.; JIN, J.; XU, M.N.; PAN, X.W.; TANG, C. Inoculation with phosphate-solubilizing fungi diversifies the bacterial community in rhizospheres of maize and soybean. **Pedosphere**, Nanjing, v. 17, p. 191-199, 2007.

WANG, Y.Q.; OHARA, Y.; NAKAYASHIKI, H.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, p. 385-396, 2005.

WIDMER, F.; SEIDLER, R.J.; GILLEVET, P.M.; WATRUD, L.S.; DI GIOVANNI, G.D. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 2545-2553, 1998.

WOESE, C.R. There must be a prokaryote somewhere - Microbiology search for itself. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 58, p. 1-9, 1994.

2 EFEITOS DO CULTIVO DE TABACO TRANSGÊNICO NA DIVERSIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA

Resumo

A rizosfera é um nicho ecológico complexo, que pode ser explorado por uma grande diversidade de microrganismos. Fatores bióticos e abióticos interferem na interação entre plantas e bactérias, incluindo a expressão de genes heterólogos pela planta hospedeira. Em experimento realizado em casa-de-vegetação, as comunidades bacterianas da rizosfera de três plantas transgênicas foram comparadas com planta não transgênica, em estágios vegetativos e de florescimento (um e três meses de cultivo, respectivamente). A comunidade cultivável foi acessada por meio do isolamento de diferentes grupos morfológicos, que foram posteriormente caracterizados pela técnica de ARDRA seguido de sequenciamento parcial do gene 16S RNAr. Os resultados revelaram uma maior comunidade bacteriana associada às plantas na segunda amostragem. Utilizando a técnica de DGGE, diferenças entre as comunidades bacterianas totais (cultiváveis e não cultiváveis) foram detectadas durante a fase inicial do desenvolvimento das plantas (fase vegetativa), no entanto estas diferenças diminuíram nas análises utilizando plantas em estágio de florescimento. Os efeitos observados foram menores em amostras de solo rizosférico quando comparados às amostras de rizoplano. A Análise Canônica de Correspondência (CCA) mostrou a interação entre os fatores ambientais e os perfis de DGGE obtidos, confirmando o estágio de desenvolvimento como principal fator determinante da estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera. Os dados mostram que mesmo que alterações na comunidade bacteriana ocorram devido ao cultivo de plantas transgênicas, estes efeitos são temporários, sendo posteriormente anulados devido à resiliência do solo.

Palavras-chave: Efeito de OGM, Interação planta-bactéria, DGGE, CCA

EFFECTS OF TRANSGENIC TOBACCO CULTIVATION ON THE BACTERIAL DIVERSITY FROM RHIZOSPHERE

Abstract

Rhizosphere is a complex niche exploited by a wide diversity of microorganisms. Biotic and abiotic factors may interfere in the interaction between plants and bacteria, including the expression of heterologous genes in the host plant. In a greenhouse experiment, the bacterial communities from rhizosphere of transgenic plants were compared to those associated to wild type plants, in the vegetative and flowering stages of plant development (one and three months of cultivation, respectively). The culturable community was assessed by isolation of different morphological groups further characterized by ARDRA followed by partial sequencing of 16S rRNA gene. Results revealed a more dense community associated to plants in the second sampling. Using DGGE technique, differences amongst total bacterial communities (culturable and unculturable) were detected in the initial period of plant development (vegetative stage), however these differences decreased in analysis using flowering plants. Observed effects were lower in samples from rhizosphere soil when compared to rhizoplane samples. The canonical correspondence analysis (CCA) demonstrated the interaction of environmental factors with the DGGE profiles, confirming the plant stage as the main factor determining the structure of bacterial communities in the rhizosphere. Data revealed that, even when shifts in bacterial communities occur due to the cultivation of transgenic plants, the effects are temporary, and further resolved by soil resilience.

Key-words: GMO effects, Plant-bacteria interaction, DGGE, CCA

2.1 Introdução

*“Obstáculos são os problemas que enxergamos
quando tiramos os olhos de nosso objetivo.”*

Henry Ford

O termo rizosfera é definido como a região do solo influenciada pelas raízes. No entanto, é possível dividir a rizosfera em partes, como por exemplo, o solo rizosférico representado pelo solo aderido as raízes, e o rizoplane, formado pela superfície das raízes. Os limites físicos que separam tais comunidades são difíceis de serem determinados, porém, este nicho ecológico é um dos mais importantes pontos de ocorrência da interação entre plantas e bactérias, uma vez que neste local é onde existe a maior densidade bacteriana em contato com as plantas. Estas bactérias obtêm neste ambiente os nutrientes essenciais para o desenvolvimento e multiplicação, e por outro lado, atuam também em benefício da planta, seja por meio do fornecimento de nutrientes, ou na inibição de organismos patogênicos.

Devido a esta íntima interação entre plantas e bactérias, estas simbioses são muito sensíveis a alterações ambientais, as quais podem ser bióticas ou abióticas, dentre as quais pode ser citada a presença de novos microrganismos (ANDREOTE et al., 2004; ANDREOTE et al., 2006) ou a alteração da planta cultivada (SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004), que resultam em efeito direto na composição da comunidade bacteriana. Estas alterações são causadas principalmente devido à alterações na disponibilidade de nutrientes no ambiente rizosférico. Um outro fator que pode interferir diretamente na composição da comunidade bacteriana é a expressão de genes heterólogos na planta hospedeira. Desta maneira, o cultivo de plantas transgênicas deve ser considerado como um potencial fator determinante da estrutura da comunidade bacteriana associada à planta (HEUER; SMALLA, 1999; LOTTMANN et al., 1999; GYAMFI et al., 2002).

Vários trabalhos descrevem os efeitos de plantas transgênicas na composição da comunidade bacteriana. Plantas de batata expressando o gene da lisozima mostraram ter um aumento na densidade populacional de *Erwinia* spp. e uma diminuição na densidade populacional de *Agrobacterium* spp. (HEUER; SMALLA, 1997). Porém, depois de utilizar técnicas independentes de cultivo, os mesmos autores descrevem fatores ambientais, como por exemplo, a época do ano, como principais fatores determinantes da comunidade bacteriana, ao invés da

transgenese (HEUER et al., 2002). Da mesma forma, em estudo sobre as comunidades bacterianas da rizosfera de *Brassica napus* selvagem e transgênica, foi observado que diferentes cultivares apresentam maiores diferenças em relação à estrutura da comunidade bacteriana do que quando são comparados aos cultivares transgênicos e a sua isolinha (DUNFIELD; GERMIDA, 2004).

O efeito do cultivo de plantas transgênicas em bactérias associadas às plantas deve ser observado de duas maneiras distintas, de acordo com o tipo de organismo transgênico em questão. Primeiramente, pode-se esperar um efeito direto do produto do gene exógeno sobre a comunidade bacteriana, nos casos onde as plantas produzem compostos antimicrobianos, como por exemplo lisozima. A segunda alternativa a ser considerada diz respeito a possíveis efeitos indiretos, devido a alterações no metabolismo da planta, por exemplo, transgênicos resistentes a herbicidas, o que leva a alteração fisiológica da planta, acarretando em mudança no perfil de exsudados de raiz. No entanto, em ambos os casos os efeitos sobre comunidades bacterianas, sejam eles diretos ou não, devem ser avaliados.

A análise multivariada é uma ferramenta de grande importância no estudo e comparação de comunidades microbianas, onde diferentes fatores atuam determinando sua composição. A primeira aplicação da análise multivariada em estudos de comunidades bacterianas foi realizada em comunidades bacterianas do solo (STEENWERTH et al., 2002). Posteriormente, utilizaram esta ferramenta no estudo de alterações na comunidade bacteriana de *Burkholderia* spp. foram verificadas alterações causadas por diferentes manejos agrícolas do solo (SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004). A principal vantagem da análise multivariada é a avaliação conjunta de vários fatores envolvidos na determinação da composição das comunidades bacterianas de forma conjunta.

Dessa forma, este capítulo tem como objetivo acessar alterações na comunidade bacteriana da rizosfera de plantas de tabaco durante o seu cultivo. Desta maneira, tanto o genótipo das plantas (transgênicas ou não) como os estágios de desenvolvimento das plantas serão avaliados.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Material vegetal

Plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) denominadas CAB1, CAB2 foram comparadas com o parental não transgênico (WT), todas gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos Alberto Labate (ESALQ/USP). Adicionalmente, plantas transplastômicas TRP que foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jan Dirck van Elsas (Groningen Universiteit, Holanda), também utilizadas no presente trabalho. As plantas CAB1 e CAB2 apresentam, fenotipicamente, uma maior taxa fotossintética, e têm suas características descritas detalhadamente na literatura (LABATE et al., 2004). Basicamente, as plantas CAB1 e CAB2 têm como principal diferença o número de cópias do gene exógeno inserido, sendo que plantas CAB1 possuem uma inserção do gene e plantas CAB2 possuem quatro inserções (LABATE et al., 2004). As plantas TRP possuem o gene *nptII*, que confere a resistência à canamicina, inserido no genoma cloroplastidial o que faz com que apresentem um grande número de cópias do gene por célula, sendo estas plantas já previamente utilizadas em estudo sobre transferência horizontal do gene *nptII* para bactérias associadas à planta (KAY et al., 2002).

As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação, em potes contendo aproximadamente 2 kg de uma mistura 1:1 de substrato (PlantMax, Eucatex, São Paulo, Brasil) e vermiculita. Foram utilizadas 10 plantas de cada genótipo, em um experimento fatorial, considerando diferentes genótipos e diferentes tempos de amostragem. Em cada amostragem, três plantas de cada genótipo foram selecionadas para avaliação dos grupos bacterianos componentes das comunidades do solo rizosférico e do rizoplano.

Duas amostragens foram realizadas, após os períodos de cultivo de 30 e 90 dias. Estas avaliações permitiram acessar a comunidade bacteriana presente durante os estágios vegetativo (30 dias) e de florescimento (90 dias) do ciclo vital das plantas de tabaco. Na primeira amostragem as plantas apresentavam apenas folhas (3 pares de folhas), enquanto que na segunda amostragem as plantas apresentavam florescimento. Vale ressaltar que devido as alterações fisiológicas causadas nas plantas devido a inserção de novos genes, as diferentes plantas

apresentaram florescimento em diferentes períodos. Plantas WT floresceram primeiro (80 dias de cultivo), seguidas de plantas TRP (83 dias) e finalmente as plantas CAB (87 dias). No entanto, na segunda amostragem, aos 90 de cultivo, todas as plantas já apresentavam flores.

2.2.1.2 Isolamento da comunidade bacteriana

As amostras foram obtidas após remoção das plantas dos potes para separação do solo rizosférico e do rizoplano. O substrato aderido às raízes foi selecionado para compor amostras de solo rizosférico, enquanto que raízes lavadas em água corrente para remover o solo aderido, deram origem a amostra de rizoplano.

Tanto as amostras de solo rizosférico como as amostras de rizoplano foram submetidas a agitação de 180 rpm por 2 h em tampão fosfato (NaCl 0.8%; KCl 0.02%; Na₂HPO₄ 0,14%; KH₂PO₄ 0,024%). Diluições adequadas das suspensões obtidas foram utilizadas para semeadura em meio de cultura não seletivo TSB (caldo de soja triptonado) 5%, suplementado com ágar (12 g.L⁻¹). Também foi adicionado benomil ao meio de cultura, na concentração de 50 µg.ml⁻¹, com a finalidade de inibir o crescimento de fungos. As culturas foram incubadas a 28°C durante 14 dias. Após este período a contagem do número de colônias obtidas em cada placa foi realizada e colônias foram coletadas para avaliação da diversidade presente nas diferentes plantas. Estas colônias foram repicadas em meio TSB 5%, purificadas e armazenadas em solução glicerol 20% em congelador à -70°C.

2.2.1.3 Caracterização dos isolados por meio da técnica de ARDRA

Os isolados foram previamente separados em três grupos morfológicos distintos, caracterizados como: i) colônias amarelas (Y); ii) colônias brancas (W); iii) colônias similares a actinomicetos (A). A partir da cultura líquida de 148 isolados obtidos das diferentes plantas avaliadas, foi realizada a extração de DNA utilizando o *Wizard DNA extraction kit* (Promega, Madison, USA), seguindo as indicações do fabricante. O DNA extraído foi utilizado para a amplificação do gene 16S ribossomal (16S DNAr) em reação de amplificação com os *primers* R1387 e P027F. As reações foram realizadas em volume de 50 µL, contendo 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X e 1

μL de DNA molde (0,5 a 10 ng). A PCR foi realizada em termociclador (PTC 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C; 1 min a 62,5°C; 1 min a 72°C, e uma extensão final de 7 min a 72°C. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1,0% a 3 V.cm⁻¹, juntamente com o marcador de peso molecular DNA *Ladder* para a observação de um fragmento de aproximadamente 1400 pb. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentado em luz ultra-violeta.

A técnica de ARDRA foi aplicada, digerindo aproximadamente 1 μg do produto de PCR com 2 U da enzima de restrição *MboI* (Pharmacia Biotech, Upsala, Suécia), de acordo com as instruções do fabricante. O produto da digestão foi separado em gel de agarose a 2,0% a 5 V.cm⁻¹, corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentado em luz ultra-violeta.

Os diferentes padrões de clivagem observados entres os isolados deram origem aos haplótipos que foram selecionados para identificação por meio de seqüenciamento parcial do gene 16S DNAr. Os quatro haplótipos mais freqüentes dentro de cada um dos grupos morfológicos obtidos foram indetificados. O produto de PCR gerado com os *primers* R1387 e P027F foram purificados com o *PCR purification PowerClean™ DNA Clean-Up Kit* (MoBio Laboratories, USA) e submetidos ao seqüenciamento. Os fragmentos de DNA foram seqüenciados em seqüenciador automatizado ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Foster City, EUA). As seqüências obtidas foram utilizadas para identificação filogenética dos isolados nos bancos de dados *Ribosomal Data Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/>) e também por meio da análise de *BLASTn* no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2.1.4 Análise por meio da técnica de PCR-DGGE

Na técnica de PCR-DGGE o DNA extraído diretamente da amostra ambiental foi utilizado para amplificação e posterior separação dos *amplicons* em gel com gradiente desnaturante. Desta maneira, o DNA presente em 0,5 g de solo rizosférico e em 0,5 mL da suspensão celular do rizoplano (obtida por centrifugação dos 50 mL de tampão onde as raízes foram agitadas) foram extraídos utilizando o *MoBio UltraClean™ soil DNA kit* (MoBio Laboratories, EUA), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A quantidade e a qualidade do DNA extraído foram verificadas em gel de agarose 1% (w/v).

A amplificação do fragmento do gene 16S DNAr foi realizada diretamente com os *primers* U968-GC e R1387, resultando em um *amplicon* de aproximadamente 430 pb. Os ciclos para amplificação foram: desnaturação inicial de 5 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C, 2 min a 72°C, e uma extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos da PCR foram avaliados em gel de agarose 1,0%.

A análise em DGGE foi realizada no aparelho *phorU2 system* (Ingeny, Goes, Holanda), com gradiente desnaturante variando de 45 a 65% de desnaturação, onde 100% de desnaturação consiste na concentração de 7 M de uréia e 40% de formamida. Os géis foram submetidos a eletroforese por 16 horas a 100 V. Após a eletroforese o gel foi corado com SYBR Green I e fotodocumentado em luz ultra-violeta.

A partir dos padrões obtidos, algumas bandas com ocorrência preferencial nas diferentes plantas avaliadas foram selecionadas para seqüenciamento e identificação. Estas bandas foram recortadas do gel, esmagadas em 10 µL de água deionizada esterilizada e submetidas a nova amplificação com os *primers* U968 e R1387. Os amplicons obtidos foram purificados com *PCR purification PowerClean™ DNA Clean-Up Kit* (MoBio Laboratories, USA) e seqüenciados da maneira previamente descrita para identificação dos isolados.

2.2.1.5 Análise estatística

As análises referentes aos dados de isolamento das comunidades bacterianas foram realizadas utilizando o software SAS (Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute, USA), com a análise de variância aplicada a um experimento fatorial ($P < 0.05$), considerando como fatores o tempo de cultivo e as diferentes plantas utilizadas. As contagens bacterianas foram transformadas por meio do cálculo $\log_{10}X+1$ anteriormente a análise de variância.

Os perfis de DGGE obtidos foram analisados e comparados no programa GelComparII (Applied Maths, Bélgica), no qual os perfis foram alinhados de acordo com um padrão externo, permitindo o alinhamento e a análise conjunta de diferentes géis. As bandas foram identificadas e as áreas referentes a cada banda foram quantificadas de maneira relativa ao total de área da amostra, permitindo a normalização e posterior comparação entre as amostras.

A correlação dos dados ambientais com a ocorrência das bandas e suas intensidades foram determinadas pela Análise Canônica de Correspondência (CCA), realizada no *software* Canoco

(Canoco 4.5, Biometris, Wageningen, Holanda). As bandas observadas nos géis de DGGE foram consideradas como espécies e suas intensidades relativas consideradas como frequência de ocorrência destas espécies. O teste estatístico de permutação de Monte Carlo foi aplicado considerando 499 permutações aleatórias, permitindo avaliar a significância (valor p), dos fatores ambientais na distribuição de espécies das amostras. Como fatores ambientais foram considerados as variáveis estágio de desenvolvimento da planta (vegetativo e florescimento) e genótipos utilizados no experimento (WT, CAB1, CAB2 e TRP). Na CCA também foram obtidos os valores de λ_1 e λ_A , que mostram as porcentagens de variância que podem ser explicadas pelos fatores ambientais, de forma independente ou quando adicionadas às análises de permutação, respectivamente. Na primeira amostragem, a análise de componentes principais (PCA) também foi realizada, identificando a ocorrência preferencial de determinadas espécies (bandas) nas diferentes plantas avaliadas.

2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Isolamento e caracterização da comunidade bacteriana

A quantificação da comunidade bacteriana cultivável total e de três grupos morfológicos (Y, W e A) foi realizada nas diferentes amostras a partir de diferentes genótipos de plantas (Figura 2.1). De maneira geral, o número total de bactérias observado nas amostras de solo rizosférico e de rizoplano não foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre as plantas.

Em relação as diferenças significativas, quando as épocas de cultivo foram comparadas, estas comunidades apresentaram um número total de bactérias significativamente maior na segunda amostragem. Nas amostragens realizadas em solo rizosférico, o valor de $\log 5,00 \text{ UFC.g}^{-1}$ foi obtido após um mês de cultivo, enquanto que na amostragem aos três meses este valor foi de $\log 6,78 \text{ UFC.g}^{-1}$. A mesma tendência foi observada na comunidade do rizoplano, onde os valores observados foram de $\log 6,07$ e $7,52 \text{ UFC.g}^{-1}$ em plantas com 30 e 90 dias de cultivo, respectivamente (Figura 2.1). Após um mês de cultivo, a comunidade bacteriana da rizosfera de plantas TRP foi maior. Entretanto, na segunda amostragem (90 dias), a densidade bacteriana na rizosfera das plantas CAB2 e TRP foi maior do que as de plantas WT e CAB1. Em rizoplano, diferenças foram observadas apenas na primeira amostragem, sendo observado

WT=CAB2>TRP>CAB1. No entanto, na segunda amostragem, não foram observadas diferenças entre as densidades bacterianas no rizoplane das plantas.

Comparando a ocorrência dos grupos morfológicos nas diferentes plantas e épocas de amostragem, algumas diferenças foram observadas. Na rizosfera, após um mês de cultivo, bactérias do grupo morfológico Y ocorreram apenas em plantas TRP. Este mesmo grupo morfológico foi ausente em amostras de rizoplane de plantas CAB1, nas duas épocas de amostragem.

A análise de ARDRA foi realizada de maneira conjunta com os isolados do primeiro e segundo isolamento. Os resultados permitiram dividir os isolados em diferentes haplótipos, caracterizados pelos padrões de clivagem do gene 16S DNAr. No total foram obtidos seis, oito e cinco haplótipos para os grupos W, Y e A, respectivamente. Os quatro haplótipos mais freqüentemente observados em cada grupo morfológico foram identificados por meio do seqüenciamento parcial do gene 16S RNAr de isolados com os respectivos perfis de ARDRA (Figura 2.2). Estes grupos mais frequentes representam os valores de 72, 68 e 63% do número total de isolados avaliados para os grupos Y, W e A, respectivamente.

Figura 2.1 - Isolamento da porção cultivável da comunidade bacteriana da rizosfera e do rizoplane de plantas comuns e transgênicas de tabaco. Densidade da comunidade bacteriana isolada da rizosfera de plantas com um (A) e três (B) meses de cultivo; densidade bacteriana isolada do rizoplane de plantas com um (C) e três (D) meses de cultivo. Os símbolos indicam plantas comuns (WT); CAB1 and CAB2 e plantas TRP. São apresentadas as densidades dos diferentes grupos morfológicos de colônias observados; colônias amarelas (Y), colônias brancas (W) e colônias com morfologia de crescimento de actinomicetos (A). As barras indicam o desvio padrão obtido no experimento realizado com três repetições biológicas por tratamento. As letras indicam a diferença estatística (p<0.05) na densidade da comunidade bacteriana total, observada entre diferentes plantas

A identificação dos isolados de cada um dos perfis de ARDRA obtidos revelou a diversidade bacteriana cultivável presente em cada um dos grupos morfológicos quantificados por meio de isolamento (Tabela 2.1). Os haplótipos obtidos a partir de isolados do grupo Y apresentaram relação filogenética com o grupo das γ -proteobactéria (três dos quatro haplótipos identificados). Estes três isolados revelaram pertencer aos gêneros *Pseudomonas* (haplótipo Y-A), *Rhodanobacter* (haplótipo Y-B) e *Fulvimonas* (haplótipo Y-C). O outro isolado (haplótipo Y-D) foi identificado como pertencente ao gênero *Curtobacterium*.

O grupo W apresentou a maior diversidade, sendo os quatro haplótipos mais frequentes afiliados a diferentes grupos bacterianos. Foram obtidas seqüências pertencentes aos gêneros *Rhizobium* (haplótipo W-A), *Cellulomonas* (haplótipo W-A), *Bacillus* (haplótipo W-C) e *Nocardioides* (haplótipo W-D). Finalmente o grupo A foi constituído por isolados pertencentes aos gêneros *Streptomyces* (haplótipo W-A e W-D), além de seqüências identificadas como *Exiguobacterium* (haplótipo W-B) e *Bacillus* (haplótipo W-C).

Figura 2.2 - Ocorrência dos grupos filogenéticos identificados a partir dos haplótipos de ARDRA observados dentro de cada um dos morfotipos de colônias bacterianas isoladas da rizosfera e do rizoplane de tabaco. Os nomes no eixo x indicam os grupos Y, W e A, que são formados por colônias amarelas, brancas e com característica de actinomicetos, respectivamente

Tabela 2.1 -

Filogenia dos isolados representantes dos quarto haplótipos de ARDRA mais frequentes dentro de cada grupo morfológico isolado de amostras de rizosfera e rizoplane de plantas de tabaco. A classificação foi baseada em análise comparativa da sequência parcial do gene 16S RNAr com os bancos de dados do *Ribosomal Data Project (RDP)* e com análise por *Blastn* no *Genbank*

Grupo morfológico	Haplótipo	Tamanho da Seq. (pb)	Filogenia		
			RDP (nível determinado)	Melhor correspondência no <i>Genbank</i> (similaridade)	Família
Colônias amarelas	Y-A	686	Pseudomonadaceae (família)	<i>P. nitroreducens</i> D84021 (95%)	Pseudomonadaceae
	Y-B	528	Xanthomonadaceae (família)	<i>Rhodanobacter</i> sp. AF494542 (97%)	Xanthomonadaceae
	Y-C	688	Fulvimonas (gênero)	<i>F. soli</i> AJ311653 (100%)	Xanthomonadaceae
	Y-D	687	Curtobacterium (gênero)	<i>C. flaccumfaciens</i> AY167859 (99%)	Microbacteriaceae
Colônias brancas	W-A	697	<i>Rhizobium</i> (gênero)	<i>Rhizobium</i> sp. AF510386 (99%)	Rhizobiaceae
	W-B	687	<i>Cellulomonas</i> (gênero)	<i>C. chitinilytica</i> AB268586 (99%)	Cellulomonadaceae
	W-C	684	<i>Bacillus</i> (gênero)	<i>B. cereus</i> DQ152243 (99%)	Bacillaceae
	W-D	687	<i>Nocardioides</i> (gênero)	<i>N. panaciterrae</i> AB257719 (96%)	Nocardioidaceae
Morfologia de Actinomicetos	A-A	687	<i>Streptomyces</i> (gênero)	<i>S. griseoruber</i> AY999750 (97%)	Streptomycetaceae
	A-B	684	<i>Exiguobacterium</i> (gênero)	<i>Exiguobacterium</i> sp. AY635864 (97%)	Bacillaceae
	A-C	686	<i>Bacillus</i> (gênero)	<i>Bacillus</i> sp. DQ067207 (99%)	Bacillaceae
	A-D	687	<i>Streptomyces</i> (gênero)	<i>S. griseoruber</i> AY999750 (100%)	Streptomycetaceae

Considerando de forma conjunta, a ocorrência de cada um dos haplótipos e suas afiliações filogenéticas, é possível verificar a ocorrência de grupos bacterianos nas diferentes plantas avaliadas (Figura 2.3). De maneira geral, a ocorrência de γ -proteobactéria foi similar em todas as amostras (Figura 2.3A), enquanto que a ocorrência de isolados da ordem Actinomycetales foi maior em plantas CAB2 quando comparadas a plantas TRP (Figure 2.3B). Dentro do grupo A também é possível observar a ausência de isolados com perfis de ARDRA afiliados a *Streptomyces* em plantas WT. Nas demais plantas a ocorrência deste grupo é observada em valores similares aos observados para os demais haplótipos deste grupo (isolados pertencentes à família Bacillaceae) (Figura 2.3C).

Figura 2.3 - Porcentagem dos grupos bacterianos identificados como principais componentes da comunidade bacteriana da rizosfera e do rizoplane de tabaco em plantas convencionais (WT) ou transgênicas (CAB1, CAB2 e TRP). (A) Grupo Y; (B) Grupo W; (C) Grupo A

2.2.2.2 Análise por PCR-DGGE

A técnica de PCR-DGGE permitiu uma análise independente do cultivo da comunidade microbiana em estudo, tendo como limite de detecção, grupos que representam ao menos 1% da comunidade bacteriana total. Neste estudo, os perfis de DGGE revelaram alterações na comunidade bacteriana da rizosfera e do rizoplano das diferentes plantas de tabaco, principalmente nas amostras realizadas com um mês de cultivo da planta. As diferenças observadas foram também mais intensas no rizoplano do que na rizosfera (Figuras 2.4 e 2.5). Na rizosfera, após um mês de cultivo, apenas as plantas TRP apresentaram uma comunidade bacteriana diferente das demais. Considerando as amostras de rizoplano, três distintos grupos são facilmente observados, sendo o primeiro deles formado por amostras de plantas WT, o segundo por amostras de plantas CAB1 e CAB2, e o terceiro contendo as amostras de plantas TRP. A mesma comparação feita utilizando amostras obtidas após três meses de cultivo mostraram diferenças menores, ou seja, os perfis de DGGE foram mais similares entre as diferentes plantas avaliadas.

