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

**Descrição da comunidade microbiana associada à rizosfera de
cana-de-açúcar**

Diogo Paes da Costa

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2012**

Diogo Paes da Costa
Engenheiro Agrônomo

**Descrição da comunidade microbiana associada à rizosfera de
cana-de-açúcar**

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO DINI ANDREOTE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

**Piracicaba
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Costa, Diogo Paes da

Descrição da comunidade microbiana associada à rizosfera de cana-de-açúcar /
Diogo Paes da Costa. - Piracicaba, 2012.
103 p: il.

Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Cana-de-açúcar 2. Ecologia microbiana 3. Genes 4. Mudança climática 5. Rizosfera
6. RNA ribossômico 7. Sistemas de cultivo I. Título

CDD 633.61
C837d

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

Aos meus Pais, Antônio e Maria,
por me fazerem guardar os conceitos de
amor e retidão

DEDICO

Aos meus irmãos, Bruno e Luana
por me fazerem lembrar
do sagrado conceito da família

OFERECO

AGRADECIMENTOS

São muitos para agradecer, pois sem eles nem o meu trabalho e nem os meus dias seriam os mesmos. Sendo assim, eu agradeço:

À CAPES e a (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e financiamento da pesquisa.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela formação profissional e ética.

À ESALQ pela formação, estrutura e tudo mais que tem me disponibilizado.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote pelos valiosos conselhos, confiança e pronta orientação para a realização do meu trabalho.

A Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral pelos incentivos na carreira científica e preciosos conselhos que fizeram expandir as minhas idéias.

A Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari pelo imediato apoio e colaboração em seu laboratório, no Instituto Oceanográfico (IO) da USP.

Ao Armando (Dias et al.) pelo grande apoio, em amplo sentido, durante a minha estadia em Piracicaba, pelas revisões realizadas no texto e pelas boas idéias trocadas.

Ao Ademir Durrer pelo grande apoio em todas as etapas de meu trabalho e também pelas valiosas lições aprendidas em nossos diálogos, principalmente sobre verdadeiras amizades.

Ao Pedro Andrade pela colaboração no meu trabalho e pela grande amizade desde os períodos de Graduação.

Ao Thiago Gumiere pela ajuda na parte experimental e por ser um amigo que me ajudou a desenvolver mais ainda o conceito de “respeitar as diferenças”.

À Denise Mescolotti ao Fernando Baldesin pela amizade e excelente trabalho prestado no laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ.

À Daniela Vilela e a Rosa pela imensa colaboração prestada no IO e por serem pessoas tão dedicadas e prestativas no desenvolvimento da ciência.

À Luana Lira pela amizade e compreensão nos momentos mais improváveis.

Ao Dig (Fábio Soares) pelo apoio nos momentos iniciais em que cheguei em Piracicaba e pelos momentos de descontração e amizade.

A Emiliana Romagnolli pela amizade, confiança e apoio em muitos momentos importantes.

A Joelma pela grande simpatia, amizade e coração maior ainda, além dos momentos de descontração.

As todas as colegas que fazem parte do Laboratório de Microbiologia e do grupo de pesquisa do Prof. Fernando: Júlia Lima, Juliana, Millene, Maryeimy, Danice (Metal), Cristiane Cupolla e Danielle Santos.

Ao Josh e ao Diego Genuário pelo apoio e convivência no início da minha estadia em Piracicaba.

A Elisa Matos e a Pilar Mariani pela ajuda no experimento.

Aos amigos da Igreja Adventista do Sétimo Dia, por me fazerem enxergar verdades maravilhosas e por compartilharem de grandes mudanças na minha vida.

Ao Ricardo, à Evani e ao Alexandre Rezende pelo grande apoio e caloroso carinho prestados. Sem eles muito do que sou hoje não estaria em mim.

À Adriana França pela grande amizade, compreensão e apoio no dia de Shabbat e fora dele.

Aos amigos da Beth B'nei Tsion: Glédson, à Mari, ao Renato, à Carol, ao Eric e a tantos outros pela amizade, pelos ensinamentos e por compartilharem comigo do mesmo espírito Yehudi.

A muitos outros que não estão nessa lista, mas que, sem dúvida, de algum modo foram chaves preciosas para a realização desse trabalho e para o meu crescimento profissional e pessoal.

O MEU MUITO OBRIGADO!!!

*Bendito sejas, Adonai, nosso Deus, Rei do Universo, que dás
a Torah da verdade e as boas-novas da salvação a seu povo Yisrael e a
todos os povos mediante seu Filho Yeshua, o Mashiach, nosso Senhor.*

*[Baruch atah Adonai eloheinu, melek ha'olam asher noten
torat-emet uv'sorat-yeshu'ah le'amo Yisra'el ul'khol ha'amim
al-y'dei b'no Yeshua Hamashiach adoennu.]*

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 DESENVOLVIMENTO	23
2.1 Revisão bibliográfica	23
2.1.1 A cana-de-açúcar	23
2.1.2 O carbono no solo	25
2.1.3 Micro-organismos associados à cana-de-açúcar	28
2.1.4 A metodologia do SIP (Stable Isotope Probing)	31
2.2 Materiais e Métodos	35
2.2.1 Estudo da Estrutura e diversidade bacteriana associada a cana-de-açúcar	35
2.2.1.1 Obtenção do material vegetal e preparo das amostras	35
2.2.1.2 Extração de ácidos nucleicos	36
2.2.1.3 Análise da estrutura bacteriana por meio da técnica de PCR-DGGE ...	36
2.2.1.4 Análises multivariadas dos dados de estrutura bacteriana	38
2.2.1.5 Análise da diversidade filogenética por Ion Torrent™	40
2.2.1.6 Metodologias de bio-informática para avaliação dos dados do sequenciamento	40
2.2.2 Análise da diversidade microbiana por meio da técnica de SIP	42
2.2.2.1 Amostragem do material vegetal	42
2.2.2.2 Plantio das gemas e obtenção dos perfilhos	42
2.2.2.3 Incubação das plantas em dióxido de carbono (CO ₂)	43
2.2.2.4 Enriquecimento das plantas com ¹³ CO ₂	45
2.2.2.5 Extração e preparo das amostras de DNA da rizosfera	46
2.2.2.6 Separação do DNA total por ultracentrifugação	47
2.2.2.7 Fracionamento dos gradientes de centrifugação	47
2.2.2.8 Precipitação do DNA das frações do gradiente	48
2.2.2.9 Amplificação do genoma inteiro	49
2.2.2.10 Análise da estrutura bacteriana da rizosfera por meio de PCR-DGGE	49
2.2.2.11 Análises multivariadas dos dados de estrutura bacteriana	50
2.3 Resultados e Discussões	51

2.3.1 Diversidade microbiana associada a variedades de cana-de-açúcar.....	51
2.3.1.1 Análise dos perfis gerados de DGGE.....	51
2.3.1.2 Estudo da diversidade bacteriana na rizosfera de cana-de-açúcar por meio de sequenciamento via Ion Torrent™	57
2.3.2 Análise da estrutura de bactérias e fungos por meio de SIP.....	67
2.3.2.1 Resultados dos testes de respiração das plantas	67
2.3.2.2 Rotulagem das plantas com $^{13}\text{CO}_2$	70
2.3.2.3 Resultados da centrifugação e fracionamento das amostras	71
2.3.2.4 Amplificação do DNA total.....	75
2.