A análise de correlação canônica (CCA) mostrou a interação da distribuição das espécies (bandas nos perfis de DGGE) com os fatores ambientais determinantes (Figura 2.4D e Figura 2.5D). Nesta análise foi evidente a separação das amostras, no primeiro eixo, em relação ao tempo de cultivo das plantas. Em amostras de um mês de cultivo ocorre a estratificação das amostras em três grupos distintos (WT, CAB e TRP), enquanto que com três meses de cultivo esta divisão das amostras não é facilmente observada. Os valores de λ_1 para a variável tempo de cultivo foram de 0,48 e 0,71 para as análises de rizosfera e rizoplano, respectivamente. Considerando a separação no segundo eixo, é possível observar a tendência descrita para análise única dos perfis de DGGE, com valores menores de λ_1 , variando entre 0,03 e 0,17, para os genótipos de plantas avaliados (Tabela 2.2). Analisando os valores de λ_1 para os fatores distintos, a mesma tendência é observada, sendo os maiores aumentos na explicação da variância gerados pela inclusão do tempo de cultivo nas análises (Tabela 2.2).

Figura 2.4 -

Análise de PCR-DGGE em amostras de rizosfera de plantas convencionais (WT) e transgênicas (CAB1, CAB2 e TRP) de tabaco. Perfis de DGGE das plantas em estado vegetativo (A) e de florescimento (B), onde os marcadores de corrida são representados por M. O perfil obtido também gerou a análise de componentes principais (PCA) na amostra de plantas em estado vegetativo (C) e a análise de correlação canônica (CCA) comparando os diferentes fatores que determinam a composição da comunidade bacteriana (D). Todas as variáveis ambientais utilizadas são apresentadas, porém as indicadas com * foram significantes ($p < 0.05$) utilizando o teste de permutação de Monte Carlo. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos

Figura 2.5 - Análise de PCR-DGGE em amostras de rizoplano de plantas convencionais (WT) e transgênicas (CAB1, CAB2 e TRP) de tabaco. Perfis de DGGE das plantas em estado vegetativo (A) e de florescimento (B), onde os marcadores de corrida são representados por M. O perfil obtido também gerou a análise de PCA na amostra de plantas em estado vegetativo (C) e a análise de CCA comparando os diferentes fatores que determinam a composição da comunidade bacteriana (D). Todas as variáveis ambientais utilizadas são apresentadas, porém as indicadas com * foram significantes ($p < 0.05$) utilizando o teste de permutação de Monte Carlo. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos

Tabela 2.2 - Variância explicada por cada uma das variáveis ambientais nas comunidades de rizosfera e rizoplano. A composição das comunidades foi avaliada por meio de perfis de bandas de DGGE obtidos com amplificação com *primers* para o domínio Bacteria

Variável ambiental	Rizosfera		Rizoplano	
	Lambda-1*	Lambda-A**	Lambda-1	Lambda-A
Estágio de desenvolvimento	0,48	0,48	0,71	0,71
WT	0,05	0,05	0,15	0,15
Transgênico	0,05	0,15	0,15	0,05
TRP	0,08	0,07	0,12	0,12
CAB1	0,04	0,03	0,07	0,05
CAB2	0,03	0,07	0,07	0,04

* Efeitos marginais, demonstrando a explicação da variância pelas diferentes variáveis de forma independente.

** Efeitos condicionais, mostrando a variância adicionalmente explicada pela inclusão da variável no modelo.

Utilizando os perfis de DGGE obtidos de plantas com um mês de cultivo para a análise de componentes principais (PCA) foi possível correlacionar a ocorrência de bandas com as diferentes plantas avaliadas. A ocorrência preferencial de cada uma das espécies, indicada por setas nas Figuras 2.4C e 2.5C pode ser acessada, indicando as bandas de interesse para identificação por meio de seqüenciamento. Na PCA utilizando amostras de rizoplano de plantas em estado vegetativo foi possível identificar bandas correlacionadas com plantas WT, que são diferentes daquelas correlacionadas com plantas CAB ou TRP.

Estas bandas foram recortadas do gel e posteriormente seqüenciadas, revelando a identidade das espécies bacterianas que respondem diferentemente ao cultivo de diferentes plantas de tabaco. A filogenia destas bandas revelaram os três grupos bacterianos afetados pelo cultivo de tabaco transgênico (Figura 2.6). A banda claramente observada em maior densidade em plantas WT foi identificada como pertencente a espécies da família Enterobacteriaceae, afiliada aos gêneros *Enterobacter* e *Erwinia*. A banda observada preferencialmente em plantas CAB apresentou grande similaridade com seqüências do gênero *Bacillus*, enquanto que a banda preferencial em plantas TRP foi identificada como pertencente ao gênero *Burkholderia*.

De maneira geral a análise de DGGE mostrou o efeito do cultivo de tabaco transgênico quando plantas com um mês de cultivo são comparadas, demonstrando que as alterações observadas estão relacionadas com algumas espécies, que podem ser estimuladas ou inibidas pelo cultivo de diferentes plantas. Foi também comprovado pela CCA que as alterações nas

comunidades bacterianas são determinadas mais intensamente pelo tempo de cultivo da planta do que pela alteração do genótipo da planta cultivada.

2.2.3 Discussão

Dentre os fatores que podem interferir na composição de comunidades bacterianas associadas está o genótipo da planta hospedeira. Além de diferentes espécies vegetais ou distintas cultivares, as plantas transgênicas podem também atuar alterando o perfil de comunidades bacterianas associadas. Os possíveis efeitos do cultivo de plantas transgênicas sobre a diversidade bacteriana associada têm sido estudados em várias espécies vegetais, utilizando diferentes plantas transgênicas, com diversas características como resistência a bacteriose expressando o gene da lisozima (HEUER; SMALLA, 1997; RASCHE et al., 2006), resistentes a insetos expressando a toxina Bt (CASTALDINI et al., 2005) e com maior potencial de acúmulo de ferro (ROBIN et al., 2006).

Figura 2.6 - Filogenia das bandas de DGGE selecionadas por apresentarem ocorrência preferencial para as diferentes plantas de tabaco utilizadas, após um mês do cultivo das mesmas. O alinhamento das seqüências e a filogenia foram realizados com base na seqüência parcial (324 pb) obtida das bandas, as quais foram comparadas com seqüências presentes no GenBank. A escala apresentada indica a divergência entre as diferentes seqüências utilizadas na construção da árvore filogenética. A seqüência de *Streptomyces* sp. foi utilizada para enraizar a árvore, como grupo externo

Este capítulo demonstrou o efeito do cultivo de tabaco transgênico na composição da comunidade bacteriana da rizosfera e do rizoplane durante a fase inicial do ciclo vital da planta. Apesar de plantas CAB apresentarem uma alteração fisiológica, interferindo diretamente em seu ciclo vital, nas duas amostragens realizadas estas plantas estavam em estágios similares de desenvolvimento. Na primeira amostragem todas as plantas estavam em estágio vegetativo apresentando seis folhas, e após três meses de cultivo todas as plantas apresentavam florescimento. Neste estágio, as plantas WT apresentavam as folhas mais velhas em estágio inicial de maturação, o que não foi observado nas demais plantas. Devido a esta uniformidade morfológica nas plantas, as alterações nas comunidades bacterianas observadas na primeira amostragem não podem ser relacionadas com o estágio de desenvolvimento da planta.

As plantas da variedade TRP, apresentam não apenas o gene exógeno como fator diferencial das plantas WT, mas todo o genoma composto por diferentes genes e alelos, que podem atuar diferencialmente alterando a composição das comunidades bacterianas que se associam a estas plantas. Desta maneira, em algumas análises foi possível observar maiores alterações comparando as comunidades bacterianas associadas a estas plantas com as plantas TRP do que as observadas na comparação de plantas WT com plantas CAB1 e CAB2.

Considerando as análises realizadas, o isolamento seguido da caracterização dos isolados pela técnica de ARDRA permitiu a observação de uma densa e diversa comunidade bacteriana associada às plantas. O sequenciamento de isolados representantes dos haplótipos obtidos dentro dos diferentes grupos morfológicos revelou a dificuldade em estudar comunidades bacterianas baseando-se na morfologia das colônias obtidas por isolamento. Nas análises do haplótipo de ARDRA dos isolados, foi observada a ausência de isolados com o haplótipo identificado como *Streptomyces* em plantas WT. Este efeito pode ser relacionado com a característica transgênica da planta, porém não parece haver uma seleção específica do tipo de transgene, pois isolados deste grupo foram obtidos tanto de plantas CAB como plantas TRP. No entanto, as sequências obtidas permitiram a identificação dos principais grupos bacterianos cultiváveis que compõem a comunidade bacteriana da rizosfera e do rizoplane de tabaco.

Enquanto pequenas alterações, pouco relacionadas às diferentes plantas utilizadas, foram observadas no isolamento, a análise de DGGE permitiu uma observação dos efeitos do cultivo de diferentes genótipos de tabaco e das diferentes épocas amostradas na estrutura da comunidade bacteriana. O desenvolvimento da planta mostrou afetar de forma mais significativa o perfil das

comunidades bacterianas avaliadas quando comparados aos efeitos do cultivo das diferentes plantas. Em relação ao efeito do cultivo de plantas transgênicas, a análise demonstrou que a comunidade bacteriana é afetada pelo genótipo das plantas principalmente nos estágios iniciais do seu desenvolvimento. Foi possível também observar que a comunidade do rizoplane responde de forma mais intensa, quando comparada a comunidade da rizosfera, ao cultivo de diferentes genótipos de plantas de tabaco, principalmente por serem observadas estruturas microbianas, como biofilmes, compondo esta comunidade (RAMEY et al., 2004; TIMMUSK et al., 2005; ANDREOTE et al., 2006; BATTIN et al., 2007). Isto indica a seletividade realizada pela planta ao recrutar espécies bacterianas capazes de colonizar a superfície de suas raízes. Considerando que o efeito observado é temporário, e as diferenças após três meses de cultivo das plantas são menores, pode ser sugerido que os exsudados das raízes são os principais fatores desta seleção. Estes exsudados têm a sua quantidade liberada e composição alterada ao longo do ciclo da planta, o que pode selecionar diferentes populações (KOZDROJ; VAN ELSAS, 2000). Esta observação corrobora com os dados obtidos no presente estudo, onde as plantas CAB1 e CAB2, apesar de possuírem diferentes números de genes inseridos e diferentes níveis de expressão heteróloga, apresentam o mesmo fenótipo. Estas plantas apresentaram perfis de DGGE muito similares, indicando que a alteração nos exsudados de raiz são similares em ambas as plantas, o que leva a seleção similar da comunidade bacteriana da rizosfera e do rizoplane. A identificação da banda que ocorre preferencialmente em plantas CAB demonstrou que o gênero *Bacillus* é selecionado para colonizar a superfície da raiz destas plantas, enquanto que nas outras plantas, os grupos selecionados pertencem à família Enterobacteriaceae para plantas WT e o gênero *Burkholderia* para plantas TRP. É importante destacar que estes três grupos bacterianos são amplamente descritos em associação com plantas, o que mostra a íntima interação existente, podendo responder a alterações no genótipo da mesma.

Também a partir dos perfis de DGGE pode ser observada a capacidade do solo em restabelecer a diversidade bacteriana uma vez abalada devido a alteração de fatores ambientais, o que corrobora com os dados de isolamento, onde as variações na densidade das comunidades bacterianas foram encontradas na análise de plantas com um mês de cultivo. Esta capacidade ficou evidenciada em amostras de rizosfera e rizoplane, onde os perfis de DGGE mostraram que após um mês de cultivo as diferentes plantas possuíam distintas comunidades bacterianas associadas. No entanto, quando as plantas foram amostradas com três meses de cultivo, a

diversidade bacteriana nas amostras foi bastante similar. Considerando o desenvolvimento vegetal, após um mês de cultivo as plantas estão em pleno ciclo vegetativo, com alta atividade radicular para obtenção dos nutrientes necessários para o florescimento. Este alto metabolismo radicular leva diretamente a uma intensa exsudação na raiz. Após três meses de cultivo as plantas já apresentam florescimento, além de uma menor atividade radicular, voltando seu metabolismo para a formação dos frutos. Desta maneira, a diversidade da rizosfera e do rizoplane neste estágio já não é mais determinada pela atividade radicular, mas sim pelo solo próximo a área rizosférica.

De maneira geral, baseando-se nos perfis de DGGE apresentados neste estudo, pode ser sugerido que após as alterações causadas nas comunidades bacterianas devido ao cultivo de plantas transgênicas, a diversidade presente na comunidade bacteriana do solo é capaz de restaurar a diversidade original deste ambiente, atuando com poder tamponante sobre os impactos causados. Esta informação é de grande importância nos estudos sobre efeitos do cultivo de plantas transgênicas em comunidade microbianas, demonstrando que efeitos observados em estágios iniciais do desenvolvimento das plantas podem ser apenas transientes, não resultando em variações em todo o ciclo da planta. Estes resultados destacam a necessidade de estudos em diferentes épocas para o monitoramento do efeito dessas plantas e de outras variáveis na diversidade bacteriana da rizosfera.

Referências

- ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, p. 169-173, 2004.
- ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAUJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.
- BATTIN, T.J.; SLOAN, W.T.; KJELLEBERG, S.; DAIMS, H.; HEAD, I.M.; CURTIS, T.P.; EBERL, L. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 76-81, 2007.
- CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C. *et al.* Impact of Bt corn on rhizospheric and on beneficial mycorrhizal symbiosis and soil eubacterial communities in experimental microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 6719-6729, 2005.
- DUNFIELD, K.E.; GERMIDA, J.J. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 806-815, 2004.
- GYAMFI, S.; PFEIFER, U.; STIERSCHNEIDER, M.; SESSITSCH, A. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 41, p. 181-190, 2002.
- HEUER, H.; KROPPESTEDT, R.M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere relative to communities are negligible natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1325-1335, 2002.
- HEUER, H.; SMALLA, K. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 30, p. 49-61, 1997.
- HEUER, H.; SMALLA, K. Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing transgenic variants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 357-371, 1999.
- KAY, E.; VOGEL, T.M.; BERTOLLA, F.; NALIN, R.; SIMONET, P. In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3345-3351, 2002.
- KOZDROJ, J.; VAN ELSAS, J.D. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1405-1417, 2000.

LABATE, M.T.V.; KO, K.; KO, Z.W. *et al.* Constitutive expression of pea *Lhcb1-2* in tobacco affects plant development, morphology and photosynthetic capacity. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 55, p. 701-714, 2004.

LOTTMANN, J.; HEUER, H.; SMALLA, K.; BERG, G. Influence of transgenic T4-lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant-associated bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 365-377, 1999.

RAMEY, B.E.; KOUTSOUDIS, M.; VON BODMAN, S.B.; FUQUA, C. Biofilm formation in plant-microbe associations. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 7, p. 602-609, 2004.

RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M.H.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, p. 219-235, 2006.

ROBIN, A.; VANSUYT, G.; CORBERAND, T.; BRIAT, J.F.; LEMANCEAU, P. The soil type affects both the differential accumulation of iron between wild-type and ferritin over-expressor tobacco plants and the sensitivity of their rhizosphere bacterioflora to iron stress. **Plant and Soil**, The Hague, v. 283, p. 73-81, 2006.

SALLES, J.F.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: Effect of crop and land use history. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 4012-4020, 2004.

STEENWERTH, K.L.; JACKSON, L.E.; CALDERON, F.J.; STROMBERG, M.R.; SCOW, K.M. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 34, p. 1599-1611, 2002.

TIMMUSK, S.; GRANTCHAROVA, N.; GERHART, E.; WAGNER, H. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 7292-7300, 2005.

3 A COMUNIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA DE EUCALIPTOS TRANSGÊNICOS E CONVENCIONAIS

Resumo

A rizosfera é um ecossistema explorado por uma grande diversidade de organismos que estão diretamente envolvidos no desenvolvimento da planta. Fatores bióticos e abióticos influenciam a interação existente entre microrganismos e plantas, dentre os quais a expressão de genes heterólogos nos componentes desta interação. No presente capítulo a comunidade bacteriana da rizosfera de eucalipto foi avaliada a partir de dois diferentes clones convencionais (WT17 e WT18) e quatro diferentes clones transgênicos (TR-9, TR-15, TR-22 e TR-23), revelando que esta comunidade pode sofrer variação devido à diferença no genótipo da planta hospedeira. Os dados de isolamento mostraram não haver diferenças na densidade da comunidade bacteriana cultivável total das plantas avaliadas. No entanto, a quantificação de colônias do gênero *Methylobacterium* apresentou alterações na densidade populacional do rizoplane, sendo esta população ausente em plantas TR-15. A comunidade bacteriana isolada das amostras foi caracterizada por ARDRA, sendo determinada sua composição principal por seis grupos bacterianos, além de *Methylobacterium* spp. (incluindo *M. nodulans*, *M. mesophilicum*, *M. fujisawaense* e *M. radiotolerans*), que são as ordens Burkholderiales, Rhizobiales e Actinomycetales, as famílias Xanthomonadaceae e Bacillaceae, e o gênero *Mycobacterium*. Estes taxons mostraram ocorrência diferencial dentre os genótipos de plantas avaliados. A análise independente de cultivo foi realizada por meio de PCR-DGGE, acessando as comunidades bacterianas das frações referentes às classes α e β -proteobactérias, além dos grupos dos actinomicetos e um subgrupo das α -proteobactérias, que contém o gênero *Methylobacterium*. A análise de PCR em tempo real também foi aplicada para este último grupo, confirmando a menor densidade deste grupo em plantas TR-15. Os perfis de PCR-DGGE foram analisados por meio da Análise de Componentes Principais (PCA) mostrando diferenças nas comunidades entre plantas convencionais e transgênicas, bem como entre plantas não transgênicas (convencionais). As amostras de rizoplane de plantas WT17 e TR-15 foram utilizadas para análise de duas bibliotecas de clones do gene 16S DNAr. Quando comparadas, a biblioteca de planta transgênica revelou uma menor riqueza de grupos bacterianos. Os dados demonstram que as alterações causadas pelo cultivo de plantas transgênicas são por vezes similares aos observados quando diferentes genótipos de plantas comuns são cultivados. No entanto, devido a possíveis exceções, cada nova planta transgênica desenvolvida deve ser avaliada.

Palavras-chave: Organismos geneticamente modificados, Interação planta-bactéria, 16S DNAr, DGGE

THE BACTERIAL COMMUNITY FROM RHIZOSPHERE OF CONVENTIONAL AND TRANSGENIC EUCALYPTUS

Abstract

Rhizosphere is an ecosystem explored by a variety of organisms, directly involved in the plant development. Biotic and abiotic factors may interfere in the microbial-plant interactions, amongst them the heterologous gene expression on plants. In present chapter the bacterial community to the eucalyptus rhizosphere was evaluated, from two conventional (WT17 and WT18) and four transgenic (TR-9, TR-15, TR-22 e TR-23) clones, revealing that this community respond to alterations in the host plant genotype. Isolation data show that total culturable bacterial community are similar in all evaluated plants, while the number of colonies affiliated to *Methylobacterium* revealed shifts in rhizoplane, where these colonies were absent in plants TR-15. The characterization of isolated community by ARDRA revealed the main composition of this community by six bacterial groups besides the *Methylobacterium* spp. (including *M. nodulans*, *M. mesophilicum*, *M. fujisawaense* e *M. radiotolerans*). The other present groups are the orders Burkholderiales, Rhizobiales and Actinomycetales, the families Xanthomonadaceae and Bacillaceae, and the genus *Mycobacterium*. These taxa show the differential occurrence amongst the evaluated plant genotypes. The culture-independent analysis by PCR-DGGE, assessing the bacterial community fractions referring to α and β -proteobacteria classes, actinomycetes and a subset of α -proteobacteria class including the genus *Methylobacterium*. Real time PCR was also applied to quantify the last groups, confirming the lower density in TR-15 plants. The PCR-DGGE patterns were analysed by PCA (principal component analysis) revealing differences amongst communities from conventional and transgenic plants, and also between the two conventional plants evaluated. The rhizoplane samples from WT17 and TR-15 plants were used to construction of two clone libraries of 16S rDNA. When compared, the library from transgenic plant revealed a lower richness of bacterial groups. Data demonstrate that shifts caused by transgenic plants cultivation are mostly similar to those caused by cultivation of different genotypes of conventional plants. However, due to possible exceptions, every new transgenic plant line developed should be evaluated.

Key-words: Genetically modified organisms, Plant-bacteria interaction, 16S rDNA, DGGE

3.1 Introdução

*"Acreditar é monótono, duvidar é apaixonante,
manter-se alerta: eis a vida."*

Oscar Wilde

O eucalipto é a principal fonte de celulose para a indústria brasileira. Dentro do desenvolvimento de novos produtos, a utilização de plantas transgênicas é considerada como uma opção para a obtenção de genótipos mais produtivos e com melhor qualidade de celulose. Neste caso, imagina-se que a utilização de árvores transgênicas seja menos contestada do que a utilização da transgênese para o melhoramento de outras espécies, considerando que as plantas de eucalipto não são utilizadas na alimentação humana ou de animais. Entretanto, no caso da ocorrência de impactos ambientais devido ao cultivo de plantas transgênicas, estes podem ser mais intensos em eucalipto devido ao longo período de cultivo desta espécie nos campos de produção, variando entre sete e 10 anos. Neste contexto, pode-se dizer que as bactérias associadas às plantas podem atuar como um ótimo indicador de alterações no ambiente, uma vez que estas bactérias estão associadas às plantas durante todo seu ciclo de desenvolvimento.

A rizosfera de plantas é um ambiente dinâmico capaz de responder rapidamente a estímulos externos. Neste ambiente muitos parâmetros influenciam na atividade e alteram a composição das comunidades microbianas (RASCHE et al., 2006a). As interações existentes entre plantas e bactérias são específicas e sensíveis às alterações do ambiente (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990), como por exemplo a alteração do genótipo da planta (HEUER; SMALLA, 1999; LOTTMANN et al., 1999; GYAMFI et al., 2002) ou da bactéria (ANDREOTE et al., 2004). O efeito do cultivo de plantas transgênicas em comunidades bacterianas vem sendo avaliado em várias espécies de plantas, onde os autores descrevem os fatores ambientais como maiores determinantes das estruturas das comunidades bacterianas ao invés do cultivo de plantas comuns ou transgênicas (HEUER; SMALLA, 1997; SICILIANO; GERMIDA, 1999; DUNFIELD; GERMIDA, 2004; RASCHE et al., 2006a). Em dois artigos (RASCHE et al., 2006a; RASCHE et al., 2006b), foram descritos como comparável a outros fatores ambientais o cultivo de plantas de batata expressando o gene da lisozima T4 na determinação da composição das comunidades bacterianas associadas às plantas. Os fatores descritos como comparáveis ao efeito de planta transgênica foram genótipos de plantas, tipo de solo e a infecção por patógenos.

Nos últimos anos o número de grupos bacterianos importantes interagindo com plantas tem aumentado consideravelmente. Entre estes novos grupos descritos como relacionados às plantas destaca-se o gênero *Methylobacterium*, pertencente à família Rhizobiales, classe α -proteobactérias. Espécies deste gênero são encontradas nos mais diversos ambientes como solo, poeira, água, sedimentos de lagos, entre outros. Especificamente em plantas, estas são descritas colonizando a superfície de folhas (CHANPRAME; TODD; WIDHOLM, 1996) e ramos como endófito de citros (ARAUJO et al., 2002), pinus (PIRTTILA et al., 2000) e crotalaria (SY et al., 2001b).

A interação entre este grupo bacteriano e as plantas não é completamente entendida, porém alguns mecanismos têm sido descritos como indicadores do tipo de interação existente. Foi demonstrado que *M. mesophilicum* é capaz de colonizar plantas de *Catharanthus roseus* e *Nicotiana clevelandii* ativamente, causando alterações na constituição da comunidade endofítica destas plantas (ANDREOTE et al., 2006). O gênero *Methylobacterium* foi descrito como um importante endófito de citros, diretamente associado à ocorrência da Clorose Variegada dos Citros, causada por *Xylella fastidiosa* (ARAUJO et al., 2002). Sy et al. (2001a) relatam a presença de genes da nitrogenase (*nifH*) e noduladores (*nodA*) em isolados de *Methylobacterium nodulans* sp., mostrando que este grupo pode estar associado à fixação de nitrogênio em plantas. A capacidade de induzir resistência sistêmica na planta hospedeira também foi descrito como característica de *Methylobacterium* spp. em plantas de arroz (MADHAIYAN et al., 2004) e amendoim (MADHAIYAN et al., 2006).

Neste capítulo o objetivo foi comparar as comunidades bacterianas da rizosfera e do rizoplano de eucaliptos, verificando alterações nos principais grupos bacterianos componentes desta comunidade. Mais detalhadamente, deseja-se também descrever os componentes da população de *Methylobacterium* spp. e verificar alterações desta população nas diferentes plantas avaliadas.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Material vegetal e amostragem

As plantas utilizadas foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Carlos Alberto Labate (ESALQ/USP). Quatro linhas transgênicas (TR-9, TR-15, TR-22 e TR-23) e duas convencionais (WT-17 e WT-18), todas híbridas (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*) foram utilizadas neste experimento. Estas plantas foram originadas de sementes do cruzamento entre as espécies, formando diferentes clones. As plantas transgênicas contêm e expressam o fragmento exógeno de DNA que contém os genes de ervilha *Lhcb1-2* ligado ao gene de seleção *nptII*. O resultado fenotípico para estas plantas é uma maior taxa fotossintética, levando a um desenvolvimento e produtividade maiores (GONZALEZ et al., 2002). As quatro plantas transgênicas foram obtidas num mesmo experimento de transformação, sendo portanto consideradas diferentes eventos de transformação do mesmo transgene.

Todas as plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação, em potes contendo aproximadamente 10 kg da mistura de substrato de cultivo e vermiculita (50/50 – v/v). As plantas amostradas apresentavam dois anos de idade (após o transplante) e estavam em estágio vegetativo. Quatro plantas de cada genótipo foram amostradas para avaliação das comunidades bacterianas. A amostragem foi realizada com a extração de blocos de substrato e raízes com cilindro (4 cm de diâmetro por 15 cm de comprimento), que foi inserido na região próxima a planta. Cada planta foi amostrada duas vezes (uma em cada lado da planta) e uma amostra composta foi utilizada nas análises. A partir do bloco de substrato retirado, as raízes foram separadas e as amostras de rizosfera e rizoplano coletadas. O substrato aderido às raízes foi considerado como amostra da rizosfera e as raízes lavadas foram utilizadas na obtenção das amostras de rizoplano.

3.2.1.2 Isolamento da comunidade bacteriana

As amostras foram submetidas à agitação em solução salina NaCl 0,8% durante 2 h a 180 rpm. Para cada amostra, diluições apropriadas foram feitas em água destilada esterilizada, semeadas em meio de cultivo não seletivo TSB 5% suplementado com ágar (1,2%) e benomil (50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) para inibir o crescimento de fungos e incubadas a 28°C por 14 dias. O número total de colônias e de colônias similares à *Methylobacterium* spp. (coloração rósea e de crescimento lento) foi determinado. Uma amostragem aleatória da diversidade bacteriana foi coletada, purificada, e armazenada em solução 20% de glicerol a -80°C. No total foram caracterizadas 144 colônias, sendo 14 isolados de *Methylobacterium* spp. e 130 isolados contendo o restante da comunidade bacteriana isolada das amostras.

3.2.1.3 Extração de DNA das colônias selecionadas para caracterização

Foi realizada a extração de DNA de cada um dos 130 isolados da comunidade total utilizando o *Wizard DNA Extraction Kit* (Promega, USA) seguindo-se as instruções do fabricante. Utilizando os *primers* P027 e R1387 (Tabela 3.1) a amplificação do gene 16S RNAr foi realizada. As reações foram realizadas em volume de 50 μL contendo entre 5 e 10 ng do DNA molde, 10 mM de Tris-HCl (pH8,3), 10 mM de KCl, 3,75 mM de MgCl_2 , 200 mM de cada um dos deoxirribonucleosídeos trifosfato, 400 mM de cada *primer* e 5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil). A amplificação foi realizada em termociclador PTC-200 (MJ Research, USA) programado para uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 min, 62°C por 1 min e 72°C por 90 s. Uma extensão final foi realizada à 72°C por 10 min. A amplificação do fragmento esperado (1400 pb) foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (w/v) em tampão TBE 0,5X, seguido de coloração em brometo de etídio e observação em luz ultra-violeta.

3.2.1.4 Caracterização dos isolados por ARDRA

Alíquotas dos produtos de PCR contendo aproximadamente 2 μg de DNA foram utilizadas para a caracterização por ARDRA de 130 isolados (esta análise não foi feita para os

isolados de *Methylobacterium* spp.). O DNA foi digerido com 3 U da endonuclease *Mbo*I ($\downarrow$ GATC), da maneira recomendada pelo fabricante (Fermentas Life Sciences, Brasil), e avaliada em eletroforese de gel de agarose 2% (w/v) em tampão TBE 0,5X. A eletroforese foi realizada a 3 V.cm^{-1} durante 4 h. Os perfis de clivagem foram então comparados e a ocorrência de cada um dos haplótipos determinada dentro de cada amostra.

3.2.1.5 Identificação dos isolados por seqüenciamento do gene 16S DNAr

A afiliação filogenética dos isolados de cada um dos haplótipos obtidos foi determinada pelo seqüenciamento parcial do gene 16S DNAr. O produto de PCR gerado pela amplificação com os *primers* P027 e R1387 (Tabela 3.1) foi purificado com o *PCR purification PowerClean™ DNA Clean-Up Kit* (MoBio Laboratories, EUA) e submetidos a seqüenciamento. Foram também selecionados os isolados morfológicamente similares a *Methylobacterium* spp. (coloração rósea e desenvolvimento lento) para identificação por seqüenciamento do gene 16S DNAr.

As seqüências obtidas foram submetidas à comparação por similaridade por BlastN contra a base de dados do GenBank (ALTSCHUL et al., 1990), e posteriormente alocadas em árvores filogenéticas contendo as espécies mais similares. Os alinhamentos e a filogenia foram realizados no programa MEGA versão 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004).

3.2.1.6 Extração de DNA de amostras ambientais

O DNA da rizosfera foi obtido a partir de 0,5 g do solo rizosférico enquanto que o DNA do rizoplano foi obtido a partir de 0,5 mL de uma suspensão celular. Esta suspensão celular foi obtida para cada amostra centrifugando-se o tampão onde as raízes foram agitadas (10min a 5 000 g) e ressuspendendo o precipitado em 0,5 mL de água destilada esterilizada. As extrações de DNA foram realizadas com o *MoBio UltraClean™ soil DNA kit* (MoBio Laboratories, EUA) usando o protocolo fornecido pelo fabricante. A extração e a integridade do DNA foram verificadas em gel de agarose 1% (w/v) em tampão TBE 0,5X, posteriormente corado com brometo de etídeo e observado em luz ultra-violeta.

Tabela 3.1 - *Primers* usados para diferentes alvos de amplificação a partir do DNA de isolados, clones e amostras ambientais

<i>Primer</i>	Sequências (5' → 3')	Alvo	Referência
P027	GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG	Gene 16S DNAr bacteriano	LANE et al., 1985
530R	CCG CGG CGC TGG CAC	Gene 16S DNAr bacteriano	MUYZER; DEWAAL; UITTERLINDEN, 1993
R1387	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG	Gene 16S DNAr bacteriano	HEUER et al., 1997
U968_LCG	CGCCCCGGGCGCGCCCCCGGGCGGGGGGCACG	Gene 16S DNAr bacteriano – análise de DGGE	HEUER et al., 1997
Alpha-U	GGGGG-CGA ACG CGA AGA ACC TTA C	16S das α -proteobactérias	GOMES et al., 2001
Beta-2	CCG CAT ACG CCC TAC GGG GGA AAG ATT TAT	16S das β -proteobactérias	GOMES et al., 2001
F243	CGC ACA AGC GGT GGA TGA	16S de actinomicetos	HEUER et al., 1997
2F	GGA TGA GCC CGC GGC CTA	Subgrupo da classe α -proteobactéria	NISHIO; YOSHIKURA; ITOH, 1997
	GAT CGG CCC GCG TCT GAT TAG		
M13F	GTA AAA CGA CGG CCA G	Vetor	Invitrogen
M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Vetor	Invitrogen

3.2.1.7 PCR em tempo real

As análises de PCR em tempo real foram realizadas para quantificação de um subgrupo da classe α -proteobactéria, que contém o gênero *Methylobacterium*. As reações foram realizadas no equipamento iQ5 (BioRad), utilizando os sistema SYBR Green I. Dois conjuntos de *primers* foram empregados na amplificação do DNA extraído diretamente das amostras de rizoplane (Tabela 3.1), sendo todos baseados na amplificação de fragmentos do gene 16S ribossomal. A primeira reação de amplificação foi realizada com os *primers* universais para o domínio Bacteria (U968F and R1387) (Tabela 3.1), usando-se os valores de Cts como normalizadores para determinar a quantidade de DNA passível de amplificação em cada uma das amostras. O fragmento de amplificação para esta primeira reação tem 400 pb. A segunda reação realizada com as amostras foi composta dos *primers* 530R (universal para o domínio Bacteria) e do *primer* seletivo 2F (Tabela 3.1), que é descrito na literatura como específico (NISHIO; YOSHIKURA; ITOH, 1997). Esta amplificação gerou fragmentos de DNA com 260 pb, e os Cts obtidos foram utilizados na quantificação do grupo bacteriano estudado. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em volume de 25 μ l contendo 12,5 μ l do kit *Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Brasil), e os *primers* na concentração de 100 nM. A amplificação do DNA com *primers* universais (U968 e R1387) foi realizada com um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 30 s, seguido de 30 ciclos de amplificação de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 30 s, com uma extensão final de 72°C por 3 min. A reação grupo específica foi realizada apenas alterando a temperatura de anelamento de *primers* para 62,5°C. Em todas as reações, uma curva de desnaturação foi realizada no final, com temperatura variando entre 72° à 96°C para verificar a especificidade da amplificação. Diluições do DNA de *M. mesophilicum* foram utilizadas para amplificação e obtenção das curvas padrão. Os valores de Cts obtidos para cada amostra em cada uma das duas reações foram utilizados para quantificação absoluta do DNA de interesse. Os valores de Ct obtidos na reação com *primers* universais (U968 e R1387) (Tabela 3.1) foram utilizados para normalização dos dados. A quantificação absoluta foi feita por meio da aplicação da fórmula (*R*), considerando as plantas em relação a uma das plantas controle (neste caso as amostras de WT17). $R = [(E_{\text{alvo}})^{\Delta C_{\text{t}}}_{\text{alvo}}] \cdot ((E_{\text{normalizador}})^{\Delta C_{\text{t}}}_{\text{normalizador}})^{-1}$, onde E indica a eficiência dos conjuntos de *primers* usados e ΔC_{t} é a diferença calculada por $(C_{\text{t}}_{\text{controle}} - C_{\text{t}}_{\text{amostra}})$. O *software*

BioRad iQ5, também calculou as regressões lineares da amplificação das diluições padrões utilizadas.

3.2.1.8 Obtenção dos perfis de DGGE

O perfil da composição total da comunidade bacteriana (cultiváveis e não cultiváveis) encontrada nas amostras de rizosfera e rizoplane de eucalipto foram determinadas por meio da aplicação da técnica de DGGE, acessando a diversidade de bactérias das classes α e β -proteobactérias, além dos grupos dos actinomicetos e um subgrupo da classe α -proteobactéria, incluindo o gênero *Methylobacterium*.

Primeiramente uma PCR taxon específica foi realizada contendo 1 μ L da amostra de DNA extraído (5-10 ng) em 25 ciclos de amplificação com os *primers* seletivos para os grupos α , β -proteobactérias, actinomicetos e subgrupo de α -proteobactéria. As reações para cada grupo foram realizadas separadamente e em combinação com o *primer* 1492R. Para α -proteobactérias e β -proteobactérias, os *primers* AlphaU e Beta-2 foram utilizados (Tabela 3.1) (GOMES et al., 2001). O *primer* seletivo para actinomicetos foi também previamente descrito (HEUER et al., 1997) (Tabela 3.1). O *primer* 2F, seletivo para o subgrupo de α -proteobactéria, é descrito na literatura como específico para *Methylobacterium* e *Rhodopseudomonas* (NISHIO; YOSHIKURA; ITOH, 1997). Este *primer* foi combinado com o *primer* 1387R na primeira PCR. As reações grupo específicas foram realizadas de acordo com o protocolo descrito anteriormente para os *primers* utilizados.

O produto de amplificação grupo específico foi utilizado como DNA molde na segunda reação de PCR para amplificação com os *primers* para DGGE. Estas reações foram realizadas em volume de 50 μ L, contendo aproximadamente 20 ng de DNA molde e 400 nM de cada *primer* universal U968+GC and R1387 (Tabela 3.1), utilizando 35 ciclos de amplificação com temperatura de anelamento de 55°C. O produto da PCR foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (w/v) em tampão TBE 0.5X, com posterior coloração em solução de brometo de etídeo (10 mg.L⁻¹) e visualização sobre luz ultra-violeta.

O DGGE foi realizado como descrito anteriormente (HEUER et al., 1997) com equipamento *phorU2 system* (Ingeny, Goes, Holanda). O produto de amplificação da segunda reação foi aplicado em gel de poliacrilamida 6% (w/v) em tampão TAE 0,5X. Este gel foi

preparado com gradiente desnaturante variando de 45 a 65% (onde 100% de desnaturação significa a concentração de 7 M de uréia e 40% de formamida). Os géis foram submetidos a eletroforese vertical por 16 h a 100 V à temperatura de 60°C, e posteriormente corados por 1 h com SYBR Gold (diluído 1:1,000) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) e fotografado sobre luz ultra-violeta.

3.2.1.9 Análise dos perfis de DGGE

O programa GelCompar II (Applied Maths, Bélgica) foi utilizado para normalização, conversão e comparação das imagens em matrizes de presença/ausência e intensidade de bandas. A normalização e seleção de bandas feita pelo programa foram cuidadosamente avaliadas e correções manuais foram feitas quando necessárias. A intensidade relativa das bandas foi calculada para cada amostra e uma tabela contendo a posição das bandas e as respectivas intensidades foi exportada para análises posteriores.

As análises de componentes principais (PCA) foram realizadas utilizando o programa Canoco 4.5 (TER BRAAK & SMILAUER, 2002). As tabelas exportadas do programa *GelComparII* (contendo posição e intensidade de bandas) foram utilizadas como dados de ocorrência de espécies. Além da PCA, o programa também foi utilizado para estimar a diversidade bacteriana presente nas amostras utilizando o perfil de DGGE gerado com o *primer* seletivo 2F (Tabela 3.1). As posições das bandas foram consideradas como espécies e a intensidade relativa foi considerada como frequência, permitindo a determinação do índice de diversidade de Shannon (H') para cada uma das amostras, por meio de aplicação da fórmula $H' = -\sum p_i \ln p_i$, onde p_i é a abundância (0 a 1) da *iésima* espécie (banda) dentro da amostra.

3.2.1.10 Construção da biblioteca grupo específica do gene 16S RNAr

As amplificações para posterior clonagem foi realizada em duas PCRs. A primeira, com apenas 20 ciclos de amplificação, foi realizada com *primers* universais (P027 e R1387), sendo a segunda PCR realizada com a combinação do *primer* universal R1387 e do *primer* grupo específico 2F. Os produtos de PCR obtidos das quatro repetições de cada um dos tratamentos (WT17 e TR-15) foram então misturados e purificados com kit *GFX DNA from Solution and Gel*

Band Purification (Amersham-Pharmacia, Reino Unido). Os produtos de PCR purificados foram clonados em plasmídeo *Topo-TA PCR cloning* kit (Invitrogen, Brasil) seguindo as indicações do fabricante. Após as clonagens os vetores foram inseridos em *Escherichia coli* por eletroporação e as colônias obtidas foram selecionadas por coloração branca, que indica a presença do inserto no vetor. Estas colônias foram submetidas a extração de plasmídeos e posterior amplificação do inserto com os *primers* M13F e M13R fornecidos pelo fabricante do kit de clonagem. As reações de amplificação foram realizadas com ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 10 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, e 72°C por 1 min, com extensão final a 72°C por 10 min.

3.2.1.11 Análise da biblioteca grupo específica do gene 16S rRNA

No total 96 clones de cada uma das bibliotecas, WT17 e TR-15, foram selecionados e submetidos à seqüenciamento, de maneira similar a descrita para identificação dos isolados. Os cromatogramas obtidos foram trimados pelo programa Phred (EWING et al., 1998) e posteriormente a seqüência do *primer* 2F foi buscada nas seqüências. A afiliação filogenética dos clones das bibliotecas foi obtida com a submissão das seqüências para o RDPQuery (http://simo.marsci.uga.edu/public_db/rdp_query.htm), onde as seqüências foram alinhadas com as mais similares presentes na base de dados. Apenas seqüências que apresentaram anelamento perfeito com o *primer* 2F e afiliadas à classe α -proteobactéria foram selecionadas para a comparação das bibliotecas.

O programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005) foi utilizado na análise de rarefação, onde o número de filotipos foi estimado de acordo com o número e a similaridade determinada entre as seqüências. As seqüências foram alocadas dentro de filotipos considerando as similaridades determinantes para diferentes isolados (100%), espécies (99 e 97%), gênero (95%), família (92%) e ordens (90%). A classificação e os parâmetros utilizados estão de acordo com o *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu>).

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Quantificação de bactérias por isolamento

Bactérias foram consistentemente isoladas das amostras de rizosfera e de rizoplano de plantas de diferentes genótipos de eucalipto. A comunidade bacteriana total mostrou densidades similares entre as plantas (Tabela 3.2) variando em valores de log 5,79 à 6,48 para rizosfera e 6,0 à 6,9 para rizoplano. Além da densidade bacteriana cultivável total, foram também quantificadas as colônias tipicamente pertencentes ao gênero *Methylobacterium* (coloração rósea e desenvolvimento lento). Estas colônias foram observadas em amostras de rizoplano mas não em amostras de rizosfera. Dentre as amostras de rizoplano, estas colônias foram encontradas em menor densidade em plantas com o genótipo TR-22 e foram ausentes em plantas de genótipo TR-15 (Figura 3.1).

3.2.2.2 Caracterização por ARDRA e ocorrência dos grupos bacterianos

A análise de ARDRA de 130 isolados obtidos das amostras permitiu distinguir os principais grupos bacterianos componentes da porção cultivável da comunidade bacteriana da rizosfera e do rizoplano de plantas de eucalipto. Adicionalmente, algumas diferenças na ocorrência destes grupos foram observadas nas plantas avaliadas.

Os perfis de clivagem do gene 16S DNAr dos isolados avaliados deram origem aos haplótipos, que foram identificados por seqüenciamento parcial do gene 16S DNAr. Desta forma, os isolados foram divididos em sete principais grupos, chamados de haplótipos. A filogenia das seqüências de isolados de cada um dos haplótipos foi determinada (Figura 3.2). Os haplótipos A e F apresentaram filogenia com seqüências alocadas dentro da família Xanthomonadaceae. Actinomicetos foram divididos em três haplótipos, B, E e H, sendo que o haplótipo B diferiu isolados do gênero *Mycobacterium* dos demais actinomicetos. Os haplótipo E e H, desta forma, determinaram seqüências afiliadas à ordem Actinomycetales. As proteobactérias também se mostraram divididas em três diferentes haplótipos, sendo o haplótipo D determinante para a ordem Rhizobiales (α -proteobactéria), enquanto que seqüências dos haplótipos C e I mostraram

Tabela 3.2 - Densidade da comunidade bacteriana isolada da rizosfera e do rizoplano de plantas transgênicas e não transgênicas de eucalipto. Os valores indicam a media, em Log10, de quatro repetições, seguidos dos valores de desvio padrão obtidos das repetições

Genótipo da Planta	Densidade da comunidade (Log)	
	Rizosfera	Rizoplano
WT17	6.84 ± 0.65	6.62 ± 0.28
WT18	7.10 ± 0.77	6.21 ± 0.22
TR-9	6.44 ± 0.77	6.68 ± 0.44
TR-15	6.71 ± 0.36	6.21 ± 0.17
TR-22	6.62 ± 0.54	6.19 ± 0.40
TR-23	6.69 ± 0.59	6.25 ± 1.04

afiliação a ordem Burkholderiales (β -proteobactéria). O haplótipo G, por fim, revelou distinguir dentre os demais isolados, àqueles afiliados a família Bacillaceae (Figura 3.2).

Estes grupos bacterianos foram então quantificados em cada uma das amostras, verificando tendências de maior ocorrência de cada um deles em cada comunidade acessada e dentre os genótipos de plantas avaliados. Primeiramente, o comportamento ecológico de cada grupo bacteriano pode ser verificado, determinando a maior ocorrência de actinomicetos em amostras de solo da rizosfera em relação ao rizoplano, que apresentou maior densidade de isolados afiliados a família Xanthomonadaceae. Grupos bacterianos freqüentemente descritos em associação com plantas foram encontrados dentre os isolados, como as ordens Burkholderiales (haplótipos C e I) e Rhizobiales (haplótipo D) (Figura 3.3). O haplótipo B, que identifica o gênero *Mycobacterium* foi encontrado em todas as amostras, indicando ser um grupo importante na ecologia da rizosfera de plantas.

Figura 3.1 - Densidade da população bacteriana total e de isolados similares a *Methylobacterium* spp no rizoplano de plantas de eucalipto. Os valores são referentes a média de quatro repetições, e as barras indicam o desvio padrão das amostras do mesmo genótipo de planta

Figura 3.2 - Filogenia de isolados representantes do haplótipos de ARDRA encontrados na comunidade bacteriana da rizosfera e do rizoplane de plantas de eucalipto, demonstrando a relação dos haplótipos A e F (A), B, E e H (B), G (C) e C, D e I (D) com demais seqüências do banco de dados. A filogenia é baseada no agrupamento das seqüências por similaridade de acordo com o coeficiente de Neighbor-joining utilizando a seqüência parcial do gene 16S DNAr, de aproximadamente 600 pb. Os códigos apresentados são referentes ao registro das seqüências na *GenBank*. Nas árvores são observados os valores de *bootstrap* realizado com 100 subamostragens no grupo de seqüências. A seqüência do gene 16S DNAr de *E. coli* foi utilizada como grupo externo, para enraizamento das árvores

Considerando alterações entre os genótipos de plantas, na rizosfera os haplótipos A e F (família Xanthomonadaceae) foram encontrados com menor frequência em plantas TR-22 e TR-23 e ausentes em plantas WT18 (Figura 3.3A). A ordem Actinomycetales também foi ausente em plantas TR-9 e TR-22. No rizoplano a diferença verificada foi em relação a comunidade de Xanthomonadaceae, que apresentou menor frequência de isolados em plantas TR-15 e TR-23 (Figura 3.3B), enquanto que isolados de Burkholderiales tiveram menor frequência de isolamento em plantas TR-22. Os isolados da família Bacillaceae foram isolados exclusivamente do rizoplano de plantas WT18.

Figura 3.3 - Ocorrência dos grupos taxonômicos classificados por ARDRA na rizosfera (A) e no rizoplano (B) de plantas de eucalipto com os diferentes genótipos avaliados

3.2.2.3 Diversidade da comunidade cultivável de *Methylobacterium* spp. em rizoplano de eucalipto

Isolados com pigmentação rósea obtidos em meio de cultivo TSB5% foram selecionados para identificação por seqüenciamento do gene 16S ribossomal. As seqüências obtidas revelaram alta similaridade com quatro diferentes espécies do gênero *Methylobacterium*. Seis isolados (P3E, P4E, P5E, P6E, P7E e P8E) se agruparam com *M. nodulans*, e outros oito isolados (P1E, P2E, P9E, P10E, P11E, P12E, P14E e P16E) foram alocados em um grupo, correlacionados por baixos valores de *bootstrap*, composto pelas espécies *M. mesophilicum*, *M. fujisawaense* e *M. radiotolerans* (Figura 3.4).

Figura 3.4 - Filogenia dos isolados de espécies *Methylobacterium* isolados do rizoplano de plantas comuns e transgênicas de eucalipto. A filogenia é baseada na seqüência parcial de 1423 pb do gene 16S DNAr. As seqüências dos isolados foram avaliadas em relação a similaridade com as seqüências de *Methylobacterium* spp. presentes no GenBank, e foram correlacionadas com base no agrupamento por Neighbor-joining. A seqüência de *Bradyrhizobium* sp. Foi utilizada como grupo externo, para enraizamento da árvore filogenética. Os valores de *bootstrap* também são apresentados, sendo calculados por 100 subamostragens no grupo de seqüências

3.2.2.4 PCR em tempo real

A análise de tempo real permitiu a quantificação do grupo bacteriano que compreende *Methylobacterium* nas amostras de rizoplano das plantas avaliadas de maneira independente de cultivo. Os valores de eficiência (E) foram de 1,75 e 1,62, e os valores de R^2 de 0,92 e 0,99 para as curvas de diluição utilizando os *primers* universais e grupo específica, respectivamente. A quantificação de seqüências alvo confirmou a menor ocorrência deste grupo em plantas TR-15 quando comparadas com das demais (Figura 3.5). No entanto, comparando os dados de planta TR-15 com os de TR-9, estas plantas possuem a comunidade quantificada em densidades similares na comparação por PCR em tempo real, enquanto que se esta comparação for feita com os dados de isolamento, as amostras de TR-9 parecem ter muito mais colônias de *Methylobacterium* spp. do que as plantas TR-15.

Figure 3.5 - Quantificação absoluta por PCR em tempo real de ácidos nucleicos filogeneticamente afiliados a grupos bacterianos alvos do *primer* 2F, que seleciona para um subgrupo da classe α -proteobactéria, que inclui o gênero *Methylobacterium*, em amostras de rizoplano de eucalipto. As amostras de WT17 foram utilizadas como referência, tendo portanto quantificação igual a 1. Nas demais amostras as barras indicam o erro padrão obtido de quatro repetições

3.2.2.5 Diversidade das comunidades bacterianas da rizosfera e do rizoplano por DGGE

A diversidade que compõe as comunidades bacterianas da rizosfera e do rizoplano foi acessada por meio da aplicação da técnica de DGGE. Os perfis obtidos para os grupos bacterianos acessados por meio da aplicação de *primers* específicos foram analisados por PCA (Figuras 3.6, 3.7 e 3.8). Nas amostras de rizosfera as populações de α -proteobactéria mostraram ser bastante similares nas duas plantas não transgênicas WT17 e WT18, sendo diferenciada a comunidade presente em amostras de plantas TR-23, que se separam das demais no primeiro eixo do gráfico, onde 27,9% da variância é explicada. Outro genótipo de planta que se separou das amostras de plantas não transgênicas no eixo y foi o TR-22, onde 14,8% da variância é explicada (Figura 3.6A). Considerando as populações de β -proteobactéria, as diferenças foram observadas apenas no primeiro eixo do gráfico (35,2% de variância explicada), separando as amostras de plantas TR-23 das plantas WT18, TR-9 e TR-15 (Figura 3.6B). A população de actinomicetos, quando analisada por DGGE, permitiu verificar que existem diferenças entre as plantas não transgênicas já no primeiro eixo do gráfico (16,6% da variância), sendo no segundo eixo separadas as amostras de plantas transgênicas TR-9 e TR-22 das amostras de WT17 (Figura 3.6C).

Devido a grande variabilidade dos perfis de DGGE entre as repetições biológicas do rizoplano, a separação de genótipos foi menor. Na população de α -proteobactérias, as repetições de plantas WT18 apresentaram uma diversidade muito grande, plotadas em diferentes quadrantes do gráfico. As diferenças observadas para esta população foram a separação das amostras de TR-9 e TR-22 no primeiro eixo (21,5% da variância) e das amostras WT17 e TR-15 no segundo eixo, onde 14,4% da variância foi explicada (Figura 3.7A). Na análise de β -proteobactérias, a alta variabilidade das repetições limitou a detecção de diferenças, sendo nos eixos x e y, com 22,2, e 18,2% da variância, respectivamente plotados, não verificada diferenças entre os genótipos de plantas (Figura 3.7B). Finalmente, para a população de actinomicetos em rizoplano de eucalipto comuns e transgênicos são bastante similares. Apenas as amostras de plantas TR-9 foram plotadas separadamente no gráfico que explicou, no total, 43,2% da variância dos dados (Figura 3.7C).

Figura 3.6 - PCA baseado nos perfis de PCR-DGGE obtidos a partir de amostras de rizosfera das plantas de eucalipto. Grupos bacterianos componentes da comunidade total da rizosfera foram acessados por meio de *primers* específicos para α -proteobactéria (A), β -proteobactéria (B) e actinomicetos (C). Os valores indicam a porcentagem da variância explicada nos eixos

Figura 3.7 - PCA baseado nos perfis de PCR-DGGE obtidos a partir de amostras de rizoplano das plantas de eucalipto. Grupos bacterianos componentes da comunidade total da rizosfera foram acessados por meio de *primers* específicos para α -proteobactéria (A), β -proteobactéria (B) e actinomicetos (C). Os valores indicam a porcentagem da variância explicada nos eixos

Figura 3.8 - Análise de componentes principais baseada nos perfis de PCR-DGGE obtidos a partir de amostras de rizosfera (A) e de rizoplano (B) de plantas de eucalipto para o grupo bacteriano selecionado pelo primer 2F, que é composto de um subgrupo da classe das α - proteobactéria, contendo o gênero *Methylobacterium*. Três repetições de cada genótipo de planta são apresentadas e os valores indicam a porcentagem da variância explicada nos eixos

A diversidade de um subgrupo das α -proteobactérias (contendo *Methylobacterium* spp.) foi estudada por DGGE e as PCAs calculadas para estas amostras indicaram as diferenças observadas entre os diferentes genótipos de plantas (Figura 3.8). Um ponto importante a ser destacado é o não agrupamento observado entre as diferentes plantas não transgênicas, como observado para a análise com *primers* de actinomicetos, além da separação das amostras de plantas com genótipo TR-15 das amostras não transgênicas, sendo este último ponto mais evidente em amostras de rizoplano.

Em amostras de rizosfera foi possível verificar o agrupamento das amostras WT17 com TR-23, e das amostras TR-15 com TR-22, enquanto que as amostras TR-9 e WT18 apresentaram comunidades únicas. Para rizoplano, os agrupamentos foram diferentes, com o agrupamento de três plantas que são WT18, TR-9 e TR-22, enquanto que plantas WT17, TR-15 e TR-23 agruparam separadamente na PCA.

Para este grupo de *primers*, os perfis de DGGE também foram utilizados para calcular o índice de Shannon (H'). A figura 3.9 demonstra que os valores para o índice de diversidade da comunidade do rizoplano de plantas TR-15 é claramente menor do que os valores encontrados para outras plantas. No eixo x, as amostras de rizosfera das diferentes plantas mostram índices similares de diversidade, enquanto que no eixo y, onde as amostras de rizoplano são plotadas, a diferença das plantas TR-15 é verificada.

Figura 3.9 - Índices de diversidade de Shannon calculados a partir dos perfis de PCR-DGGE das diferentes plantas utilizando o *primer* 2F como seletivo para o subgrupo de α -proteobactéria em amostras de rizosfera e rizoplano. Os índices foram calculados considerando a intensidade das bandas como frequência de espécies dentro de cada amostra. As barras indicam o desvio padrão observado em três repetições de cada tratamento

3.2.2.6 Análise das bibliotecas grupo-específico do gene 16S RNAr

A classificação filogenética das seqüências selecionadas nas duas bibliotecas revelou que seqüências afiliadas ao gênero *Methylobacterium* foram dificilmente obtidas na biblioteca WT17 e ausentes na biblioteca TR-15 (Figure 3.10). Dentro da classe das α -proteobactérias, as seqüências foram principalmente afiliadas a ordem Rhizobiales, além das ordens Caulobacterales, Rhodobacterales e Rhodospirillales (Figura 3.10A). Considerando a classificação no nível de famílias, apenas uma seqüência afiliada a Methylobacteriaceae foi encontrada na biblioteca WT17, enquanto que nenhuma seqüência afiliada a esta família foi observada na biblioteca TR-15. As famílias mais frequentemente encontradas nas bibliotecas foram as Bradyrhizobiaceae e Hyphomicrobiaceae. No entanto, também foi verificada a presença das famílias Beijerinckiaceae, Methylocystaceae e Phyllobacteriaceae (Figure 10B). Vale também ressaltar o grande número de seqüências não afiliadas às diferentes ordens dentro da classe das α -proteobactérias e das seqüências não afiliadas às diferentes famílias dentro da ordem Rhizobiales demonstrando que este grupo bacteriano não possui todos seus componentes descritos e conhecidos até o momento.

A análise de rarefação realizada com as duas bibliotecas veio suprir dados sobre o número de filotipos bacterianos encontrados nestas bibliotecas. Utilizando diferentes níveis de similaridade para determinação dos filotipos foi possível verificar que apesar de estas bibliotecas possuírem curvas de rarefação bastante similares aos níveis de isolados (100%) e espécies (99 e 97%, variando de acordo com o grupo bacteriano), quando níveis menores de similaridade são considerados, como 95, 92 e 90%, pode ser observado que o número de gêneros, famílias e ordens é menor na biblioteca TR-15 do que na biblioteca WT17 (Figure 3.11).

Figura 3.10 - Análise dos clones do gene 16S DNAr das bibliotecas obtidas a partir de DNA do rizoplano de plantas não transgênicas (WT17) e transgênicas (TR-15) de eucalipto. As afiliações das seqüências são apresentadas nos níveis de ordens dentro da classe das α -proteobactéria (A) e de famílias dentro da ordem Rhizobiales (B). As seqüências foram classificadas de acordo com o *RDPQuery* junto ao *Ribosomal Data Project*

3.2.3 Discussão

Muitos artigos mostram a associação de comunidades bacterianas com o cultivo de plantas transgênicas por meio de isolamento e de técnicas independentes de cultivo. Estas técnicas moleculares baseiam-se principalmente na composição das seqüências de genes ribossomais (HEUER; SMALLA, 1999; BRUINSMA; KOWALCHUK; VAN VEEN, 2003; CASTALDINI et al., 2005; FANG et al., 2005). Entretanto, nenhum destes artigos considera o efeito do cultivo de árvores transgênicas, que ficam por período mais longo em campo, o que pode resultar em maiores efeitos na comunidade bacteriana devido ao seu maior tempo de permanência no campo. Neste capítulo são apresentados dados sobre este tema, onde duas plantas não transgênicas, de genótipos distintos (WT17 e WT18) são comparadas com quatro plantas transgênicas, com mesmo tipo de inserção, porém em eventos diferentes (TR-9, TR-15, TR-22 e TR-23), em relação a composição da comunidade bacteriana da rizosfera e do rizoplane. Neste estudo, não foi avaliada a comunidade bacteriana total associada a rizosfera e ao rizoplane de eucalipto, mas foi realizada a análise separadamente de grupos bacterianos que compõem estas comunidades.

Figura 3.11 - Rarefação das seqüências componentes das bibliotecas de DNA do rizoplane de plantas de eucalipto não transgênicas WT17 (A) e transgênicas TR-15 (B). Diferentes níveis de similaridade para determinação dos filotipos, indicando a análise para isolados (1.00), espécies (0.99 ou 0.97), gêneros (0.95), famílias (0.92) e ordens (0.90)

A realização do experimento em casa-de-vegetação, com as plantas sendo cultivadas em substrato ao invés de solo, permitiu o controle das variáveis ambientais, como temperatura, umidade, isolando como principal efeito de alterações nas comunidades bacterianas a alteração do genótipo das plantas cultivadas.

A partir das amostras obtidas das plantas foram utilizadas técnicas dependentes e independentes de cultivo para estudar grupos componentes da comunidade bacteriana, como α e β -proteobactérias, actinomicetos e um subgrupo da classe α -proteobactéria que inclui o gênero *Methylobacterium*. Os *primers* seletivos para estes grupos foram utilizados na análise independente de cultivo por terem representantes destes grupos compondo a comunidade bacteriana cultivável. Entre os isolados obtidos, foi possível verificar a ocorrência da ordem Rhizobiales representando as α -proteobactérias, Brukholderiales que é uma ordem dentro da classe das β -proteobactérias, além da ordem Actinomycetales e do gênero *Mycobacterium* que são actinomicetos. Adicionalmente, os grupos avaliados são comumente encontrados em associação com plantas, sendo observada correlação do nível populacional com a ocorrência de doenças (ARAUJO et al., 2002), respondendo a inoculação de bactérias endofíticas (ANDREOTE et al., 2006) ou descrevendo a comunidade bacteriana de solo (HEUER et al., 1997).

O isolamento seguido da caracterização dos isolados por ARDRA e sequenciamento do gene 16S DNAr de isolados representantes de cada haplótipo permitiu a identificação destes grupos bacterianos nas amostras. Apesar de não ser possível observar alterações significativas na comunidade bacteriana cultivável obtida das diferentes plantas. A técnica de ARDRA foi descrita na literatura em estudos de comunidades bacterianas associadas às árvores, onde as bactérias que colonizam diferentes órgãos de elmo foram caracterizadas e descritas utilizando esta técnica (MOCALI et al., 2003).

Methylobacterium é um gênero bacteriano caracterizado pela pigmentação rósea e por ser metilotrófico facultativo (PPFMs), que possuem a habilidade de metabolizar compostos com carbono único na molécula, como por exemplo, metanol. A literatura descreve *Methylobacterium* como um gênero de grande importância em interação com as plantas. Apesar deste gênero ser descrito em associação com diferentes espécies de plantas (ELBELTAGY et al., 2000; ARAUJO et al., 2001; SY et al., 2001b; ARAUJO et al., 2002; CERVANTES-MARTINEZ; LOPEZ-DIAZ; RODRIGUEZ-GARAY, 2004; OMER; TOMBOLINI; GERHARDSON, 2004; ANDREOTE et

al., 2006), os mecanismos que coordenam esta interação são pouco conhecidos. Dentre os possíveis mecanismos envolvidos é conhecido que espécies deste gênero são produtoras de moléculas *quorum sensing* (PENALVER et al., 2006; POONGUZHALI; MADHAIYAN; SA, 2007). Adicionalmente em estudo de proteoma de *M. extorquens*, foram identificadas proteínas expressas apenas quando esta bactéria encontra-se em contato com a planta (GOURION; ROSSIGNOL; VORHOLT, 2006).

No presente trabalho, a população cultivável de *Methylobacterium* spp. e a comunidade bacteriana formada por um subgrupo da classe α -proteobactéria foram estudados por isolamento e classificação e por DGGE e análise de bibliotecas de 16S DNAr, respectivamente, demonstrando que este grupo bacteriano, também tem a capacidade de responder a alterações no genótipo da planta hospedeira a que está associado.

Nas amostras de rizosfera, as colônias de *Methylobacterium* spp. não foram verificadas, enquanto que nas amostras de rizoplane os dados de isolamento demonstraram a presença destas colônias em todas os genótipos avaliados com exceção às plantas TR-15. Estes dados sugerem que esta espécie coloniza preferencialmente o rizoplane ao invés da rizosfera, respondendo a presença dos exsudados de raiz. Uma outra característica de espécies do gênero *Methylobacterium* que pode explicar a colonização preferencial da superfície de raízes é a capacidade destas bactérias em formar biofilmes. A diminuição da população de *Methylobacterium* spp. em rizoplane de plantas TR-15 pode ter sido causada por um efeito pleiotrópico da inserção do gene exógeno, que altera a fisiologia da planta, e pode conseqüentemente alterar a composição de exsudados de raiz. No entanto, como este efeito foi observado apenas nas plantas TR-15, a alteração direta devido a presença do gene exógeno não deve ocorrer, podendo ser sugerido que o local onde este gene foi inserido para obtenção das plantas TR-15 pode ter interferido a atividade de outros genes, resultando na alteração observada. A composição dos exsudados de raiz é um agente seletivo para composição de comunidades bacterianas no ambiente rizosférico (KOZDROJ; VAN ELSAS, 2000; BAUDOIN; BENIZRI; GUCKERT, 2003).

A identificação dos isolados de *Methylobacterium* spp. revelou pelo menos quatro espécies compondo a porção cultivável da população deste gênero; *M. nodulans*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum* e *M. radiotolerans*. Araújo et al. (2002) descreveram cinco espécies de *Methylobacterium* spp. compondo a comunidade bacteriana endofítica de citros; *M.*

mesophilicum, *M. radiotolerans*, *M. fujisawaense*, *M. extorquens* e *M. zatmanii*. Comparando os dados, três espécies foram similares, enquanto que *M. nodulans* não foi encontrada em citros e *M. zatmannii* e *M. extorquens* não foram verificadas colonizando o rizoplane de eucalipto. Isto demonstra que plantas diferentes podem possuir comunidades distintas de *Methylobacterium* spp., formada por diferentes espécies deste gênero.

Na análise independente de cultivo realizada neste capítulo, por meio da aplicação da técnica de PCR-DGGE algumas diferenças entre as comunidades bacterianas puderam ser observadas. Por meio da análise de componentes principais, realizada com base nos perfis de PCR-DGGE foi determinado que a população de α -proteobactéria responde a alteração do genótipo das plantas de eucalipto tanto na rizosfera quanto no rizoplane. As populações de β -proteobactéria e actinomicetos respondem apenas na rizosfera. A última análise feita com seleção pelo *primer* 2F respondeu de forma mais significativa no rizoplane, corroborando com a tendência de que as α -proteobactérias compreendem importantes grupos bacterianos associados à planta, e que, portanto, são mais afetadas pela alteração do genótipo da planta.

Para os perfis obtidos utilizando como seletivo o *primer* 2F as análises mostraram a separação das amostras de TR-15 das demais, além da separação das diferentes plantas não transgênicas, confirmando o efeito cultivar ou clone específica, para diferentes genótipos de plantas, que podem causar efeitos similares aos encontrados quando são comparados com os causados pelo cultivo de plantas transgênicas, fato anteriormente descrito na literatura (SICILIANO; GERMIDA, 1999). Os índices de diversidade de Shannon também foram calculados para as amostras do *primer* 2F a partir do perfil de DDGE, demonstrando uma menor diversidade para amostras de rizoplane de plantas TR-15 em relação as demais plantas. A combinação dos resultados dos dados de isolamento, de PCA e dos índices de diversidade indica que nestas plantas, a população de *Methylobacterium* spp. presente no ambiente rizosférico não responde colonizando a superfície das raízes destas plantas. A ausência deste grupo bacteriano nesta comunidade pode levar a diminuição da diversidade e a alteração no perfil de DGGE.

A análise mais detalhada dos grupos bacterianos componentes da comunidade bacteriana do rizoplane de eucalipto com genótipos WT17 e TR-15 foi realizada com a construção e seqüenciamento de duas bibliotecas grupo específicas do gene 16S DNAr. Neste ponto, é de grande importância destacar a diversidade bacteriana encontrada em amostras ambientais. O *primer* 2F utilizado como seletivo na construção das bibliotecas é descrito na literatura como

específico para *Methylobacterium* e *Rhodopseudomonas* (NISHIO; YOSHIKURA; ITOH, 1997), e em análise de BlastN esta sequência apresenta os primeiros alinhamentos no GenBank (ALTSCHUL et al., 1990) com sequências da ordem Rhizobiales. Após sequenciamento dos clones das bibliotecas utilizadas no presente estudo, ainda foi possível verificar a presença de sequências de outras ordens dentro da classe das α -proteobactérias. Considerando apenas as sequências afiliadas a ordem Rhizobiales, ainda foi possível verificar sequências afiliadas a seis diferentes famílias dentro desta ordem. Isto indica que o *primer* 2F é seletivo para determinado grupo bacteriano, mas não específico para os gêneros *Methylobacterium* e *Rhodopseudomonas* em amostras ambientais. Considerando o número de filotipos presentes nas bibliotecas utilizadas, a análise de rarefação demonstrou que o número de espécies nas amostras é similar, no entanto, quando grupos bacterianos são considerados, como gêneros, famílias ou ordens, a biblioteca TR-15 apresenta menor diversidade. Este dado mostra que a diminuição da diversidade encontrada no DGGE é devido a ausência de um grupo bacteriano e não de espécies nestas plantas.

No ambiente rizosférico de alta competição, quando um grupo bacteriano tem seu desenvolvimento inibido, pode ser considerado que dois eventos podem ocorrer: outro grupo não presente pode ocupar este nicho, ou um grupo já componente da comunidade pode aumentar sua densidade populacional. No caso deste trabalho, como a ausência de *Methylobacterium* spp. foi verificada nas mesmas amostras que apresentaram uma diminuição na diversidade da comunidade bacteriana, foi possível concluir que outro grupo bacteriano já presente ocupou o nicho previamente ocupado pela população de *Methylobacterium* spp. Recentemente foi descrita a teoria de comunidades neutras, para biofilmes microbianos, mostrando estas possíveis respostas de comunidades bacterianas para a ausência ou diminuição de determinadas populações no ambiente (BATTIN et al., 2007).

Este capítulo demonstra que o mesmo gene inserido na planta em eventos diferentes pode levar a efeitos pleiotrópicos que irão interferir no metabolismo vegetal e conseqüentemente na composição da comunidade bacteriana associada à planta. Adicionalmente, foi demonstrado que a alteração causada por diferentes genótipos de plantas não transgênicas pode ser maior do que as observadas quando plantas transgênicas são comparadas com genótipos convencionais. No entanto, podem ocorrer eventos de transformação que levam a inibição de grupos bacterianos específicos, com a inibição observada de *Methylobacterium* spp. e espécies relacionadas em

plantas TR-15. Desta maneira, torna-se necessária a avaliação de cada linhagem transgênica desenvolvida.

Referências

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, p. 169-173, 2004.
- ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAUJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.
- ARAUJO, W.L.; MACCHERONI, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.
- ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4906-4914, 2002.
- BATTIN, T.J.; SLOAN, W.T.; KJELLEBERG, S.; DAIMS, H.; HEAD, I.M.; CURTIS, T.P.; EBERL, L. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 76-81, 2007.
- BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 1183-1192, 2003.
- BRUINSMA, M.; KOWALCHUK, G.A.; VAN VEEN, J.A. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 37, p. 329-337, 2003.
- CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C. *et al.* Impact of Bt corn on rhizospheric and on beneficial mycorrhizal symbiosis and soil eubacterial communities in experimental microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 6719-6729, 2005.
- CERVANTES-MARTINEZ, J.; LOPEZ-DIAZ, S.; RODRIGUEZ-GARAY, B. Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var. azul by laser-induced fluorescence. **Plant Science**, Shannon, v. 166, p. 889-892, 2004.
- CHANPRAME, S.; TODD, J.J.; WIDHOLM, J.M. Prevention of pink-pigmented methylotrophic bacteria (*Methylobacterium mesophilicum*) contamination of plant tissue cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, p. 222-225, 1996.
- DUNFIELD, K.E.; GERMIDA, J.J. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 806-815, 2004.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SUZUKI, H.; SATO, T.; SATO, Y.I.; MORISAKI, H.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 46, p. 617-629, 2000.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p.175-185, 1998.

FANG, M.; KREMER, R.J.; MOTAVALLI, P.P.; DAVIS, G. Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 4132-4136, 2005.

GOMES, N.C.M.; HEUER, H.; SCHONFELD, J.; COSTA, R.; MENDONCA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, The Hague, v. 232, p. 167-180, 2001.

GONZALEZ, E.R.; DE ANDRADE, A.; BERTOLO, A.L.; LACERDA, G.C.; CARNEIRO, R.T.; DEFAVARI, V.A.P.; LABATE, M.T.V.; LABATE, C.A. Production of transgenic *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* using the sonication assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 29, p. 97-102, 2002.

GOURION, B.; ROSSIGNOL, M.; VORHOLT, J.A. A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 13186-13191, 2006.

GYAMFI, S.; PFEIFER, U.; STIERSCHNEIDER, M.; SESSITSCH, A. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 41, p. 181-190, 2002.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HEUER, H.; SMALLA, K. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 30, p. 49-61, 1997.

HEUER, H.; SMALLA, K. Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing transgenic variants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 357-371, 1999.

KOZDROJ, J.; VAN ELSAS, J.D. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1405-1417, 2000.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, London, v. 5, p. 150-163, 2004.

LOTTMANN, J.; HEUER, H.; SMALLA, K.; BERG, G. Influence of transgenic T4-lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant-associated bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 365-377, 1999.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SESHADRI, S.; CHUNG, H.Y.; YANG, J.C.; SUNDARAM, S.; SA, T.M. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Nankang, v. 45, p. 315-324, 2004.

MADHAIYAN, M.; REDDY, B.V.S.; ANANDHAM, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S.P.; SA, T.M. Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. **Current Microbiology**, New York, v. 53, p. 270-276, 2006.

MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, p. 808-811, 1990.

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

NISHIO, T.; YOSHIKURA, T.; ITOH, H. Detection of *Methylobacterium* species by 16S rRNA gene-targeted PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 1594-1597, 1997.

OMER, Z.S.; TOMBOLINI, R.; GERHARDSON, B. Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 47, p. 319-326, 2004.

PENALVER, C.G.N.; MORIN, D.; CANTET, F.; SAUREL, O.; MILON, A.; VORHOLT, J.A. *Methylobacterium extorquens* AM1 produces a novel type of acyl-homoserine lactone with a double unsaturated side chain under methylotrophic growth conditions. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 580, p. 561-567, 2006.

PIRTTILA, A.M.; LAUKKANEN, H.; POSPIECH, H.; MYLLYLA, R.; HOHTOLA, A. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3073-3077, 2000.

POONGUZHALI, S.; MADHAIYAN, M.; SA, T. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals is widespread in gram-negative *Methylobacterium*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 17, p. 226-233, 2007.

RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M.H.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, p. 219-235, 2006a.

RASCHE, F.; VELVIS, H.; ZACHOW, C.; BERG, G.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 43, p. 555-566, 2006b.

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

SICILIANO, S.D.; GERMIDA, J.J. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 263-272, 1999.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P. *et al.* Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 183, p. 214-220, 2001a.

SY, A.; GIRAUD, E.; SAMBA, R.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M.; DREYFUS, B. Certain legumes of the genus *Crotalaria* are specifically nodulated by a new species of *Methylobacterium*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 503-508, 2001b.

4 EFEITO DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS NA COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA DA RAIZ E ENDOFÍTICA DE *Solanum tuberosum* E NO METABOLISMO DA PLANTA HOSPEDEIRA

Resumo

As bactérias podem se associar às plantas de diversas maneiras, colonizando apenas o ambiente rizosférico ou a planta internamente, tornando-se desta maneira endófitos. O processo de reconhecimento e colonização das plantas pode levar a alterações em futuras interações com outras bactérias ou alterar o metabolismo da planta hospedeira. Neste capítulo é dado enfoque ao efeito da inoculação de três linhagens endofíticas *Pseudomonas putida* (P9), *Paenibacillus* sp.(E119) e *Methylobacterium mesophilicum* (SR1.6/6) na composição das comunidades bacterianas associadas à raiz e endofítica do caule de plantas de batata de três cultivares (Eersteling, Robijn e Karnico). Posteriormente a resposta metabólica destas plantas também foi avaliada em resposta a inoculação da linhagem P9. Os resultados mostraram a colonização das plantas pelas três linhagens avaliadas, sendo que P9 revelou maiores níveis populacionais associados às plantas do que os demais. As análises dos perfis de PCR-DGGE demonstraram os efeitos do tempo de cultivo, das diferentes cultivares e da inoculação de bactérias na composição das comunidades bacterianas avaliadas. A linhagem E119 alterou a comunidade bacteriana da raiz de plantas da cultivar Robijn, enquanto que a linhagem P9 mostrou alterar a composição das comunidades bacterianas avaliadas, com efeitos similares ao observado quando comparadas diferentes cultivares. Em relação ao metabolismo da planta hospedeira foi possível observar que um pequeno número de metabólitos (menos de 1%) responde a colonização da planta pela linhagem endofítica P9, o que mostra que apesar de causar poucas respostas na planta hospedeira, a colonização por bactérias endofíticas pode resultar em alterações na composição das comunidades bacterianas a estas associadas.

Palavras-chave: *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Methylobacterium*, Metabolismo vegetal, DGGE

EFFECTS OF BACTERIA INOCULATION IN THE COMPOSITION OF BACTERIAL COMMUNITIES IN ROOTS AND ENDOPHYTIC OF *Solanum tuberosum* AND IN THE HOST PLANT METABOLISM

Abstract

Bacteria might associate with plants in different ways, colonizing or only the rhizosphere or inner tissues of plants, as endophytes. The recognition and colonization process may lead to shifts in the further interactions with other bacteria species or change the host plant metabolism. In this chapter it is focused the effects of inoculation by three endophytic lineages *Pseudomonas putida* (P9), *Paenibacillus* sp.(E119) e *Methylobacterium mesophilicum* (SR1.6/6) in the composition of bacterial communities colonizing roots or endophytes from stems of three cultivars of potato plants (Eersteling, Robijn e Karnico). In addition, the metabolic profiling of plants in response to P9 strain inoculation was evaluated. Results revealed that colonization by the three inoculated strains, where P9 demonstrated to have higher population densities than others strains. PCR-DGGE analyses show the effects of cultivation time, cultivar effects and the shifts in bacterial communities due to inoculation of bacteria on plants. Strain E119 changed the bacterial community in roots of Robijn plants, while P9 causes shifts in all bacterial community assessed, with similar effects to those observed when different cultivars are compared. Considering the metabolism of host plant, it was possible to determine that a low number of metabolites (less than 1%) is responsive to the plant colonization by endophytic bacteria P9, indicating that, even with low metabolic regulation in the host plant, the endophytic colonization may result in shifts in the bacterial community with plants associated.

Key-words: *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Methylobacterium*, Plant metabolism, DGGE

4.1 Introdução

*"A vida se contrai e se expande proporcionalmente à
coragem do indivíduo."*

Anaïs Nin

A comunidade bacteriana associada às plantas é caracterizada quali e quantitativamente pelas espécies que as compõem. Fatores bióticos e abióticos podem influenciar o comportamento destas espécies, atuando de forma determinante na composição destas comunidades (KOZDROJ; VAN ELSAS, 2000; MARSCHNER; BAUMANN, 2003). Dentre estes fatores pode ser destacado o genótipo da planta e a inoculação de bactérias nestas comunidades. As alterações causadas nas comunidades bacterianas podem ser devido ao cultivo de plantas de diferentes espécies (SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004), diferentes cultivares e variedades (DUNFIELD; GERMIDA, 2004; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004) ou de plantas transgênicas (HEUER et al., 2002; RUI et al., 2005; RASCHE et al., 2006).

Considerando o efeito de inoculação de bactérias na composição de comunidades bacterianas, é observado que algumas bactérias quando inoculadas em plantas, apresentam a capacidade de sobreviver neste ambiente, colonizando ativamente a planta (ANDREOTE et al., 2004; ANDREOTE et al., 2006; KHAN; ZAIDI; WANI, 2007), compondo a comunidade bacteriana associada e também causando alterações nesta comunidade (ANDREOTE et al., 2006), que se adapta à presença deste novo componente.

A interação entre plantas e bactérias ocorre após um mútuo reconhecimento das espécies envolvidas. Esta interação envolve mecanismos moleculares sensíveis que são capazes de reconhecer espécies bacterianas, diferenciando organismos patogênicos daqueles que colonizam as plantas de forma benéfica ou neutra (BRENCIC; WINANS, 2005; GARG; GEETANJALI, 2007). Este processo de reconhecimento e posterior estabelecimento da interação entre plantas e bactérias resulta em diversos efeitos sobre o hospedeiro, dentre os quais se destaca a ocorrência da ativação do sistema de defesa da planta, levando à indução de resistência sistêmica (ISR) (DURRANT; DONG, 2004; MADHAIYAN et al., 2004; SCHUHEGGER et al., 2006). Pode também ocorrer a colonização da planta sem que haja alteração desta característica, de maneira endofítica, onde a bactéria penetra e habita os tecidos internos da planta sem causar alterações

nas características da planta hospedeira (HALLMANN et al., 1997; ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006).

As respostas transcricionais de plantas de *Arabidopsis thaliana* à presença de bactérias endofíticas ou inoculadas com bactérias indutoras de resistência são descritas na literatura. Os trabalhos mostram que, tanto a presença de bactérias indutoras de resistência (VERHAGEN et al., 2004) como a colonização destas plantas por bactérias endofíticas (WANG et al., 2005) levam à alteração da expressão de um pequeno número de genes na planta hospedeira. No entanto, no caso de plantas inoculadas com bactérias que induzem ISR, estas apresentam uma resposta mais rápida à inoculação posterior de patógenos, quando comparada às plantas controle (VERHAGEN et al., 2004).

Devido a estas pequenas alterações transcricionais encontradas em plantas inoculadas com bactérias ativas na planta, é sugerido que a alteração que o hospedeiro apresenta devido a presença destas bactérias seja pequena ou então, regulada em nível pós-transcricional, como por exemplo, no nível de metabólitos. Desta maneira, o perfil metabólico de plantas inoculadas por bactérias deve ser avaliado a fim de estabelecer a interação entre o acúmulo ou decréscimo na concentração de determinados metabólitos com a presença da bactéria endofítica. Os perfis metabólicos de diversas espécies de plantas têm mostrado a resposta a diferentes fatores no perfil metabólico das plantas (FIEHN, 2002; BINO et al., 2004). Dentre os trabalhos descritos, os metabólitos envolvidos na resposta metabólica de plantas a estímulos ambientais, como plantas de *A. thaliana* respondendo ao estresse salino (KIM et al., 2007) e à presença de césio (LE LAY et al., 2006), além de estresse por temperatura (KAPLAN et al., 2004) tem sido avaliados. Adicionalmente, utilizando a cromatografia líquida, acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) foram determinados os principais metabólitos componentes da casca e da polpa de frutos de tomate (MOCO et al., 2006). No entanto, esta técnica não foi ainda utilizada no estudo do metabolismo da planta respondendo a inoculação de bactérias.

Dessa forma, o objetivo deste capítulo foi acessar as alterações causadas nas comunidades bacterianas da raiz e endofíticas de caule de plantas de batata de diferentes cultivares, avaliando o efeito da inoculação de três diferentes espécies bacterianas (*Pseudomonas putida*, *Methylobacterium mesophilicum* e *Paenibacillus* sp.) na composição destas comunidades. Além disso, foi possível descrever alterações no perfil metabólico de plantas de batata inoculadas com *P. putida* por meio da técnica de LC-MS.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

4.2.1.1 Linhagens bacterianas utilizadas e obtenção de mutantes resistentes à rifampicina

Para inoculação de plantas de batata foram selecionadas três linhagens bacterianas endofíticas; *Pseudomonas putida* P9, *Paenibacillus* sp. E119 e *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6. As linhagens de *P. putida* e *Paenibacillus* sp. foram obtidas do laboratório de ecologia microbiana pertencente ao grupo *Biointeractions and Plant Health* do Plant Research International (Wageningen, Holanda) enquanto que a linhagem de *M. mesophilicum* foi obtida da coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos (ESALQ/USP). As linhagens P9 e E119 foram originalmente isoladas da comunidade bacteriana associada à plantas de batata, enquanto que SR1.6/6 foi isolada como endófitica de plantas de citros (ARAUJO et al., 2002).

A inoculação das plantas foi realizada com mutantes espontâneos derivados destas linhagens, resistentes à rifampicina. Para obtenção destes mutantes as linhagens foram cultivadas em 10 mL de meio líquido TSB (OXOID, EUA) até a fase estacionária (concentração de aproximadamente 10^9 UFC.mL⁻¹), as células foram precipitadas e ressuspendidas em 100 µL de água destilada esterilizada e semeadas em meio de cultivo sólido R2A suplementado com rifampicina (50 µg.mL⁻¹). As placas foram incubadas à 28°C e o desenvolvimento de colônias mutantes foi monitorado por 5 dias. As colônias obtidas deram origem aos mutantes P9^{rp}, E119^{rp} e SR1.6/6^{rp}, que foram comparados com as linhagens originais por meio da técnica de BOX-PCR. A estabilidade dos mutantes foi avaliada por cultivo dos mutantes e das linhagens originais em meio de cultivo sem pressão de seleção e posterior avaliação da população obtida em meio com o antibiótico.

4.2.1.2 BOX-PCR

Para verificar a afiliação dos mutantes as respectivas linhagens inicialmente selecionadas para os experimentos, além da similaridade morfológica das colônias, foram também determinados os perfis de BOX-PCR, comparando-se as linhagens originais e seus mutantes. Para

isto, uma PCR de colônia foi realizada contendo o *primer* BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG -3') (LOUWS; RADEMAKER; DE BRUIJN, 1999). A amplificação foi realizada de acordo com o descrito pelos autores, e a observação dos *fingerprintings* foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% (w/v) com voltagem de 3 V.cm⁻¹, posterior coloração com brometo de etídeo e visualização em luz ultra-violeta.

4.2.1.3 Inoculação de bactérias

Para inoculação, os mutantes *rp* foram cultivados em meio de cultura líquido, e as suspensões celulares na concentração de 10⁶ UFC.mL⁻¹ foram inoculadas por imersão dos sistemas radiculares das plantas. As plântulas, obtidas por meio de cultivo *in vitro*, de aproximadamente 5 cm de altura tiveram seus sistemas radiculares submersos em suspensões celulares das linhagens utilizadas durante 1 h. Após este período estas plantas foram diretamente transplantadas para vasos em casa-de-vegetação.

4.2.1.4 Cultivares de batata utilizados e cultivo das plantas

Nos experimentos foram utilizados três diferentes cultivares de batata: Eersteling, Robijn e Karnico, que apresentam diferentes características de desenvolvimento e de resistência à doenças (Tabela 4.1).

O cultivo das plantas foi realizado em duas etapas distintas. Na primeira etapa as plântulas utilizadas na inoculação foram obtidas por meio de cultivo das sementes desinfectadas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Estas plântulas se desenvolveram em câmara de crescimento com temperatura variando entre 25 e 28°C e fotoperíodo de 16 h. Após a inoculação as plântulas foram transplantadas para casa-de-vegetação, onde foram cultivadas em potes contendo substrato e suplementadas com água diariamente até o período de avaliação. Nos primeiros dias após a inoculação estas plantas foram cultivadas sob proteção de plástico para manter o ambiente úmido. Após cinco dias da inoculação esta proteção foi removida e as plantas foram cultivadas em temperatura variando entre 20 e 25°C, com fotoperíodo de 12 h.

Tabela 4.1 - Características das cultivares de batata (*S. tuberosum*) utilizadas no experimento de inoculação com as espécies bacterianas

	Eersteling	Robijn	Karnico
<i>Origem</i>	Holanda	Holanda	Holanda
<i>Pedigree</i>	Mutante de <i>Duke of York</i>	<i>Rode Star</i> x <i>Preferent</i>	<i>Astarte</i> x <i>SVP AM 66 42</i>
<i>Maturidade</i>	Precoce	Muito tardia	Tardia
<i>Utilização</i>	Alimentação	Amido e alimentação	Matéria seca e amido
<i>Resistência a doenças</i>	Baixa	Baixa	Alta

Fontes: www.davesgarden.com, www.europotato.org e <http://www.dpw.wau.nl/>

4.2.1.5 Isolamento da comunidade bacteriana

Para o isolamento foram selecionadas amostras que continham a comunidade bacteriana total da raiz e endofítica de caule. Para isto, após um e dois meses de cultivo das plantas inoculadas, quatro plantas (repetições biológicas) de cada um dos tratamentos dentro das três cultivares foram avaliadas. As plantas foram removidas dos vasos e as amostras coletadas. O sistema radicular sem substrato aderido foi considerado como a amostra de raiz e fragmentos de caule com aproximadamente 3 cm foram selecionados para compor as amostras da comunidade endofítica de caule. Estas últimas foram esterilizadas superficialmente (1 min etanol 70%, 3 min hipoclorito de sódio 2%, e duas lavagens em água destilada esterilizada) para análises posteriores.

As amostras tiveram seus respectivos pesos determinados e foram maceradas em 3 mL de água destilada esterilizada. A partir desta suspensão foram coletadas amostras para extração de DNA e para isolamento da comunidade bacteriana. Para o isolamento, diluições apropriadas desta suspensão inicial foram semeadas em meio de cultivo não seletivo (TSB5% suplementado com 0,1% de glicose) e seletivo (TSB5% suplementado com 0,1% de glicose e 50 µg.mL⁻¹ de rifampicina), a fim de isolar a comunidade bacteriana total e da linhagem inoculada nas plantas, respectivamente. As placas foram incubadas a 28°C durante 15 dias, sendo monitoradas a cada três dias por meio de contagem do número de colônias obtidas em cada placa.

4.2.1.6 Extração de DNA das amostras de raiz e caule

Os DNAs das amostras de raiz e caule foram extraídos a partir de 0,5 mL do extrato obtido da maceração das amostras. Esta suspensão foi utilizada para extração com o kit *DNeasy Plant Mini for DNA Isolation* (Qiagen, Alemanha) usando o protocolo fornecido pelo fabricante. A extração e a integridade do DNA foram verificadas em gel de agarose 1% (w/v) em tampão TBE 0.5X, posteriormente corado com brometo de etídeo e observado em luz ultra-violeta.

4.2.1.7 PCR e eletroforese em gradiente desnaturante (PCR-DGGE)

O perfil da composição total da comunidade bacteriana (cultiváveis e não cultiváveis) encontrada nas amostras de raiz e caule de plantas das diferentes cultivares de batata foram determinadas por meio da aplicação da técnica de PCR-DGGE. Foram avaliadas tais comunidades por meio da aplicação de *primers* universais além dos *primers* grupo específicos para *Pseudomonas* spp. (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004), *Paenibacillus* spp. (DA SILVA et al., 2003) e α -proteobactérias (GOMES et al., 2001).

Primeiramente uma PCR taxon específica foi realizada contendo 1 μ L da amostra de DNA extraído (5-10ng) em 30 ciclos de amplificação com os *primers* seletivos para os grupos. Os produtos de amplificação das reações grupo específicas foram utilizados para a amplificação do fragmento do gene 16S DNAr utilizado no gel de DGGE, realizada com os *primers* U968-GC e R1387 (HEUER et al., 1997), resultando em um *amplicon* de aproximadamente 430 pb. Os ciclos para amplificação foram: desnaturação inicial de 5 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C, 2 min a 72°C, e uma extensão final de 10 min a 72°C. Os produtos da PCR foram avaliados em gel de agarose 1,0% seguido de coloração em brometo de etídeo e observação em luz ultra-violeta.

A análise em DGGE foi realizada no aparelho *PhorU2 system* (Ingeny, Goes, Holanda), com gradiente desnaturante variando de 45 a 65% de desnaturação, onde 100% de desnaturação consiste na concentração de 7 M de uréia e 40% de formamida. Os géis foram submetidos a eletroforese por 16 h a 100 V. Após a eletroforese o gel foi corado com SYBR Green I e fotodocumentado em luz ultra-violeta.

4.2.1.8 Análise das imagens dos géis de PCR-DGGE

Os perfis de DGGE obtidos foram analisados e comparados no programa GelCompar II (Applied Maths, Bélgica), onde os perfis foram alinhados de acordo com um padrão externo, permitindo o alinhamento e a análise conjunta de diferentes géis. As bandas foram identificadas qualitativa e quantitativamente em relação às áreas relativas ao total de áreas da amostra. Esta quantificação relativa permitiu a normalização das amostras em relação a coloração diferencial posterior comparação entre as amostras.

4.2.1.9 Análise de correlação entre a intensidade relativa de bandas e a densidade da população de *Pseudomonas*

Para analisar a correlação linear de áreas relativas de bandas com densidades populacionais de P9^{TP} nas amostras avaliadas, os valores obtidos para a banda referente a linhagem, a partir das leituras dos perfis de DGGE, foram correlacionados com as densidades populacionais desta linhagem observadas por meio de isolamentos. Foram utilizados dados de comunidades bacterianas da raiz e endofíticas, comparadas com os valores de bandas obtidos com a aplicação dos *primers* universais ou específicos para o gênero *Pseudomonas*. Os valores de R^2 da regressão linear refletem a correlação existente entre as variáveis, sendo a partir destes índices, utilizadas as matrizes qualitativas ou quantitativas geradas no programa GelCompar II para a análise correlações canônicas (CCA).

4.2.1.10 Correlação dos perfis de PCR-DGGE com as variáveis ambientais

O perfil de bandas obtido foi correlacionado com os dados ambientais pela análise de correspondência canônica (CCA), realizada no *software* Canoco (Canoco 4.5, Biometris, Wageningen, Holanda). As bandas observadas nos géis de DGGE foram consideradas como espécies e suas intensidades relativas consideradas como frequência destas espécies.

Como fatores ambientais foram consideradas as variáveis: período de cultivo das plantas após inoculação (um e dois meses), as cultivares avaliadas e a inoculação das três diferentes linhagens (P9^{TP}, E119^{TP} e SR1.6/6^{TP}). Na análise das populações de *Pseudomonas* apenas a

inoculação de P9^{TP} foi considerada em relação à inoculação de bactérias. O teste estatístico de permutação de Monte Carlo foi aplicado considerando 499 permutações aleatórias, permitindo avaliar a significância (valor p), dos fatores ambientais na distribuição de espécies nas amostras. Como fatores ambientais foram consideradas as variáveis cultivares e inoculação das espécies bacterianas. Na CCA também foram obtidos os valores de λ_1 e λ_A , que mostram as porcentagens de variância que podem ser explicadas pelos fatores ambientais, de forma independente ou quando adicionadas às análises de permutação, respectivamente.

4.2.1.11 Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS)

As análises de LC-MS foram realizadas em colaboração com o grupo de pesquisa *Biosciences* (PRI, Wageningen, Holanda). Foram utilizadas amostras de caule e folhas de plantas das diferentes cultivares de batata após dois meses da inoculação com a linhagem P9. As amostras de caule foram compostas de segmentos de aproximadamente 3 cm da base do caule previamente tratada para esterilização superficial (1 min etanol 70%, 3 min hipoclorito de sódio 2%, e duas lavagens em água destilada esterilizada). As amostras de folhas foram compostas da segunda e terceira folhas verdadeiras das plantas avaliadas. Após coleta e tratamento das amostras estas foram estocadas em congelador a -80°C anteriormente à análise.

A obtenção dos metabólitos foi feita por maceração das amostras em nitrogênio líquido e posterior extração em metanol 75%, permitindo a posterior separação por fase reversa em cromatografia líquida e detecção por espectrometria de massa dos metabólitos semi-polares (MOCO et al., 2006). A detecção dos metabólitos foi feita por espectrometria de massa (MS) utilizando o equipamento *QTOF Ultima V4.00.00 mass spectrometer* (Waters-Corporation, MS technologies) como descrito anteriormente (MOCO et al., 2006).

Para testar a reprodutibilidade do sistema de cromatografia líquida uma das amostras foi injetada por três vezes no equipamento. Posteriormente, cada amostra gerou desta maneira um cromatograma contendo os picos e intensidade detectada, variando de acordo com o tempo de retenção e a massa da molécula detectada.

4.2.1.12 Análise dos dados de LC-MS

Os cromatogramas gerados foram alinhados com auxílio do programa MetAlign (BINO et al., 2004). Primeiramente as repetições da mesma amostra foram comparadas para avaliar a reprodutibilidade do equipamento. Em relação as amostras, após o alinhamento dos cromatogramas, uma tabela contendo a intensidade dos sinais em cada uma das respectivas amostras foi gerada e exportada para análise.

A partir desta tabela foram calculadas as médias das quatro repetições biológicas de cada tratamento para verificação da distribuição dos dados. Para seleção dos picos diferenciais foram determinados como parâmetros: *i*) alteração na intensidade do pico de pelo menos 5 vezes (aumento ou diminuição) em plantas inoculadas; *ii*) teste F com valor de $p < 0.001$; *iii*) verificação da alteração em pelo menos três das quatro repetições biológicas. Os picos selecionados de acordo com estes parâmetros foram então analisados cromatograficamente com auxílio do programa GeneMaths (Applied Maths, Bélgica).

4.2.2 Resultados

4.2.2.1 Obtenção dos mutantes resistentes à rifampicina

A obtenção de mutantes espontâneos foi possível com a inoculação das linhagens em meio de cultura suplementado com rifampicina ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$). Além da similaridade dos perfis morfológicos das colônias, a comparação por perfis de BOX-PCR dos mutantes com as linhagens originais confirmou a afiliação dos mutantes para posterior utilização (Figura 4.1).

4.2.2.2 Colonização das plantas pelas espécies bacterianas avaliadas

A colonização de plantas das diferentes cultivares de batata demonstrou o comportamento ecológico de cada uma das linhagens na colonização das plantas de batata. A densidade das comunidades bacterianas cultiváveis totais presentes nas amostras não variou entre as cultivares ou entre as plantas controle e inoculadas (Tabelas 4.2 e 4.3). Considerando as populações das linhagens inoculadas é possível descrever como resultado geral, a observação de populações

maiores em raiz do que endofíticas em caule (Tabelas 4.2 e 4.3). Dentre as amostragens realizadas após diferentes períodos, a densidade bacteriana foi maior em plantas com um mês de cultivo, quando comparadas às plantas com dois meses de cultivo. Considerando o potencial de diferentes bactérias na colonização, foi observado $P9^{rp} > SR1.6/6^{rp} > E119^{rp}$ (Tabela 4.2 e 4.3).

A análise de colonização utilizando diversas cultivares permitiu a observação de padrões de colonização cultivar específicos. Estes efeitos foram menores para a colonização das raízes (Tabela 4.2), porém evidenciados na avaliação da colonização endofítica das diferentes cultivares (Tabela 4.3). Nesta análise é possível observar que plantas da cultivar Karnico, apesar de apresentarem a mesma ordem de desempenho das linhagens avaliadas, são colonizadas por estas com densidades populacionais muito menores. Considerando o isolamento realizado após um mês do cultivo, foi observado que a população de $P9^{rp}$ foi 3,47 e 3,87 UFC.g⁻¹ de caule (valores em log), enquanto a de $SR1.6/6^{rp}$ foi de 2,34 e 1,82, nas cultivares Eersteling e Robijn, respectivamente (Tabela 4.3). Se estas mesmas populações forem acessadas em plantas da cultivar Karnico, os valores observados são de 2,09 e 0,86, para $P9^{rp}$ e $SR1.6/6^{rp}$, respectivamente, indicando o decréscimo de ao menos uma casa logarítmica. Para $E119^{rp}$ este efeito cultivar específico não é observado apresentando valores de 0,22, 0,66 e 0,59 para as cultivares Eersteling, Robijn e Karnico, respectivamente.

Figura 4.1 - Perfil de BOX-PCR dos mutantes resistentes à rifampicina. No gel de agarose são apresentados além dos marcadores de fragmento de DNA (M), os perfis de BOX-PCR das linhagens P9, E119 e SR1.6/6 e seus respectivos mutantes $P9^{rp}$, $E119^{rp}$ e $SR1.6/6^{rp}$

Tabela 4.2 -

Densidade da comunidade bacteriana cultivável da raiz de plantas de batata. Os dados apresentados são referentes a comunidade total e da população das linhagens inoculadas nas diferentes cultivares de batata, nos períodos de um e dois meses após inoculação. Os valores indicam a média, em Log10, de quatro repetições, seguidos dos valores de desvio padrão obtido das repetições

Cultivares	Tratamento	Comunidade Total			Comunidade da Bactéria Inoculada		
		1 mês após inoculação	2 meses após inoculação	2 meses após inoculação	1 mês após inoculação	2 meses após inoculação	2 meses após inoculação
Eersteling	Controle	7,83 ± 0,10	7,12 ± 0,19	0,00	0,00	0,00	
	P9 ^{rp}	7,89 ± 0,25	7,06 ± 0,52	4,45 ± 0,46	4,07 ± 0,14		
	E119 ^{rp}	7,93 ± 0,24	6,77 ± 0,15	1,59 ± 1,09	2,97 ± 0,22		
	SR1.6/6 ^{rp}	7,71 ± 0,44	7,11 ± 0,35	4,06 ± 0,17	3,76 ± 0,56		
Robijn	Controle	7,51 ± 0,31	7,06 ± 0,28	0,00	0,00		
	P9 ^{rp}	7,75 ± 0,07	7,33 ± 0,60	4,46 ± 0,44	4,38 ± 0,14		
	E119 ^{rp}	7,90 ± 0,19	6,79 ± 0,16	2,48 ± 0,75	2,59 ± 0,58		
	SR1.6/6 ^{rp}	7,96 ± 0,21	7,08 ± 0,29	3,88 ± 0,13	4,13 ± 0,46		
Karmico	Controle	8,19 ± 0,40	7,27 ± 0,49	0,00	0,00		
	P9 ^{rp}	8,11 ± 0,30	6,86 ± 0,21	4,99 ± 0,66	4,22 ± 0,54		
	E119 ^{rp}	7,90 ± 0,25	6,89 ± 0,39	3,45 ± 0,34	2,04 ± 1,40		
	SR1.6/6 ^{rp}	7,94 ± 0,21	7,12 ± 0,52	4,40 ± 0,18	4,01 ± 0,20		

Tabela 4.3 - Densidade da comunidade bacteriana cultivável endofítica de caule de plantas de batata. Os dados apresentados são referentes a comunidade total e da população das linhagens inoculadas nas diferentes cultivares de batata, nos períodos de um e dois meses após inoculação. Os valores indicam a média, em Log10, de quatro repetições, seguidos dos valores de desvio padrão obtido das repetições

Cultivares	Tratamento	Comunidade Total			Comunidade da Bactéria Inoculada	
		1 mês após inoculação	2 meses após inoculação	2 meses após inoculação	1 mês após inoculação	2 meses após inoculação
Eersteling	Controle	6,03 ± 0,35	3,90 ± 0,52	0,00	0,00	0,00
	P9 ^p	6,81 ± 0,37	4,96 ± 1,35	3,47 ± 1,00	2,58 ± 2,26	
	E119 ^p	5,08 ± 0,23	4,30 ± 0,14	0,22 ± 0,27	0,33 ± 0,66	
	SR1.6/6 ^p	5,97 ± 0,60	4,52 ± 0,46	2,34 ± 0,46	1,11 ± 0,65	
Robijn	Controle	6,88 ± 0,06	5,29 ± 0,91	0,00	0,00	
	P9 ^p	7,14 ± 0,19	4,97 ± 0,88	3,87 ± 0,72	2,06 ± 1,95	
	E119 ^p	5,38 ± 1,28	4,86 ± 0,24	0,66 ± 0,58	1,34 ± 0,91	
	SR1.6/6 ^p	4,84 ± 0,59	4,67 ± 0,92	1,82 ± 0,67	0,95 ± 1,00	
Karnico	Controle	5,37 ± 0,75	5,13 ± 0,70	0,00	0,00	
	P9 ^p	5,75 ± 1,39	4,96 ± 0,84	2,09 ± 0,47	0,77 ± 0,89	
	E119 ^p	4,93 ± 0,54	4,93 ± 1,22	0,59 ± 0,79	1,97 ± 1,61	
	SR1.6/6 ^p	4,99 ± 1,21	4,37 ± 1,62	0,86 ± 0,85	0,68 ± 0,82	

4.2.2.3 Alterações nos perfis de PCR-DGGE

As comunidades bacterianas que colonizam o sistema radicular de plantas de batata e aquelas que penetram a planta hospedeira e colonizam endofiticamente o hospedeiro foram avaliadas por meio da aplicação da técnica independente de cultivo PCR-DGGE. Para esta análise foram utilizados *primers* universais, e também *primers* específicos para os grupos bacterianos correspondentes a filogenia das linhagens avaliadas: *Pseudomonas*, *Paenibacillus* e α -proteobactérias.

Foi possível verificar, a partir dos perfis de DGGE, as diferenças na comunidade bacteriana associadas às cultivares avaliadas. Em relação as comunidades bacterianas da raiz é possível observar que cada cultivar apresenta uma comunidade bacteriana única, que se separam no agrupamento. Adicionalmente, o efeito do período de cultivo, verificado por meio de dois isolamentos leva a menor alteração destas comunidades do que o fato da utilização de plantas de diferentes cultivares (Figura 4.2). Da mesma maneira, quando as comunidades endofíticas destas cultivares são avaliadas, utilizando *primers* universais foi observada semelhança entre as cultivares Eersteling e Robijn, as quais são distintas daquela observada para a cultivar Karnico (Figura 4.3A). Em relação às comunidades de α -proteobactérias, a comunidade associada a cultivar Eersteling é diferente da observada em associação com as cultivares Robijn e Karnico (Figura 4.3C). Já para a comunidade de *Paenibacillus*, diferenças não são observadas entre as cultivares (Figura 4.3B). Estas observações sustentam a utilização de diferentes cultivares para avaliar o efeito da inoculação das espécies bacterianas em plantas de batata que possuem diferenças estruturais nas comunidades bacterianas associadas.

Para descrever o efeito da inoculação das linhagens, primeiramente serão apresentados os dados referentes a SR1.6/6^{TP} e E119^{TP}, e posteriormente será dado enfoque ao efeito de P9^{TP} nos perfis de DGGE das comunidades de raiz e endofíticas de caule de plantas de batata das ultivares Eersteling, Robijn e Karnico.

Figura 4.2 -

Agrupamento por similaridade dos perfis de DGGE obtidos de amostras de raiz das diferentes cultivares de batata. Além da comunidade bacteriana total (A), também foram acessadas separadamente as populações de *Paenibacillus* spp. (B) e α -proteobactérias (C). O agrupamento foi determinado baseado na correlação de Pearson que considera as curvas densitométricas de cada amostra na análise de similaridade. As barras indicam o desvio padrão no agrupamento e os valores nos ramos indicam a correlação cofenética das amostras

Figura 4.3 -

Agrupamento por similaridade dos perfis de DGGE obtidos de amostras de endofíticos de caule das diferentes cultivares de batata. Além da comunidade bacteriana total (A), também foram acessadas separadamente as populações de *Paenibacillus* spp. (B) e α -proteobactérias (C). O agrupamento foi determinado baseado na correlação de Pearson que considera as curvas densitométricas de cada amostra na análise de similaridade. As barras indicam o desvio padrão no agrupamento e os valores nos ramos indicam a correlação cofenética das amostras

Apesar de ter sido reisolada de todas as amostras avaliadas, a linhagem SR1.6/6^{TP} causou poucas alterações nos perfis das comunidades bacterianas da raiz e endofíticas de caule das plantas avaliadas. Adicionalmente, a banda referente a SR1.6/6^{TP} não foi verificada nos perfis de DGGE utilizando *primers* universais ou específicos para a classe α -proteobactéria. Considerando a mesma análise para E119^{TP}, quando os perfis de DGGE foram obtidos com aplicação de *primers* específicos para o gênero *Paenibacillus*, foi possível verificar o efeito cultivar específico na comunidade deste gênero associada às raízes de plantas da cultivar Robijn. Apesar da ausência das bandas referentes a esta linhagem nos perfis de DGGE, na amostragem após um mês de cultivo das plantas inoculadas, é possível se verificar a presença de uma banda nas plantas inoculadas que é ausente em plantas controle (Figura 4.4). No entanto, este efeito além de cultivar específico é também temporal, uma vez que esta banda não é observada em perfis de plantas controle ou inoculadas amostradas após dois meses de cultivo das plantas.

Figura 4.4 - Agrupamento por similaridade dos perfis de DGGE obtidos de amostras de raiz de plantas da cultivar Robijn. Os perfis foram obtidos por meio de amplificação com *primer* específico para *Paenibacillus* spp nas amostragens realizadas após um (A) e dois (B) meses após inoculação. O agrupamento foi determinado baseado na correlação de Pearson que considera as curvas densitométricas de cada amostra na análise de similaridade. As barras indicam o desvio padrão no agrupamento e os valores nos ramos indicam a correlação cofenética das amostras. A seta indica a banda presente exclusivamente em amostras de plantas inoculadas com E119^{TP} (*Paenibacillus* sp.)

Dentre as linhagens avaliadas, P9^{TP} colonizou as plantas em maior densidade e resultou em maiores alterações nos perfis das comunidades bacterianas associadas. A presença desta bactéria foi verificada por meio da técnica de DGGE em todas as amostras de raízes avaliadas e na maioria das amostras da comunidade endofítica de caule das três cultivares (Figuras 4.5, 4.6 e 4.7) por meio da análise dos perfis com *primers* universais e com *primers* específicos para o gênero *Pseudomonas*.

Figura 4.5 -

Agrupamento por similaridade dos perfis de DGGE obtidos de amostras da cultivar Eersteling comparando plantas controle com as inoculadas com P9^{TP} (*Pseudomonas putida*). Os perfis foram obtidos de amostras de raiz e endofíticas de caule por meio de amplificação com *primer* universal e específico para *Pseudomonas* spp. nas amostragens realizadas após um e dois meses após inoculação. O agrupamento foi determinado por correlação de Pearson que considera as curvas densitométricas de cada amostra na análise de similaridade. As barras indicam o desvio padrão no agrupamento e os valores nos ramos indicam a correlação cofenética das amostras. As setas indicam a banda referente a P9^{TP}.

Figura 4.6 - Agrupamento por similaridade dos perfis de DGGE obtidos de amostras da cultivar Robijn comparando plantas controle com as inoculadas com P9^{TP} (*Pseudomonas putida*). Os perfis foram obtidos de amostras de raiz e endofíticas de caule por meio de amplificação com *primer* universal e específico para *Pseudomonas* spp. nas amostragens realizadas após um e dois meses após inoculação. O agrupamento foi determinado por correlação de Pearson que considera as curvas densitométricas de cada amostra na análise de similaridade. As barras indicam o desvio padrão no agrupamento e os valores nos ramos indicam a correlação cofenética das amostras. As setas indicam a banda referente a P9^{TP}

Figura 4.7 - Agrupamento por similaridade dos perfis de DGGE obtidos de amostras da cultivar Karnico comparando plantas controle com as inoculadas com P9^{TP} (*Pseudomonas putida*). Os perfis foram obtidos de amostras de raiz e endofíticas de caule por meio de amplificação com *primer* universal e específico para *Pseudomonas* spp. nas amostragens realizadas após um e dois meses após inoculação. O agrupamento foi determinado por correlação de Pearson que considera as curvas densitométricas de cada amostra na análise de similaridade. As barras indicam o desvio padrão no agrupamento e os valores nos ramos indicam a correlação cofenética das amostras. As setas indicam a banda referente a P9^{TP}

4.2.2.4 Correlação entre as variáveis ambientais e os perfis de DGGE

A correlação entre as variáveis ambientais e os perfis de DGGE foram realizadas por meio da aplicação da análise multivariada, onde os dados moleculares de cada uma das amostras, representados pelos perfis de DGGE, foram transformados em ocorrência de espécies, para correlação com os fatores ambientais representados pelas diferentes cultivares e pela inoculação de diferentes espécies bacterianas, permitindo a determinação dos principais fatores determinantes na composição das comunidades bacterianas associadas às plantas de batata.

Figura 4.8 -

Análise de correlação entre a intensidade relativa de bandas de DGGE calculada pelo programa GelCompar II e densidade populacional da linhagem P9 nas comunidades bacterianas de raiz (A) e endofíticas de caule (B) de batata. São apresentados dados utilizando *primers* universais e específicos para *Pseudomonas* spp. para obtenção dos perfis de DGGE. Os valores nas retas indicam a correlação linear (R^2) entre as variáveis quantificadas

No entanto, para se utilizar os perfis de DGGE como dados de frequência de espécies dentro de uma comunidade, as intensidades relativas das bandas foram determinadas. Para verificar a representatividade de tal enfoque uma análise de correlação linear foi realizada, comparando a intensidade da banda referente a P9^{TP} e as densidades populacionais desta linhagem nas diferentes amostras (Figura 4.8). Além da análise com *primers* universais, a densidade de P9^{TP} foi também correlacionada com a superfície relativa das bandas obtidas por meio da aplicação de *primers* específicos para o gênero *Pseudomonas*. Os resultados mostraram correlações lineares (R^2) entre estes fatores com valores 0,33 e 0,41, para *primers* universais e para *Pseudomonas*, respectivamente, quando a comunidade de raiz foi acessada (Figura 4.8A). Se for utilizada a mesma análise para a comunidade endofítica de caule, estes valores são de 0,36 e 0,15 para os perfis gerados com *primers* universais e para *Pseudomonas* (Figura 4.8B). Desta maneira, no caso do perfil de DGGE obtido a partir de amostras de comunidades endofíticas obtidos com a aplicação de *primers* para *Pseudomonas*, onde o valor de R^2 foi de 0,15, a análise foi realizada de modo qualitativo, considerando apenas a presença ou ausência da banda, porém não levando em consideração a superfície relativa da banda, que foi utilizada nas análises das demais comunidades.

A análise por meio da utilização de *primers* universais mostrou que as plantas apresentam como principais fatores determinantes da diversidade bacteriana as cultivares Eersteling e Robijn ($p < 0,05$), além da inoculação de P9^{TP} (Figura 4.9). Em comunidades de raiz de plantas com um mês de cultivo a linhagem SR1.6/6^{TP} também apresentou efeito significativo na determinação da comunidade bacteriana ($p < 0,05$) (Figura 4.9A). Nesta análise é possível observar uma maior separação das amostras pertencentes a diferentes cultivares na amostragem de plantas com dois meses de cultivo, com destaque para as amostras da cultivar Karnico, que mostraram ser diferentes das obtidas de outras cultivares em ambas amostragens, com plantas cultivadas por um e dois meses (Figura 4.9). Dentre os fatores avaliados, a ordem daqueles capazes de explicar a variância das comunidades bacterianas acessadas por meio de amplificação com *primers* universais foi: tempo de cultivo > diferentes cultivares > inoculação de bactérias (Tabela 4.4)

Na análise das comunidades de *Pseudomonas* spp. associadas às plantas foi inicialmente possível verificar o efeito de diferentes cultivares na determinação desta comunidade associada às plantas controles e inoculadas com a linhagem P9^{TP} (Figura 4.10). A cultivar com o perfil de

Tabela 4.4 - Variância no perfil de bandas explicada por cada uma das variáveis ambientais nas comunidades bacterianas da raiz e endofíticas de caule de plantas de batata. Os dados avaliados foram gerados por meio da amplificação com *primers* para o domínio Bacteria

	Comunidade da Raiz			Comunidade Endofítica de Caule		
	Lambda-1*	Lambda-A**	P value	Lambda-1	Lambda-A	p value
Tempo de cultivo	0,62	0,62	0,002	0,70	0,70	0,002
Eersteling	0,19	0,08	0,002	0,20	0,20	0,002
Robijn	0,16	0,16	0,002	0,32	0,32	0,02
Karnico	0,45	0,45	0,002	0,45	0,45	0,002
P9 ^{TP}	0,11	0,11	0,002	0,08	0,09	0,026
E119 ^{TP}	0,03	0,05	0,174	0,07	0,07	0,112
SR1.6/6 ^{TP}	0,06	0,05	0,078	0,06	0,05	0,282

* Efeitos marginais, demonstrando a explicação da variância pelas diferentes variáveis de forma independente.

** Efeitos condicionais, mostrando a variância adicionalmente explicada pela inclusão da variável no modelo.

Tabela 4.5 - Variância no perfil de bandas explicada por cada uma das variáveis ambientais nas populações de *Pseudomonas* da raiz e endofíticas de caule de plantas de batata. Os dados avaliados foram gerados por meio da amplificação com *primers* específicos para o gênero *Pseudomonas*

	Comunidade da Raiz			Comunidade Endofítica de Caule		
	Lambda-1*	Lambda-A**	P value	Lambda-1	Lambda-A	p value
Tempo de cultivo	0,13	0,13	0,002	0,14	0,13	0,008
Eersteling	0,50	0,50	0,002	0,14	0,09	0,040
Robijn	0,19	0,10	0,016	0,15	0,15	0,018
Karnico	0,20	0,20	0,002	0,23	0,24	0,002
P9 ^{TP}	0,35	0,35	0,002	0,34	0,34	0,002

* Efeitos marginais, demonstrando a explicação da variância pelas diferentes variáveis de forma independente.

** Efeitos condicionais, mostrando a variância adicionalmente explicada pela inclusão da variável no modelo.

Pseudomonas spp. mais distinto entres as três foi a cultivar Eersteling, sendo que além desta a cultivar Robijn demonstrou significância na seleção de *Pseudomonas* spp. para compor a comunidade endofítica de caule ($p < 0,05$) em plantas com um mês de cultivo (Figura 4.10C). Em amostras da comunidade endofítica de plantas com dois meses as cultivares não apresentaram diferenças significativas na composição desta comunidade (Figura 4.10D). Em relação ao efeito da inoculação de P9^{TP}, para a composição da comunidade de *Pseudomonas* spp. associada às plantas de batata avaliadas, este fator teve maior efeito sobre a composição das comunidades do

que a alteração de cultivares. Em todas as avaliações, em comunidades de raiz e endofíticas de caule, em plantas de três diferentes cultivares, amostradas após um ou dois meses de cultivo, a inoculação desta linhagem mostrou ser importante para a composição da comunidade de *Pseudomonas* spp. associada às plantas ($p < 0,05$) (Figura 4.10). Para as populações de *Pseudomonas*, os valores de λ_1 e λ_A que correspondem aos fatores mais explicativos da variância dos perfis de DGGE mostraram ordens diferentes para amostras de raiz e de endófitos de caule. Para raiz a ordem de importância foi Eersteling > P9^{TP} > Robijn = Karnico > tempo de cultivo (Tabela 4.5). Em relação à comunidade endofítica de caule a ordem foi P9^{TP} > Karnico > Eersteling = Robijn = tempo de cultivo (Tabela 4.5).

Figura 4.9 - Análise de correlação canônica (CCA) entre o perfil de bandas de DGGE, obtidos com *primers* universais em amostras de raiz e endofíticas de caule, e os fatores ambientais. São apresentadas análises dos isolamentos realizados de raiz após um (A) e dois (B) meses e de endofíticos de caule um (C) e dois (D) meses de inoculação cultivo das plantas em casa-de-vegetação. Todos os fatores ambientais são apresentados, porém apenas os marcados com * foram significantes para determinar a composição das comunidades bacterianas ($p < 0,05$) de acordo como o teste de permutação de Monte Carlo. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância correlacionada no respectivo eixo

Figura 4.10 - Análise de correlação canônica (CCA) entre o perfil de bandas de DGGE de amostras de endofíticos de caule realizados com *primers* específicos para a população de *Pseudomonas* spp. e os fatores ambientais. São apresentadas análises das amostras de raízes após um (A) e dois (B) meses de cultivo das plantas, e as amostras de caule, também obtidas de plantas com um (C) e dois (D) meses de cultivo das plantas em casa-de-vegetação. Todos os fatores ambientais são apresentados, porém apenas os marcados com * foram significantes para determinar a composição das comunidades bacterianas ($p < 0,05$) de acordo como o teste de permutação de Monte Carlo. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância correlacionada no respectivo eixo

4.2.2.5 Alterações no perfil metabólico de plantas inoculadas com a linhagem P9^{TP}

Assim como na análise dos perfis de DGGE de diferentes cultivares, foi possível observar diferenças entre os perfis metabólicos de plantas de cultivares distintas, bem como alterações no perfil metabólico das plantas devido à colonização da linhagem P9^{TP}. Inicialmente analisando os valores de médias das quatro repetições biológicas avaliadas por LC-MS foi possível verificar a distribuição dos 5463 picos quantificados nas diferentes amostras.

As diferenças nos perfis metabólicos em plantas controle e plantas inoculadas com P9^{TP} foram observadas por meio da visualização de pontos plotados fora do eixo determinado por picos com valores similares em plantas controles e inoculadas com P9^{TP} ($x=y$), indicando a correspondência entre os metabólitos e a inoculação da linhagem P9^{TP} (Figura 4.11). Os gráficos de dispersão nas diferentes cultivares mostram que o efeito da inoculação altera o metabolismo

destas plantas de modo quantitativamente similar, com números próximos de metabólitos de resposta à presença de P9^{TP}. Adicionalmente foi possível determinar o número de picos diferencialmente quantificados quando diferentes valores de aumento ou diminuição são considerados (Tabela 4.6), sendo observados números similares entre as cultivares e entre os tecidos da planta avaliados.

Figura 4.11 - Distribuição de dados da análise de LC-MS comparando os dados de plantas controle com as plantas inoculadas com a linhagem P9^{TP}. Os dados apontam os picos diferenciais nas diferentes cultivares e em ambos os tecidos avaliados

Tabela 4.6 - Número de picos quantificados diferencialmente em plantas de batata inoculadas com a linhagem P9^{TP} de *Pseudomonas putida* (num total de 5463)

		Cultivares de batata avaliados					
Limite considerado		<i>Eersteling</i>		<i>Robijn</i>		<i>Karnico</i>	
		Caule	Folhas	Caule	Folhas	Caule	Folhas
10 vezes	<i>Induzido</i>	13	9	19	20	18	12
	<i>Reprimido</i>	24	17	14	20	8	8
5 vezes	<i>Induzido</i>	26	32	41	48	41	40
	<i>Reprimido</i>	61	44	28	51	23	26
2 vezes	<i>Induzido</i>	79	157	154	333	137	231
	<i>Reprimido</i>	201	288	77	118	106	93

Utilizando uma análise mais rigorosa dos dados originados, determinando parâmetros para seleção dos picos diferenciais em plantas controles e inoculadas levaram a seleção de 33 e 37 picos de amostras de caule e folhas, respectivamente, considerados como relacionados à resposta da inoculação de P9^{TP}, alterando o metabolismo vegetal no caule e nas folhas, respectivamente. A análise cromatográfica dos valores obtidos para as quatro repetições biológicas na quantificação destes picos mostra que cada cultivar responde de maneira particular à inoculação da linhagem estudada (Figura 4.12). Desta maneira, apesar de um mesmo número de metabólitos serem regulados nas diferentes cultivares (Tabela 4.6), a resposta das plantas à presença de P9^{TP} é específica, uma vez que os picos selecionados como diferenciais não são os mesmos em plantas das diferentes cultivares.

4.2.3 Discussão

A interação entre plantas e bactérias pode ocorrer de diversas maneiras, levando ao desenvolvimento de doenças ou a benefícios no desenvolvimento vegetal (SCHIPPERS et al., 1990; HALLMANN et al., 1997). Para melhor entender estas interações, causas e efeitos, estudos são necessários acessando níveis detalhados de resposta dos organismos envolvidos na interação. Neste capítulo, o efeito da inoculação de três diferentes espécies bacterianas é avaliado na formação das comunidades bacterianas associadas às plantas de batata, e posteriormente a resposta metabólica destas plantas foi acessada para se obter informações sobre o efeito da inoculação de *P. putida* P9^{TP} nestas plantas.

As análises mostraram, inicialmente por reisolamento e posteriormente por detecção molecular, que a linhagem P9^{TP} tem maior capacidade, do que as demais avaliadas, de colonizar plantas de batata das cultivares Eersteling, Robijn e Karnico, alterando de forma significativa a composição tanto da comunidade total destas plantas como a comunidade de *Pseudomonas* spp., que passa a ser composta quase que exclusivamente pela população de P9^{TP}. Isolados do gênero *Pseudomonas* são amplamente estudados em associação com as plantas, sendo estes descritos como altamente competitivos nos ambientes naturais, e conhecidos produtores de antibióticos (DE SOUZA; RAAIJMAKERS, 2003), sideróforos (ZAWADZKA et al., 2006; BAKKER; PIETERSE; VAN LOON, 2007) entre outros compostos, que explicam esta característica de alta competitividade e capacidade de colonização dos nichos presentes na planta. A capacidade de bactérias deste gênero em competir no ambiente rizosférico, compondo a comunidade presente no solo próximo às raízes das plantas também é conhecida (COSTA et al., 2006a; COSTA et al., 2006b).

Figura 4.12 - Perfil cromatográfico dos picos diferencialmente quantificados em caule (A) e folhas (B) de plantas inoculadas com a linhagem P9^{TP} de *Pseudomonas putida*. A coloração verde e vermelha indica, respectivamente, a diminuição e o aumento na intensidade dos picos em plantas inoculadas em relação a plantas controle. A clusterização foi feita por correlação de *Pearson* a partir dos perfis das diferentes amostras (vertical) e dos diferentes picos (horizontal)

As demais espécies bacterianas foram observadas colonizando as plantas de batata, sendo que a linhagem SR1.6/6^{TP} (*M. mesophilicum*) apresentou colonização maior do que E119^{TP} (*Paenibacillus* sp.). No entanto, estas linhagens não foram detectados por meio de PCR-DGGE, evidenciando que ou suas populações não atingem 1% da comunidade total acessada pelos *primers* utilizados ou a metodologia de extração de DNA utilizada nas amostras não é eficaz para extrair DNA a partir de células destas espécies. É possível explorar ainda o comportamento destas linhagens devido às suas respectivas origens. Enquanto que E119 é proveniente de plantas de batata, a linhagem SR1.6/6 foi originalmente isolada de plantas de citros. Na comparação, SR1.6/6^{TP} mostrou maiores populações nas comunidades avaliadas, indicando maior capacidade de colonização das plantas, mesmo que não seja seu hospedeiro original. No entanto, em relação ao efeito na composição das comunidades bacterianas, foi verificado apenas um efeito temporal na composição de comunidades bacterianas associadas às plantas inoculadas com E119^{TP}, onde uma banda adicional foi observada no perfil de comunidades de raiz de plantas na primeira amostragem. Na segunda amostragem esta diferença não foi mais verificada. Esta alteração pode estar ligada a indução de processos como a resistência da planta pela presença de E119^{TP}. A espécie *Paenibacillus illinoisensis*, do mesmo gênero da linhagem E119, é descrita como indutora desta resistência em plantas de pimenta (JUNG et al., 2006). Para espécies do gênero *Methylobacterium*, este tipo de interação com as plantas também é descrito para espécies como amendoim (MADHAIYAN et al., 2006) e arroz (MADHAIYAN et al., 2004). No entanto, espécies deste gênero estão mais relacionadas às plantas endofiticamente, sendo descritas em várias espécies vegetais (PIRTTILA et al., 2000; SY et al., 2001; ARAUJO et al., 2002; OMER; TOMBOLINI; GERHARDSON, 2004). Desta maneira espera-se que a colonização das plantas por *Methylobacterium* spp. cause menores alterações na planta hospedeira e na comunidade bacteriana associada. Entretanto, a alteração da comunidade endofítica devido a inoculação desta mesma linhagem de *M. mesophilicum* é descrita em plantas de *Catharanthus roseus* e *Nicotiana clevelandii* (ANDREOTE et al., 2006), mostrando que este efeito pode ser dependente da espécie de planta hospedeira considerada.

Avaliando os efeitos da inoculação das bactérias com os observados entre as comunidades presentes em diferentes cultivares, as análises de CCA mostraram que a única espécie bacteriana avaliada, capaz de causar alterações comparáveis a alteração genotípica da planta hospedeira, na composição das comunidades bacterianas, foi *Pseudomonas putida* (linhagem P9^{TP}), que por

vezes levou à alterações maiores do que as observadas entre cultivares. Considerando a planta um suporte onde diferentes nichos estão dispostos para serem colonizados por bactérias (QUADTHALLMANN; HALLMANN; KLOEPPER, 1997), pode ser sugerido que P9^{TP} é capaz de ocupar rapidamente estes nichos, o que resulta na alta densidade populacional encontrada nas plantas e, por consequência, na alteração nos perfis das comunidades, por inibir a colonização das plantas por outros grupos bacterianos, em especial outras espécies e linhagens de *Pseudomonas* spp.

Destacando os perfis obtidos com *primers* específicos para o gênero *Pseudomonas*, a linhagem P9^{TP} ocupa, tanto um como dois meses após a inoculação das plantas, na maior parte quando não na totalidade o nicho presente nas plantas que são colonizados por *Pseudomonas*, tornando os perfis que em plantas controle são variáveis, agora dominados ou compostos por uma única banda, correspondente a esta linhagem. Tecnicamente, isto indica que as demais *Pseudomonas* spp. não apresentam populações representantes de mais de 1% do total da comunidade deste gênero (limite de detecção da técnica de DGGE).

Este comportamento da linhagem P9^{TP} levou a seleção das plantas inoculadas para estudo de resposta metabólica à colonização por bactérias endofíticas, demonstrando que estas alterações são pequenas na planta hospedeira em resposta à presença do endófito. Dentro das cultivares avaliadas, maior similaridade entre os perfis metabólicos de plantas inoculadas é observada entre as cultivares Eersteling e Robijn em detrimento da cultivar Karnico, que apresentou resposta mais distinta.

No total foram selecionados 33 e 37 picos quantitativamente diferenciais em plantas controle e inoculadas com P9^{TP} (de um total de 5463). Estes valores corroboram com os dados de análise transcritômica de plantas colonizadas por bactérias endofíticas, onde um pequeno número de genes apresentou modulação devido a presença do endófito *P. fluorescens* (WANG et al., 2005). Utilizando o isolado de *Pseudomonas* sp. indutor de resistência sistêmica foi também verificado que poucos genes responderam a inoculação (VERHAGEN et al., 2004). Considerando que a presença de endófitos não causa danos, e na maioria dos casos também não gera vantagens à planta hospedeira, é esperado que as alterações metabólicas da planta sejam mínimas. A análise detalhada dos perfis cromatográficos dos picos selecionados mostra que a separação de plantas inoculadas e controle (vertical) (Figura 4.12) ocorre de maneira consistente nas três cultivares avaliadas, e em tecidos de caule e folhas. Em relação ao agrupamento de picos

(horizontal) (Figura 4.12), pode ser verificado o comportamento similar de diferentes picos, que podem indicar a participação destas moléculas na mesma via metabólica ou a ocorrência de isótopos.

Desta forma, são pontos principais deste capítulo os efeitos nas comunidades bacterianas causados pelo cultivo de plantas de diferentes cultivares de batata, alterações devidas a inoculação de espécies bacterianas e adicionalmente alterações temporais, acessadas com amostragens de plantas em diferentes períodos após inoculação. Enquanto a comunidade total parece variar principalmente devido ao tempo de cultivo da planta e a alteração do genótipo da planta, a comunidade de *Pseudomonas* spp. responde principalmente ao cultivo de plantas de diferentes cultivares e à inoculação com células da linhagem P9^{TP}. Adicionalmente, avaliando a resposta metabólica à colonização de uma bactéria endofítica ficou evidenciado que, nas cultivares avaliadas, pequenas alterações metabólicas são causadas, o que pode explicar a ausência de sintomas nas plantas hospedeiras devido a presença de bactérias endofíticas.

Referências

- ANDREOTE, F.D.; GULLO, M.J.M.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, p. 169-173, 2004.
- ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAUJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.
- ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4906-4914, 2002.
- BAKKER, P.; PIETERSE, C.M.J.; VAN LOON, L.C. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 239-243, 2007.
- BINO, R.J.; HALL, R.D.; FIEHN, O. *et al.* Potential of metabolomics as a functional genomics tool. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, p. 418-425, 2004.
- BRENCIC, A.; WINANS, S.C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant associated bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 69, p. 155-194, 2005.
- BRUINSMA, M.; KOWALCHUK, G.A.; VAN VEEN, J.A. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 37, p. 329-337, 2003.
- COSTA, R.; GOMES, N.C.M.; PEIXOTO, R.S.; RUMJANEK, N.; BERG, G.; MENDONCA-HAGLER, L.C.S.; SMALLA, K. Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 2434-2447, 2006a.
- COSTA, R.; SALLES, J.F.; BERG, G.; SMALLA, K. Cultivation-independent analysis of *Pseudomonas* species in soil and in the rhizosphere of field-grown *Verticillium dahliae* host plants. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, p. 2136-2149, 2006b.
- DA SILVA, K.R.A.; SALLES, J.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 54, p. 213-231, 2003.
- DE SOUZA, J.T.; RAAIJMAKERS, J.M. Polymorphisms within the *prnD* and *pltC* genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin-producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 21-34, 2003.
- DUNFIELD, K.E.; GERMIDA, J.J. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 806-815, 2004.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185-209, 2004.

FIEHN, O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 48, p. 155-171, 2002.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 47, p. 51-64, 2004.

GARG, N.; GEETANJALI Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Les Ulis, v. 27, p. 59-68, 2007.

GOMES, N.C.M.; HEUER, H.; SCHONFELD, J.; COSTA, R.; MENDONCA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, The Hague, v. 232, p. 167-180, 2001.

HALLMANN, J.; QUADTHALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HEUER, H.; KROPPESTEDT, R.M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere relative to communities are negligible natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1325-1335, 2002.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

JUNG, W.J.; JIN, Y.L.; PARK, R.D.; KIM, K.Y.; LIM, K.T.; KIM, T.H. Treatment of *Paenibacillus illinoisensis* suppresses the activities of antioxidative enzymes in pepper roots caused by *Phytophthora capsici* infection. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, p. 901-907, 2006.

KAPLAN, F.; KOPKA, J.; HASKELL, D.W.; ZHAO, W.; SCHILLER, K.C.; GATZKE, N.; SUNG, D.Y.; GUY, C.L. Exploring the temperature-stress metabolome of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 136, p. 4159-4168, 2004.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Les Ulis, v. 27, p. 29-43, 2007.

KIM, J.K.; BAMBA, T.; HARADA, K.; FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. Time course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 415-424, 2007.

KOZDROJ, J.; VAN ELSAS, J.D. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1405-1417, 2000.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, The Hague, v. 273, p. 91-99, 2005.

KUKLINSKY-SOBRAL, 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**, Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

LE LAY, P.; ISAURE, M.P.; SARRY, J.E.; KUHN, L.; FAYARD, B.; LE BAIL, J.L.; BASTIEN, O.; GARIN, J.; ROBY, C.; BOURGUIGNON, J. Metabolomic, proteomic and biophysical analyses of *Arabidopsis thaliana* cells exposed to a caesium stress. Influence of potassium supply. **Biochimie**, Paris, v. 88, p. 1533-1547, 2006.

LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR based genomic analysis of phytopathogens: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SESHADRI, S.; CHUNG, H.Y.; YANG, J.C.; SUNDARAM, S.; SA, T.M. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Nankang, v. 45, p. 315-324, 2004.

MADHAIYAN, M.; REDDY, B.V.S.; ANANDHAM, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S.P.; SA, T.M. Plant growth promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. **Current Microbiology**, New York, v. 53, p. 270-276, 2006.

MARSCHNER, P.; BAUMANN, K. Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonisation in split-root maize. **Plant and Soil**, The Hague, v. 251, p. 279-289, 2003.

MOCO, S.; BINO, R.J.; VORST, O.; VERHOEVEN, H.A.; DE GROOT, J.; VAN BEEK, T.A.; VERVOORT, J.; DE VOS, C.H.R. A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 141, p. 1205-1218, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, p. 473-497, 1962.

OMER, Z.S.; TOMBOLINI, R.; GERHARDSON, B. Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 47, p. 319-326, 2004.

PIRTTILA, A.M.; LAUKKANEN, H.; POSPIECH, H.; MYLLYLA, R.; HOHTOLA, A. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 66, p. 3073-3077, 2000.

QUADTHALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: Location and interaction with other plant associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 254-259, 1997.

RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M.H.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, p. 219-235, 2006.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, p. 827-837, 2006.

RUI, Y.K.; YI, G.X.; ZHAO, J.; WANG, B.M.; LI, Z.H.; ZHAI, Z.X.; HE, Z.P.; LI, Q.X. Changes of Bt toxin in the rhizosphere of transgenic Bt cotton and its influence on soil functional bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1279-1284, 2005.

SALLES, J.F.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: Effect of crop and land use history. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 4012-4020, 2004.

SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P.; VANPEER, R. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing *Pseudomonads* on rhizosphere interactions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 129, p. 75-83, 1990.

SCHUHEGGER, R.; IHRING, A.; GANTNER, S. *et al.* Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. **Plant Cell and Environment**, New York, v. 29, p. 909-918, 2006.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P. *et al.* Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 183, p. 214-220, 2001.

VERHAGEN, B.W.M.; GLAZEBROOK, J.; ZHU, T.; CHANG, H.S.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, p. 895-908, 2004.

WANG, Y.Q.; OHARA, Y.; NAKAYASHIKI, H.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 18, p. 385-396, 2005.

ZAWADZKA, A.M.; VANDECASTEELE, F.P.J.; CRAWFORD, R.L.; PASZCZYNSKI, A.J. Identification of siderophores of *Pseudomonas stutzeri*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 1164-1176, 2006.

5 CULTURABILIDADE DA COMUNIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA DE

Solanum tuberosum

Resumo

A rizosfera é um ambiente altamente complexo composto por diversas espécies, sendo esta complexidade a maior barreira a ser transposta para permitir um melhor conhecimento deste ambiente, o qual permitirá explorar os recursos microbianos da rizosfera. A grande maioria das espécies bacterianas presentes na rizosfera não são facilmente cultivadas em condições de laboratório, fazendo-se necessário o desenvolvimento de técnicas alternativas para seus estudos. A técnica de metagenoma ainda apresenta muitos problemas na clonagem e expressão de DNA de determinadas espécies bacterianas. Desta maneira um aumento da culturabilidade é de grande interesse e pode ser conseguido utilizando-se diferentes meios de cultivo para isolamento desta comunidade bacteriana. De maneira geral, foi observado neste trabalho que, comparado com o meio comumente utilizado R2A, uma maior contagem é observada quando os meios oligotróficos suplementado com catalase (CAT) ou com extrato rizosférico (REXT) são utilizados para o isolamento de bactérias da rizosfera em detrimento dos meios R2A e oligotrófico (OL). No entanto, a diversidade de espécies isoladas foi maior nos meios de cultura oligotrófico puro (OL) e no meio oligotrófico suplementado com extrato rizosférico (REXT), e menor no meio de cultura oligotrófico suplementado com catalase (CAT). A seletividade de cada meio de cultura para diferentes grupos bacterianos ficou evidenciada por meio da análise de correspondência (DCA), onde foi observada especificidade de populações bacterianas em cada meio de cultura avaliado. Desta maneira, a utilização conjunta de vários meios de cultivo resulta em uma maior representatividade, por meio de isolamento, da comunidade bacteriana total da rizosfera.

Palavras-chave: Culturabilidade, 16S DNAr, DCA

CULTURABILITY OF BACTERIAL COMMUNITY FROM *Solanum tuberosum* RHIZOSPHERE

Abstract

Rhizosphere is a complex environment composed by a high number of species, where this complexity is the major barrier to be overcome for a better knowledge of this environment, allowing exploring the microbial resources on the rhizosphere. The majority of bacterial species present in the rhizosphere are not easily cultured in laboratory conditions, creating the need of alternative techniques to assessment and study. The metagenome technique still present lacks in the cloning and expressing DNA from a set of bacteria species. On this way, it is highly interesting to improve the culturability of this bacterial community, what might be achieved by isolation in different culture media. It was observed in this chapter that, comparing to the commonly used media R2A, higher colonies counting are observed when oligotrophic media amended with catalase (CAT) or rhizosphere extract (REXT) are used for bacteria isolation, instead of the pure oligotrophic medium (OL) or the R2A. However, the diversity of species isolated was higher on media oligotrophic pure (OL) and supplemented with rhizosphere extract (REXT), while lower diversity was achieved on the oligotrophic media supplemented with catalase (CAT). The selectivity of every culture media to different bacterial groups was evidenced by detrended correspondence analysis (DCA). Concluding, the usage of different media in isolation results in a better assessment, by isolation, of bacterial communities from rhizosphere.

Key-words: Culturability, 16S rDNA, DCA

5. 1 Introdução

“Yesterday is history, tomorrow is mystery, and today is a gift... that is why it is called present.”

As plantas e as espécies de microrganismos interagem intimamente na rizosfera, onde processos importantes ocorrem, levando a um estímulo ou inibição do desenvolvimento vegetal. Muitos parâmetros influenciam a atividade e a densidade das populações que compõem as comunidades bacterianas que colonizam a rizosfera (RASCHE et al., 2006). A alta diversidade bacteriana presente neste nicho torna difícil a exploração e o conhecimento detalhado deste ambiente. As dificuldades encontradas são principalmente devido a falta de representatividade observada na comparação entre as comunidades criadas e cultivadas pelo ambiente com as comunidades bacterianas que são obtidas em meio de cultivo (FELSKE et al., 1999; EILERS et al., 2000). Com isto sabe-se que apenas uma pequena porção da diversidade microbiana total é acessada por meio de técnicas baseadas em cultivo (TYSON; BANFIELD, 2005).

Desta maneira, o desenvolvimento de técnicas de cultivo alternativas deve ser alvo de estudos, buscando uma melhor representatividade das comunidades bacterianas na forma de isolados e permitindo a exploração de funções microbianas (HAMAKI et al., 2005). A modificação das condições de cultivo, como alteração da atmosfera, da disponibilidade de nutrientes e da suplementação de moléculas sinalizadoras pode resultar numa melhor acessibilidade da comunidade bacteriana do solo por meio de técnicas de cultivo (STEVENSON et al., 2004). Mimetizar o ambiente resulta no cultivo de espécies anteriormente não cultiváveis, como, por exemplo, a aplicação de extrato de solo ao meio de cultura com baixos níveis de nutrientes permitindo isolamento de espécies bacterianas não descritas anteriormente (HAMAKI et al., 2005). Também utilizando meios de cultivo com baixa disponibilidade de nutrientes, isolados pertencentes aos grupos *Verrucomicrobium* e *Acibacteria* foram obtidos (JANSSEN et al., 2002). Outros ambientes também foram estudados em relação a culturabilidade de suas respectivas comunidades bacterianas, como por exemplo os ambientes aquáticos, onde a suplementação dos cultivos com moléculas sinalizadoras, como adenosina cíclica monofosfato (cAMP) ou acil-homoserina lactonas (AHLs) resultou numa maior culturabilidade da comunidade bacteriana (BRUNS; CYPIONKA; OVERMANN, 2002; BRUNS et al., 2003). Existem também técnicas que se baseiam no cultivo de células individualmente, separadas a

partir de comunidades complexas por meio de citometria de fluxo (FROHLICH; KONIG, 2000; ZENGLER et al., 2005). De maneira geral, as tentativas mais promissoras baseiam-se na mimetização do ambiente, fornecendo às bactérias em estudo as condições naturais encontradas no ambiente.

No presente capítulo o objetivo foi acessar, de maneira mais eficiente, a diversidade bacteriana da rizosfera de plantas de batata por meio de isolamento em diferentes meios de cultivo com baixa disponibilidade de nutrientes, suplementados ou não com moléculas essenciais ou compostos que mimetizam o ambiente rizosférico. O objetivo foi descrever meio alternativos para serem usados no isolamento de comunidades bacterianas da rizosfera, permitindo: *i*) um maior número de colônias isoladas e, *ii*) uma maior diversidade.

5.2. Desenvolvimento

5.2.1 Material e Métodos

5.2.1.1 Amostragem e preparo das amostras de rizosfera

As amostras de rizosfera utilizadas neste experimento foram coletadas de plantas de batata (*Solanum tuberosum* cv. Agria) em estado de florescimento. A área de produção localiza-se na fazenda do Plant Research International (Wageningen, Holanda), em um solo caracterizado como argiloso. Sete plantas individuais foram amostradas fazendo-se a remoção das plantas do solo e separando-se o solo rizosférico. Após a separação do solo presente entre as raízes, o solo que se apresentava aderido às raízes foi coletado para compor as amostras de rizosfera. Aproximadamente 1 g de rizosfera de cada uma das sete plantas foi misturado em liquidificador separadamente com 200mL de água destilada esterilizada por duas vezes durante 1 min cada, obtendo-se no final uma suspensão celular da comunidade bacteriana da rizosfera. Desta suspensão inicial de células, alíquotas foram utilizadas para contagem total do número de células na amostra e para semeadura nos diferentes meios de cultivo.

5.2.1.2 Preparo dos meios de cultivo

Quatro diferentes meios de cultivo foram utilizados para o isolamento da comunidade bacteriana da rizosfera de batata; um meio comumente utilizado na literatura e rico nutricionalmente (R2A), e os meios em avaliação; oligotrófico (OL), oligotrófico suplementado com catalase (CAT) ou extrato de rizosfera (REXT). Em todos os meios de cultura utilizados foi adicionado ágar na concentração final de 1,2% e posteriormente foi realizada a esterilização por autoclavagem a 120°C e 1 atm de pressão por 20 min antes da utilização.

O meio R2A foi preparado de acordo com as instruções do fabricante (Difco™ R2A Media, França). O meio oligotrófico é composto por baixos níveis de nutrientes, especialmente em relação a disponibilidade de carbono (0,05% MgSO₄, 0,05% KNO₃, 0,13% K₂HPO₄, 0,006% Ca(NO₃)₂, 0,005% glicose, 0,004% caseína hidrolisada). Para preparo do meio catalase (CAT), o meio oligotrófico já esterilizado e na forma líquida à 47°C foi misturado com catalase (Sigma,

Holanda) numa concentração final de 100 U.ml^{-1} (MIZUNOE et al., 1999). O extrato de rizosfera, utilizado na composição do meio REXT, foi obtido a partir da incubação do sistema radicular de uma planta de batata, juntamente com o solo aderido a raiz, em 1 L de água esterilizada por 12 horas à 4°C . A fase líquida deste extrato foi posteriormente centrifugada para separação das partículas de solo (10 min à 4000 g) e o sobrenadante foi esterilizado por filtração em $0,22 \mu\text{m}$. O extrato obtido foi então adicionado ao meio oligotrófico já esterilizado e na forma líquida a 47°C numa concentração final de 10%.

5.2.1.3 Quantificação de bactérias

Como controle, a quantificação total das bactérias nas amostras de rizosfera foi realizada por coloração da suspensão inicial de células com diclorotriazinilaminofluoresceína (DTAF), seguido de contagem automatizada em microscópio confocal (BLOEM; VENINGA; SHEPHERD, 1995).

Para isolamento em meios de cultivo diluições apropriadas das sete amostras foram preparadas em água destilada esterilizada e semeadas nos diferentes meios de cultivo. Duas placas de cultivo foram utilizadas em cada uma das diluições utilizadas (10^{-3} à 10^{-6}). As placas de cultivo foram então incubadas a 25°C e o desenvolvimento de colônias foi monitorado a cada três dias até o período de 15 dias de cultivo. As contagens foram realizadas principalmente nas placas com diluições 10^{-4} e 10^{-5} , variando de acordo com o meio de cultura e a amostra. O desenvolvimento de colônias foi monitorado separadamente, para colônias de diferentes tamanhos, utilizando-se duas classes; colônias comuns observadas a olho desarmado e microcolônias, que foram contadas em estereoscópio com aumento de 65X. Estas microcolônias apresentam diâmetro variando entre 10 e $500 \mu\text{m}$.

Para posterior identificação dos grupos bacterianos isolados nos diferentes meios de cultivo, coleções de isolados obtidos em cada um dos meios de cultivo foram obtidas. Ao acaso, 192 colônias maiores em cada um dos meios de cultivo foram coletadas, num total de 768 colônias. Após repicagem e purificação, estas colônias foram suspensas em glicerol 20% e estocadas à -80°C . Em relação as microcolônias, estas foram coletadas nas quantidades de 60 do meio OL, 50 de CAT e 30 de REXT, seguindo-se diretamente para PCR de colônia para o gene 16S RNAr e posterior identificação por seqüenciamento dos produtos de PCR.

5.2.1.4 Construção da biblioteca de clones do gene 16S RNAr a partir do DNA rizosférico

A partir de cada uma das amostras 0,5 g de solo da rizosfera foi utilizado para extração de DNA com *Ultra Clean Soil DNA kit* (MoBio, EUA). O DNA obtido de cada uma das extrações foi utilizado na construção da biblioteca de clones do gene 16S RNAr. Primeiramente os DNAs extraídos foram submetidos à amplificação com *primers* universais para o gene 16S RNAr (domínio bactéria) 27F (5'-AGAGTTTGATC[CA]TGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGG[TC]TACCTTGTTACGACTT-3'), resultando em um fragmento de 1500 pb. As reações foram compostas de 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 10 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 200 mM de cada um dos deoxiribonucleosídeos trifosfato, 400 mM de cada *primer* e 5U de SuperTaq DNA Polimerase (HT Biotechnology, Reino Unido). As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-200 (MJ Research, Holanda) programado para uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento de *primers* a 62°C por 1 min, e extensão de *primers* a 72°C por 90 s, e uma extensão final a 72°C por 10 min. O produto de amplificação foi analisado em eletroforese em gel de agarose 1% (w/v) em tampão TBE 0,5X, seguido de coloração em brometo de etídeo e observação em luz ultra-violeta. Posteriormente, os produtos de amplificação foram misturados compondo apenas uma amostra composta das sete plantas, purificados com *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen, Alemanha) e clonados em plasmídeos de *Escherichia coli* utilizando o kit *pGEM[®]-T Easy Vector System* (Promega, Madison, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As colônias que apresentaram insertos no vetor (coloração branca) foram selecionadas para detecção do inserto, que foi realizada por amplificação com os *primers* M13F e M13R. As reações foram realizadas com desnaturação inicial a 94°C por 10 min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 1 min, com uma extensão final a 72°C por 10 min. Os clones que apresentaram insertos com o tamanho esperado foram seqüenciados. No total 94 clones foram selecionados para compor a biblioteca utilizada nas comparações.

5.2.1.5 Seqüenciamento dos isolados e clones

No total foi realizado o seqüenciamento parcial do gene 16S RNAr de 176 isolados, sendo 39, 47, 40 e 50 isolados obtidos nos meios de cultivo R2A, OL, CAT e REXT, respectivamente.

As seqüências obtidas contém aproximadamente 400 bp, cobrindo as regiões variáveis V6 a V8 do gene 16S RNAr. Para cada um destes isolados uma PCR de colônia foi realizada em volume de 50 µL contendo *primers* universais para o gene 16S RNAr 27F e 1492R, como descrito anteriormente. Os produtos de amplificação foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% (w/v) em tampão TBE 0,5X, seguido de coloração em brometo de etídeo e observação em luz ultra-violeta. Os produtos de PCR obtidos foram purificados e seqüenciados utilizando o *primer* reverso 1492R. As purificações foram realizadas em placas Sephadex contendo 96 poços, e as reações de seqüenciamento e a obtenção das seqüências foram realizadas pelo Greenomics™ (Wageningen, Holanda). Os cromatogramas resultantes de cada um dos seqüenciamentos foram analisados no programa DNASTar V6 (SeqManII), onde as extremidades das seqüências com baixa qualidade foram removidas e as seqüências selecionadas foram exportadas para análises posteriores.

5.2.1.6 Análise de diversidade e rarefação

A diversidade e a riqueza das amostras foram quantificadas por meio do cálculo dos índices de Shannon e Chao1, respectivamente. Estes índices foram calculados utilizando o programa computacional DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005), que também gerou os dados de rarefação, considerando diferentes níveis de similaridade entre as seqüências. As matrizes de similaridade utilizadas no programa DOTUR foram geradas com o alinhamento das seqüências de cada um dos grupos (meios de cultivo e clones) e posterior cálculo das matrizes aplicando as distâncias de Jukes-Cantor, no programa DNADist, no *software* Phylip (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/dnadist-simple.html>). O programa DOTUR calculou desta maneira a ocorrência dos diferentes filotipos nos diferentes grupos de seqüências. Os níveis de similaridade para análise foram determinados em concordância com os valores adotados no *Ribosomal Data Project*, para determinação de linhagens (100%), espécies (99 a 97%, dependendo do grupo bacteriano) e gêneros (95%).

5.2.1.7 Filogenia das seqüências e ocorrência em diferentes meios de cultivo

As seqüências obtidas a partir dos isolados e clones foram afiliadas filogeneticamente por meio de comparação com o banco de dados do *Ribosomal Data Project*, utilizando o programa RDPQuery, na website SIMO (<http://simo.marsci.uga.edu/>). A ocorrência diferencial no número e na densidade de cada uma dos gêneros foi observada, sendo realizada a análise de correlação (DCA) com cada um dos meios de cultivo utilizando o programa Canoco 4.5 (Microcomputer Power, EUA).

5.2.2 Resultados

5.2.2.1 Isolamento da comunidade bacteriana

Foi observada uma alta densidade bacteriana observada pela contagem total, onde o valor de $\log 9.4 \pm 0.1$ células.g⁻¹ de solo rizosférico foi determinado. Os dados obtidos das sete plantas avaliadas são apresentados na Tabela 5.1. Em relação aos meios de cultivo, foi observada uma grande diferença nas porcentagens da comunidade bacteriana cultivada (Figura 5.1). A culturabilidade da comunidade bacteriana foi dependente do meio de cultura utilizado, visto que o percentual de bactérias cultiváveis aumentou no sentido R2A (5%) < OL (10%) < CAT (25%) < REXT (30%). Também foi verificado que após 15 dias de cultivo estas diferenças entre os meios de cultura foram maiores (Figura 5.1).

Tabela 5.1 - Densidade da comunidade bacteriana de plantas de batata, quantificada por contagem total e por isolamento em diferentes meios de cultivo. Os dados apresentados são referentes as contagens realizadas em placas com 16 dias de incubação para o desenvolvimento de colônias

Amostras	Contagem Total (Log)	Número de colonias (Log)				Porcentagem da contagem total			
		R2A	OL	CAT	REXT	R2A	OL	CAT	REXT
Planta A	9.41	8.01	8.19	8.69	8.58	3.94	5.97	19.01	15.49
Planta B	9.19	7.90	8.08	8.66	8.46	5.07	7.77	32.15	18.55
Planta C	9.33	8.26	8.38	8.76	8.69	8.04	10.52	25.99	21.88
Planta D	9.24	8.30	8.41	8.62	8.55	11.50	14.65	23.85	20.46
Planta E	9.38	8.33	8.48	8.84	8.90	8.88	12.57	28.71	32.77
Planta F	9.58	8.55	9.11	9.08	9.00	8.98	33.00	32.71	27.36
Planta G	9.19	7.75	7.84	8.34	8.28	3.62	4.42	14.14	12.14

Além da contagem de colônias observadas nas placas de cultivo, foi também realizada uma contagem das chamadas microcolônias, que foram observadas em estereoscópio (diâmetros entre 8 e 500 μm). Com os dados obtidos foi possível estimar o número de colônias observadas, a olho desarmado e de microcolônias, em cada um dos meios de cultura. Para isto foi considerado o número estimado de colônias uma placa de cultivo onde foi semeada a diluição 10^{-5} de uma suspensão inicial de 1 g de solo rizosférico (Figura 5.2). Considerando apenas as colônias maiores, foi possível observar um aumento no número de colônias por placa, sendo que no meio de cultivo R2A o número estimado é de 100 colônias, enquanto que nos outros meios este valor variou entre 150 e 200 colônias. Entretanto, a presença das microcolônias foi verificada em todos os meios de cultivo, exceto no meio R2A. Nos demais meios estas colônias continuam a se desenvolver mesmo após 15 dias de incubação podendo apresentar até 150 microcolônias por placa. Desta maneira, a principal diferença dentre os meios de cultivo está na presença de microcolônias dentre os isolados obtidos em cada um dos meios.

Figura 5.1 - Percentagem da comunidade bacteriana total da rizosfera de plantas de batata isolada nos diferentes meios de cultivo. São apresentados dados obtidos após seis 15 dias de incubação das placas de cultivo. Os dados são média de sete repetições e as barras indicam o desvio padrão das amostras

Figura 5.2 - Número estimado de colônias em placa de cultivo com diluição da amostra 10^5 ao longo do tempo nos diferentes meios de cultivo avaliados (considerando amostra inicial de 1 g de rizosfera). Os dados são apresentados com contagens separadas para colônias observadas a olho nu e para aquelas observadas em estereoscópio (65X de aumento). A) R2A, B) Oligotrófico, C) Catalase e D) Extrato de rizosfera. As barras indicam os erros padrões obtidos a partir de sete repetições biológicas

5.2.2.2 Filogenia das microcolônias

Devido ao pequeno tamanho e restrito número de células componentes, a repicagem destas microcolônias é um ponto crucial em seu estudo, o que dificulta a manutenção destes isolados por meio de repicagem e estocagem comumente utilizadas para outros isolados. Desta maneira, a filogenia de uma amostra desta comunidade (27 isolados) foi acessada por meio de amplificação do gene 16S DNAr e posterior seqüenciamento (Figura 5.3). Das 27 seqüências obtidas, a maioria mostrou alta similaridade com o gênero *Flavobacterium* (21 isolados), enquanto que as demais seqüências apresentaram similaridade com os gêneros *Bradyrhizobium*, *Nocardioides* (duas seqüências cada), *Sphingomonas* e *Micrococcus* (uma seqüência cada). Não foi possível, devido ao limitado número de seqüências, estabelecer uma relação entre a filogenia das microcolônias e seu isolamento em diferentes meios de cultivo.

Figura 5.3 -

Filogenia de microcolônias baseada na similaridade observada em 354 pb do gene 16S RNAr. Os códigos apresentados com os nomes de espécies são referentes ao código das seqüências no GenBank. A escala representa a divergência entre as seqüências. A seqüência parcial do gene ribossomal 16S de *E. coli* 16S é utilizado como grupo externo, para enraizamento da árvore

5.2.2.3 Diversidade, riqueza e rarefação

Estas análises foram baseadas nas seqüências parciais do gene 16S DNAr obtidas dos isolados de diferentes meios de cultivo e dos clones componentes da biblioteca gerada a partir de DNA diretamente extraído da rizosfera. O programa DOTUR foi utilizado para calcular os índices de diversidade de Shannon (H') e de riqueza Chao1, além dos dados de rarefação. Estes valores foram calculados utilizando diferentes níveis de similaridade entre as seqüências para determinar os filotipos que ocorrem nos diferentes grupos de seqüências (Tabela 5.2).

Figura 5.4 - Análise de rarefação de filotipos componentes das comunidades bacterianas isoladas nos diferentes meios de cultivo e de clones componentes da biblioteca construída a partir de DNA de solo. As análises são baseadas em seqüências parciais do gene 16S ribossômico. As similaridades consideradas determinam as rarefações em diferentes níveis taxonômicos

Tabela 5.2. Índices de diversidade e riqueza obtidos a partir da análise das seqüências parciais do gene 16S RNAr dos isolados e dos clones da biblioteca

Índices	Grupo de seqüências	Similaridade considerada			
		100%	99%	97%	95%
Diversidade (Shannon-Wiener)	Library	4,45 ($\pm 0,15$)*	4,43 ($\pm 0,15$)	4,32 ($\pm 0,16$)	4,12 ($\pm 0,17$)
	R2A	3,21 ($\pm 0,25$)	2,93 ($\pm 0,27$)	2,71 ($\pm 0,27$)	2,44 ($\pm 0,26$)
	OL	3,76 ($\pm 0,22$)	3,20 ($\pm 0,24$)	2,95 ($\pm 0,26$)	2,73 ($\pm 0,24$)
	CAT	3,02 ($\pm 0,25$)	2,55 ($\pm 0,36$)	2,30 ($\pm 0,37$)	2,15 ($\pm 0,36$)
	REXT	3,69 ($\pm 0,21$)	3,39 ($\pm 0,22$)	2,84 ($\pm 0,27$)	2,59 ($\pm 0,25$)
Riqueza (Chao1)	Library	1871 (742-4944)	1219 (519-3051)	380 (217-735)	354 (190-742)
	R2A	70 (42-156)	41 (28-83)	33 (22-75)	20 (16-43)
	OL	229 (118-512)	90 (51-211)	51 (34-108)	28 (23-53)
	CAT	35 (27-64)	36 (24-78)	35 (21-92)	38 (20-112)
	REXT	175 (92-394)	59 (42-106)	32 (25-59)	24 (19-45)

* Valores para intervalo com 95% de confiança são apresentados entre parênteses.

De maneira geral, os índices de diversidade e riqueza revelaram maiores valores para o grupo de seqüências da biblioteca de clones, seguida dos meios de cultivo OL e REXT, e por fim os meios de cultivo R2A e CAT, que demonstraram ser capazes de isolar uma menor diversidade e menos rica porção da comunidade bacteriana da rizosfera de plantas de batata. No entanto, quando valores menores foram considerados na determinação dos filotipos (95% de similaridade), a diferença em números de diversidade e riqueza não é observada entre os meios de cultivo. Isto demonstra que os meios de cultivo são capazes de isolar um número similar de gêneros bacterianos presentes na amostra. Esta tendência de diminuição das diferenças entre os meios de cultivo com a diminuição dos níveis de similaridade é observado nas análises de rarefação (Figura 5.4). Nesta análise foi comparada com 100% de similaridade as linhas de rarefação dos meios de cultivo OL e REXT exatamente entres as linhas da biblioteca de clones (mais diversas e com maior riqueza) e as linhas dos meios de cultivo R2A e CAT (menos diversas e ricas). Com a diminuição da similaridade considerada, as linhas se agrupam, e aos 95% de similaridade não são observadas diferenças entre os meios de cultivo.

5.2.2.4 Ocorrência de gêneros nos diferentes meios de cultivo

Considerando todas as seqüências obtidas de isolados e clones, um total de 93 gêneros bacterianos foi identificado, distribuídos qualitativa e quantitativamente nos diferentes grupos de seqüências (Figura 5.5 e Anexo A). Se apenas as seqüências obtidas de isolados de diferentes meios de cultivo forem consideradas este número passa a ser de 45 gêneros bacterianos identificados. Cada um dos meios de cultura apresentou uma comunidade bacteriana cultivada particular, e todos os meios apresentaram comunidades diferentes daquela observada nos clones da biblioteca.

No gráfico de DCA é possível observar o isolamento preferencial dos gêneros bacterianos em cada um dos meios de cultivo avaliados (Figura 5.6). As diferenças observadas entre o meio OL e seus variantes (CAT e REXT) demonstram que a suplementação deste meio acarreta na seleção de diferentes comunidades bacterianas isoladas. Os isolados obtidos no meio OL são diferentes daqueles obtidos nos meio de cultivo CAT e REXT.

Figura 5.5 - Frequência dos gêneros bacterianos nas seqüências de colônias obtidas nos meios de cultura (R2A, OL, CAT e REXT) e nos clones da biblioteca. A identificação dos gêneros foi feita por análise de similaridade das seqüências no RDPQuery considerando a seqüência com maior similaridade presente no banco de dados

Também vale a pena ressaltar a presença de seqüências afiliadas a grupos bacterianos descritos como de difícil cultivo. No nível de família, nove seqüências foram afiliadas a Incertae sedis V (família que aguarda caracterização sistemática), sendo quatro na biblioteca de clones, quatro entre os isolados no meio OL e uma seqüência entre os isolados no meio REXT. A afiliação ao nível de gênero destas seqüências mostra que elas são distintas, sendo que as seqüências de Incertae sedis V da biblioteca são afiliadas ao gênero *Acquabacterium* (duas seqüências), *Thiobacter* (uma seqüência) e *Lepthothrix* (uma seqüência), enquanto que os isolados do meio OL são afiliados a *Roseateles* (uma seqüência) e *Xilophilus* (três seqüências). Por fim, o isolado obtido no meio REXT também se mostrou alocado ao gênero *Xilophilus*. Também considerando a classificação no nível de gêneros, isolados afiliados ao gênero *Verrucomicrobium* foram obtidos nos quatro meios de cultivo avaliados, mas não em clones provenientes da biblioteca de genes 16S rRNA do solo.

Figura 5.6 - DCA demonstrando a ocorrência dos diferentes gêneros bacterianos dentre os isolados obtidos nos diferentes meios de cultivo. A proximidade entre os nomes dos gêneros e os pontos, que indicam os meios, é diretamente proporcional ao isolamento preferencial dos gêneros nos meios de cultivo. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada no eixo

5.2.2.5 Isolamento de grupos bacterianos possivelmente não descritos

Considerando as seqüências obtidas a partir de isolados, e que apresentaram baixos níveis de similaridade com as seqüências presentes no banco de dados, é possível inferir sobre o cultivo de grupos bacterianos não descritos anteriormente. Para isto, as seqüências com similaridades menores de 95% foram selecionadas para compor o grupo de isolados relacionados com possíveis novos grupos bacterianos.

No total, 23 seqüências foram selecionadas, sendo oito de isolados obtidos em meio de cultura R2A, seis no OL, quatro no CAT e cinco no REXT (Tabela 5.3). Considerando a biblioteca de clones, 80 das 94 seqüências obtidas apresentaram similaridade menor de 95% com as presentes no banco de dados. Dentre os isolados, dois deles foram classificados apenas até o nível de filo, sete até classe, três até ordem e 11 isolados puderam ser classificados até gênero (Tabela 5.3).

Relacionando as seqüências selecionadas com grupos bacterianos podem ser observadas sete seqüências dentro da ordem Sphingobacteriales, das quais uma não foi classificada em família e seis, dentro da família Sphingomonadaceae, não foram classificadas dentro de gêneros. O grupo das proteobactérias apresentou seis seqüências relacionadas com possíveis novos grupos bacterianos, sendo uma relacionada com possível nova classe, uma com possível nova família e quatro com possíveis novos gêneros, dentro das famílias Xanthomonadaceae (dois isolados), Bradyrhizobiaceae (um isolado) e Phyllobacteriaceae (um isolado).

Adicionalmente, dentro do filo Verrucomicrobia, cinco seqüências foram obtidas, sendo uma não classificada dentro das classes conhecidas, e quatro não relacionadas com as ordens componentes da classe Verrucomicrobiae. Outros grupos bacterianos representados nas seqüências selecionadas foram as classes Actinobacteria e Flavobacteria.

Apesar de todas estas observações não foi possível estabelecer correlações entre a obtenção de isolados classificados como novos grupos taxonômicos bacterianos e os meios de cultura utilizados.

Tabela 5.3 -

Isolados de diferentes meios de cultura com classificação possivelmente relacionada a grupos bacterianos não descritos. As sequências selecionadas apresentaram similaridades inferiores à 95% com as sequências presentes no banco de dados do *Ribosomal Data Project II*

Isolado	Meio de isolamento	Melhor correspondência	Similaridade (%)	Classificação (nível)
fR1	R2A	<i>Arthrobacter methylotrophus</i>	86,63	Actinobacteria (classe)
fR28	R2A	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	84,65	Verrucomicrobia (filo)
fR38	R2A	<i>Lysobacter antibioticus</i>	92,98	Xanthomonadaceae (família)
fR45	R2A	<i>Flavobacterium ferrugineum</i>	85,07	Flavobacteria (classe)
fR4	R2A	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	94,23	Phyllobacteriaceae (família)
fR66	R2A	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	93,95	Sphingomonadaceae (família)
fR72	R2A	<i>Sphingobium amiense</i>	94,82	Sphingomonadaceae (família)
fR65	R2A	<i>Modestobacter multiseptatus</i>	90,83	Actinomycetales (ordem)
fO33	OL	<i>Pedobacter piscium</i>	91,96	Sphingobacteriales (ordem)
fO53	OL	<i>Pedobacter africanus</i>	92,26	Sphingobacteriaceae (família)
fO62	OL	<i>Pedobacter africanus</i>	93,81	Sphingobacteriaceae (família)
fO77	OL	<i>Pantoea agglomerans</i>	84,65	Proteobacteria (filo)
fOAG4	OL	<i>Pedobacter piscium</i>	92,78	Sphingobacteriaceae (família)
fOAG5	OL	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	86,39	Verrucomicrobiae (classe)
fC20	CAT	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	86,45	Verrucomicrobiae (classe)
fC48	CAT	<i>Xanthomonas codiae</i>	94,26	Xanthomonadaceae (família)
fC72	CAT	<i>Pantoea agglomerans</i>	89,54	Gammaaproteobacteria (classe)
fC11	CAT	<i>Flavobacterium ferrugineum</i>	93,19	Flavobacteriaceae (família)
fZ35	REXT	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	89,85	Verrucomicrobiae (classe)
fZ48	REXT	<i>Flavobacterium omnivorum</i>	91,26	Flavobacteriales (ordem)
fZ70	REXT	<i>Pedobacter africanus</i>	94,25	Sphingobacteriaceae (família)
fZNB5	REXT	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	86,10	Verrucomicrobiae (classe)
fZNCH7	REXT	<i>Balneimonas flocculans</i>	93,02	Bradyrhizobiaceae (família)

5.2.3 Discussão

A rizosfera de plantas é um ambiente ainda distante de ser completamente compreendido e manipulado. A grande diversidade bacteriana presente neste ambiente é o principal fator que determina esta complexidade, onde diferentes espécies interagem e respondem de forma conjunta as alterações do ambiente. A limitação no cultivo de espécies bacterianas em condições de laboratório é um dos principais fatores para estudos da diversidade bacteriana da rizosfera de plantas. Para solucionar este problema, o desenvolvimento de novos meios e condições de cultivo devem ser avaliados para melhor acessar isolados das diferentes espécies componentes desta comunidade.

No ambiente, as bactérias estão sujeitas a alteração de diferentes fatores como a disponibilidade de nutrientes, teor de oxigênio, limitação na disponibilidade de água, temperaturas e pHs extremos e radiações. Mimetizar as condições encontradas no ambiente natural é uma alternativa para obter maior culturabilidade de populações bacterianas (HAMAKI et al., 2005).

Neste capítulo três novos meios de cultivo foram utilizados no isolamento da comunidade bacteriana da rizosfera de plantas de batata, sendo comparados com o meio de cultivo comumente utilizado R2A. Os novos meios de cultivo avaliados baseiam-se na baixa disponibilidade de nutrientes e na suplementação com moléculas que podem ser essenciais no desenvolvimento de bactérias da rizosfera. Como resultado, os meios avaliados apresentaram maiores porcentagens de cultivo da comunidade total. Estas diferenças foram mais evidentemente observadas nos meios CAT e REXT, com valores 3 a 4 vezes maiores do que o obtido no meio de cultivo R2A.

A literatura mostra o cultivo de novos grupos bacterianos presentes no solo quando o período de cultivo é estendido, como por exemplo durante 12 semanas (JANSSEN et al., 2002). Entretanto, também utilizando amostras de solo, Hamaki et al. (2005) descrevem o cultivo de diferentes espécies de bactérias e actinomicetos, utilizando o período de cultivo de duas semanas em meio de cultivo contendo extrato de solo. Os autores destacam a presença e a importância das microcolônias observada no meio de cultivo avaliado. Outro trabalho utilizando meio de cultivo com baixa disponibilidade nutricional para o isolamento de bactérias de solo, chegou ao valor de 27% dos isolados classificados como espécies não descritas (JOSEPH et al., 2003). A baixa disponibilidade de nutrientes deve atuar na limitação da produção de metabólitos secundários por

parte das espécies de crescimento rápido, que podem posteriormente inibir o desenvolvimento de colônias de crescimento lento.

Neste capítulo são apresentados dados que corroboram com a literatura, sendo encontrada maior densidade bacteriana em meios de cultivo com baixa disponibilidade de nutrientes, além da presença de microcolônias exclusivamente nestes meios de cultivo. Entretanto o seqüenciamento parcial do gene 16S ribossomal destas microcolônias revelou não existir uma grande diversidade nesta fração da comunidade bacteriana, sendo esta principalmente formada por isolados do gênero *Flavobacterium*. Esta baixa diversidade pode estar ligada a dificuldade na manutenção por repicagem e na amplificação dos genes ribossomais destas microcolônias, levando tanto a uma baixa amostragem (27 colônias) e em uma seleção para os grupos de mais fácil amplificação por PCR de colônia.

Após a observação de maiores contagens nos meios de cultivo CAT e REXT a questão que surgiu foi se as diferenças observadas são devido ao aumento de cultivo de células de uma mesma espécie, ou se diferentes grupos bacterianos haviam sido isolados nos novos meios de cultivo avaliados. As análises de diversidade, riqueza, rarefação e correlação responderam esta questão de forma eficiente. De maneira geral, as comunidades bacterianas isoladas nos diferentes meios de cultivo parecem ser em parte distintas, ou seja, além de um grupo de espécies facilmente isoladas em todos os meios de cultivo, cada um dos meios apresenta isolamento preferencial para determinados grupos bacterianos.

A análise das seqüências permitiu estimar a diversidade e a riqueza de espécies isoladas em cada um dos meios de cultivo. Inicialmente, a presença de um grande número de espécies foi verificada na amostra inicial (biblioteca), onde o valor estimado é de 1871 diferentes filotipos, considerando 100% de similaridade para determinar os filotipos (Tabela 5.2). Este valor indica a seleção que existe para que as espécies sejam componentes da comunidade bacteriana da rizosfera, uma vez que em amostras de solo este número é maior. O valor do índice Chao1 para solo varia entre 6 e 10 mil diferentes filotipos (TORSVIK; OVREAS; THINGSTAD, 2002). Desta maneira apenas um terço destas espécies apresenta a capacidade de compor o ambiente rizosférico, que é um ambiente de alta competição entre os grupos bacterianos. Outras comunidades bacterianas que tiveram seu número total de filotipos estimados pelo índice Chao1 são: a comunidade de folhas de árvores da mata Atlântica, que têm 400 filotipos bacterianos em cada espécie de árvore, dentre os quais muitos grupos bacterianos não cultiváveis ou não

descritos anteriormente (LAMBAIS et al., 2006). Adicionalmente este índice foi utilizado para estimar a diversidade da comunidade bacteriana do oceano, descrita por Sogin et al. (SOGIN et al., 2006), que estimou entre sete e 21 mil seqüências diferentes pertencentes a espécies ainda inexploradas.

Entretanto, em meios de cultivo este índice não foi ainda utilizado, mas neste estudo alguns valores são indicados (Tabela 5.2), revelando diferenças em número de seqüências, de espécies e de gêneros isolados nos meios de cultivo utilizados. Enquanto que nos meios R2A e CAT um menor número de filotipos foi obtido, nos meios CAT e REXT estes valores foram maiores. Considerando também os maiores valores de diversidade encontrados nestes meios de cultivo, os dados corroboram com a idéia de que a baixa disponibilidade de nutrientes permite o isolamento de um maior número de bactérias.

A análise de rarefação demonstrou as mesmas tendências nos diferentes níveis de similaridade. No entanto, quando o nível de similaridade de 95% foi utilizado para determinação do número de filotipos (no nível de gênero), a análise mostrou que um número similar de gêneros pode ser isolado em cada um dos meios de cultivo. Esta observação pode indicar a princípio que o mesmo grupo de gêneros bacterianos é isolado em todos os meios de cultivo, sendo as diferenças observadas principalmente devido ao isolamento de diferentes espécies de um mesmo gênero nos meios de cultivo avaliados. No entanto, o gráfico de DCA demonstra que apesar de o número de gêneros isolados serem similares entre os diferentes meios de cultivo, este grupo de gêneros difere em grande parte quando os meios de cultivo são comparados. Dentre as diferenças é evidente o efeito da suplementação do meio OL com catalase (CAT) ou com extrato de rizosfera (REXT). Estes três meios, apesar de terem a mesma base nutricional, diferem na comunidade bacteriana isolada, o que mostra que a adição de moléculas, mesmo que em baixa concentração afeta diretamente o isolamento bacteriano. Nesta análise também é possível explorar o aumento da amostragem resultante da utilização de meios de cultura adicionais no isolamento da comunidade bacteriana da rizosfera de plantas de batata. Se apenas o meio de cultura R2A for utilizado teremos amostrados 21 gêneros bacterianos, sendo que se adicionalmente usarmos o meio REXT este número sobe para 35. O meio REXT é o responsável por maior aumento na amostragem da diversidade em combinação com os diferentes meios com valores de 35 e 33 gêneros, quando combinados com os meios de cultivo OL e CAT, respectivamente. As combinações dos outros meios de cultivo levam à uma menor amostragem

da diversidade, com valores de 24 gêneros para R2A com CAT e 28, para a combinação OL com CAT.

Considerando os gêneros preferencialmente isolados nos meios de cultivo, pode ser observado o efeito da mimetização das condições ambientais no isolamento de bactérias da rizosfera, visto que os gêneros *Methylobacterium*, *Rhizobium*, *Afpia* estão altamente correlacionados com o meio REXT bactérias de solo como *Bacillus*, *Variovorax*, *Sphingopyxis* entre outros estão associados ao meio OL. Em relação ao meio CAT, a adição de catalase parece selecionar os gêneros *Microbacterium*, *Nocardioideis*, *Flavobacterium*, *Ramulobacter*, *Alterococcus* e *Caulobacter*, o que explica a baixa diversidade detectada na análise de seqüências de isolados obtidos neste meio de cultivo. Por fim, quando o meio R2A é considerado, a ocorrência de gêneros mais comumente isolados e estudados é observada, como por exemplo, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas* e *Agrobacterium*.

Dentre as seqüências obtidas dos isolados podem ser observadas seqüências com baixa similaridade com as provenientes de grupos bacterianos conhecidos, sendo estas possivelmente relacionadas com frações ainda não conhecidas da árvore filogenética do domínio Bacteria. De maneira geral, neste trabalho 23 seqüências obtidas mostraram baixa similaridade com as descritas (<95%), sendo que estas podem indicar duas novas classes, sete novas ordens, três novas famílias e 11 novos gêneros bacterianos. No entanto, por este estudo se basear apenas no seqüenciamento parcial do gene 16S DNAr, estudos posteriores devem utilizar estes mesmos isolados para melhor caracterização e possivelmente aplicar classificações taxonômicas polifásicas para determinar a filogenia destes isolados. Vale também ressaltar a obtenção de isolados selecionados a partir do meio de cultura R2A, o que pode indicar que mesmo neste meio de cultura, comumente utilizado no isolamento de comunidades bacterianas, não foi explorada toda a diversidade cultivável bacteriana.

Os dados gerados neste trabalho indicam que não foi possível isolar a diversidade total encontrada nos clones provenientes da biblioteca construída a partir de DNA do solo. No entanto, cada um dos meios de cultivo avaliados mostrou ser capaz de isolar determinada fração da comunidade bacteriana total da rizosfera de plantas de batata. Desta maneira, para acessar o máximo possível da diversidade total de amostras ambientais, a combinação de vários meios de cultivo parece ser a melhor alternativa. Como observação final, vale ressaltar que mimetizar as condições ambientais, como feito neste trabalho com os meios de cultivo OL e REXT, pode levar

ao isolamento de grupos específicos componentes da comunidade bacteriana total de diferentes ambientes.

Referências

- BLOEM, J.; VENINGA, M.; SHEPHERD, J. Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes, and frequencies of dividing cells by confocal laser-scanning microscopy and image analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 926-936, 1995.
- BRUNS, A.; CYPIONKA, H.; OVERMANN, J. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3978-3987, 2002.
- BRUNS, A.; NUBEL, U.; CYPIONKA, H.; OVERMANN, J. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1980-1989, 2003.
- EILERS, H.; PERNTHALER, J.; GLOCKNER, F.O.; AMANN, R. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3044-3051, 2000.
- FELSKE, A.; WOLTERINK, A.; VAN LIS, R.; DE VOS, W.M.; AKKERMANS, A.D.L. Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 30, p. 137-145, 1999.
- FROHLICH, J.; KONIG, H. New techniques for isolation of single prokaryotic cells. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, p. 567-572, 2000.
- HAMAKI, T.; SUZUKI, M.; FUDOU, R.; JOJIMA, Y.; KAJIURA, T.; TABUCHI, A.; SEM, K.; SHIBAI, H. Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 99, p. 485-492, 2005.
- JANSSEN, P.H.; YATES, P.S.; GRINTON, B.E.; TAYLOR, P.M.; SAIT, M. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 2391-2396, 2002.
- JOSEPH, S.J.; HUGENHOLTZ, P.; SANGWAN, P.; OSBORNE, C.A.; JANSSEN, P.H. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7210-7215, 2003.
- LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BULL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**, Washington, v. 312, p. 1917-1917, 2006.
- MIZUNOE, Y.; WAI, S.N.; TAKADE, A.; YOSHIDA, S. Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H₂O₂ degrading compounds. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 172, p. 63-67, 1999.
- RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M.H.; VAN ELSAS, J.D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, p. 219-235, 2006.

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

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 12115-12120, 2006.

STEVENSON, B.S.; EICHORST, S.A.; WERTZ, J.T.; SCHMIDT, T.M.; BREZNAK, J.A. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 4748-4755, 2004.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T.F. Prokaryotic diversity - Magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, Washington, v. 296, p. 1064-1066, 2002.

TYSON, G.W.; BANFIELD, J.F. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, p. 411-415, 2005.

ZENGLER, K.; WALCHER, M.; CLARK, G.; HALLER, I.; TOLEDO, G.; HOLLAND, T.; MATHUR, E.J.; WOODNUTT, G.; SHORT, J.M.; KELLER, M. (2005) High-throughput cultivation of microorganisms using microcapsules. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 397. pp. 124-

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As comunidades bacterianas são encontradas em associação com todas as espécies vegetais conhecidas, colonizando as partes externas e internas das plantas, onde podem desempenhar várias funções que resultam em vantagens à planta hospedeira. A regulação desta interação envolve muitos fatores bióticos e abióticos, os quais quando alterados, causam modificações na composição qualitativa e quantitativa destas comunidades. No presente trabalho, alguns destes fatores foram avaliados, alterando as composições de comunidades bacterianas associadas a diferentes espécies vegetais (tabaco, eucalipto e batata).

Inicialmente no capítulo 2, o estágio de desenvolvimento das plantas de tabaco mostrou ser um fator mais importante do que os genótipos de plantas avaliados (WT, CAB1, CAB2 e TRP) na determinação da composição das comunidades bacterianas da rizosfera e do rizoplane. No entanto, o efeito do cultivo de plantas de genótipos diferentes foi observado em plantas em estágio vegetativo de desenvolvimento, o que mostra que os compostos liberados por raízes em desenvolvimento alteram a composição das comunidades bacterianas. Porém, como o efeito observado foi temporal, não sendo observado na amostragem de plantas em estágio de florescimento, é sugerido que a resiliência do solo é capaz de recompor a diversidade bacteriana associada à rizosfera quando as raízes das plantas apresentam menor atividade.

Considerando plantas de eucalipto carregando e expressando o mesmo gene exógeno, no capítulo 3 não apenas a presença ou não do transgene mas também o evento de inserção foram avaliados como fatores determinantes na composição das comunidades de bactérias associadas à rizosfera e ao rizoplane das plantas de eucalipto. Adicionalmente, foram utilizados dois distintos clones de eucalipto não transgênicos. Como resultado foi observado que as comunidades bacterianas são alteradas de maneira similar pela alteração do genótipo das plantas, seja esta alteração envolvendo a presença genes exógenos ou não, simplesmente comparando plantas com diferentes genótipos, porém não transgênicas. Em relação às frações das comunidades acessadas (α -proteobactérias, β -proteobactérias e actinomicetos) foi observado que os grupos bacterianos componentes da classe das α -proteobactérias respondem de maneira mais evidente a alteração do genótipo das plantas de eucalipto, com separação das amostras de diferentes plantas em amostras de rizosfera e rizoplane. As demais comunidades acessadas respondem principalmente quando presentes na rizosfera das plantas avaliadas. O fato de α -proteobactérias serem afetadas pela

alteração do genótipo das plantas foi comprovado pela inibição da população de *Methylobacterium* spp. em plantas TR-15. A análise por meio de seqüenciamento de clones de duas bibliotecas mostrou que nestas plantas ocorreu uma substituição desta população bacteriana por meio do aumento de outras populações bacterianas presentes neste nicho. A especificidade da inibição apenas em plantas TR-15 mostra que diferentes linhagens transgênicas carregando um mesmo gene exógeno podem atuar de maneira diferente sobre as comunidades bacterianas associadas às plantas.

No capítulo 4, mais fatores foram considerados conjuntamente para determinar quais os principais determinantes da composição de comunidades bacterianas que colonizam a raiz ou endofiticamente o caule de plantas de batata de três diferentes cultivares. A inoculação de três diferentes bactérias previamente isoladas como endofíticas mostrou que a densidade de colonização das plantas e os efeitos na composição das comunidades é específica, onde a linhagem P9^{TP} de *P. putida* mostrou desempenho superior às demais na colonização e nas alterações causadas, comparadas às observadas pelo cultivo de plantas de diferentes cultivares. Considerando o nicho ocupado por bactérias do gênero *Pseudomonas* em plantas de batata, quando inoculada, a linhagem P9^{TP} foi capaz de ocupar totalmente este nicho, em detrimento das espécies observadas em plantas controle. Adicionalmente neste capítulo, foi demonstrado que a colonização de plantas por *P. putida* endofítica causa pequenas alterações no perfil metabólico da planta hospedeira, sendo por volta de 1% dos picos quantificados diferencialmente em plantas inoculadas e controles.

Além dos fatores que determinam a composição de comunidades bacterianas no ambiente, a metodologia utilizada para estudar estas comunidades pode alterar de forma significativa o estudo das mesmas. Apesar de todas as técnicas moleculares, que permitem o estudo destas comunidades de maneira independente de cultivo, melhores métodos de isolamento são altamente desejáveis. No capítulo 5 diferentes meios de cultivo são avaliados quanto a capacidade de isolar maior número e diversidade das bactérias que compõem a comunidade da rizosfera de plantas de batata. Dentre os meios de cultivo que apresentaram melhores resultados, os meios CAT e REXT levaram ao isolamento de maiores números de colônias, enquanto que maiores diversidades foram isoladas nos meios OL e REXT. Desta maneira, o meio que mimetiza o ambiente rizosférico mostrou resultados promissores para melhor acessar a comunidade bacteriana da rizosfera de plantas de batata.

Concluindo, neste trabalho o genótipo das plantas, transgênicas ou não, o estágio de desenvolvimento das plantas, a inoculação de bactérias e a metodologia de isolamento foram avaliados, descrevendo o efeito de cada um destes fatores na composição das comunidades bacterianas. No entanto, no ambiente, estes fatores interagem entre si, determinando de maneira conjunta, a composição qualitativa e quantitativa das comunidades bacterianas associadas às plantas.

ANEXOS

Anexo A – Número de seqüências obtidas a partir de clones da biblioteca 16S e dos isolados em diferentes meios de cultivo dentre os diferentes gêneros bacterianos

(continua)

Gênero	Biblioteca 16S	R2A	OL	CAT	REXT	Total
<i>Acetivibrio</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Acetobacter</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Acidithiobacillus</i>	3	0	0	0	0	3
<i>Acidovorax</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Afipia</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Agrobacterium</i>	0	2	0	0	1	3
<i>Agrococcus</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Agromyces</i>	0	5	3	0	2	10
<i>Alterococcus</i>	2	0	0	3	0	5
<i>Anaerolinea</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Anaeromyxobacter</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Ancylobacter</i>	0	0	0	0	2	2
<i>Aquabacterium</i>	2	0	0	0	0	2
<i>Arthrobacter</i>	2	1	3	0	2	8
<i>Azoarcus</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Bacillus</i>	2	0	3	0	1	6
<i>Balneimonas</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Bartonella</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Bosea</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Bradyrhizobium</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Burkholderia</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Caulobacter</i>	0	0	0	1	0	1
<i>Cellulomonas</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Collimonas</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Conexibacter</i>	4	0	0	0	0	4
<i>Curvibacter</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Desulfacinum</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Desulfobulbus</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Desulfuromonas</i>	2	0	0	0	0	2
<i>Desulfuromusa</i>	2	0	0	0	0	2
<i>Duganella</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Dyadobacter</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Enhygromyxa</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Ensifer</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Erwinia</i>	0	0	3	1	0	4
<i>Flavobacterium</i>	7	5	11	16	10	49
<i>Gemmata</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Gemmatimonas</i>	5	0	0	0	0	5
<i>Geobacter</i>	6	0	0	0	0	6
<i>Haloferox</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Halothiobacillus</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Herbaspirillum</i>	0	0	1	0	0	1

ANEXO A – Número de seqüências obtidas a partir de clones da biblioteca 16S e dos isolados em diferentes meios de cultivo dentre os diferentes gêneros bacterianos

(continuação)						
<i>Gênero</i>	Biblioteca 16S	R2A	OL	CAT	REXT	Total
<i>Hipaea</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Hyphomicrobium</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Lactobacillus</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Legionella</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Leptothrix</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Lysobacter</i>	0	1	1	0	0	2
<i>Mesorhizobium</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	0	2	2
<i>Microbacterium</i>	0	2	3	3	3	11
<i>Modestobacter</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Mycobacterium</i>	1	0	0	0	1	2
<i>Nitrosomonas</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Nitrosospira</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Nitrospina</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Nocardioides</i>	0	0	1	1	4	6
<i>Novosphingobium</i>	1	1	0	2	0	4
<i>Paenibacillus</i>	1	1	0	1	0	3
<i>Paucimonas</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Pedobacter</i>	0	0	5	0	1	6
<i>Pelobacter</i>	5	0	0	0	0	5
<i>Phenylobacterium</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Phyllobacterium</i>	0	1	0	0	1	2
<i>Pseudomonas</i>	1	2	0	4	1	8
<i>Ramlibacter</i>	1	0	0	1	0	2
<i>Rhizobium</i>	0	1	2	1	3	7
<i>Roseateles</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Skermanella</i>	2	0	0	0	0	2
<i>Solirubrobacter</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Sphingobium</i>	1	5	1	2	5	14
<i>Sphingomonas</i>	0	1	3	0	0	4
<i>Sphingopyxis</i>	0	1	3	1	0	5
<i>Spirillospora</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Sporobacterium</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Sporocytophaga</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Sporosarcina</i>	0	0	0	0	1	1
<i>Stenotrophomonas</i>	2	2	0	0	0	4
<i>Streptomyces</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Syntrophus</i>	2	0	0	0	0	2
<i>Terrabacter</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Thermodesulfovibrio</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Thermomonas</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Thiobacillus</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Thiobacter</i>	1	0	0	0	0	1

ANEXO A – Número de seqüências obtidas a partir de clones da biblioteca 16S e dos isolados em diferentes meios de cultivo dentre os diferentes gêneros bacterianos

						(conclusão)
<i>Gênero</i>	Biblioteca 16S	R2A	OL	CAT	REXT	Total
<i>Thiocapsa</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Tissierella</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Ureaplasma</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Variovorax</i>	2	1	3	1	1	8
<i>Verrucomicrobium</i>	0	1	1	1	2	5
<i>Wautersia</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Xanthomonas</i>	0	2	1	1	0	4
<i>Xylophilus</i>	0	0	3	0	1	4
Número de gêneros	61	21	22	16	25	93
Cobertura (C)*	0,26	0,38	0,55	0,38	0,40	0,41

*Cobertura (C) = $1-(n/N)$, onde n é o número de gêneros com apenas uma ocorrência e N é o número total de gêneros observados.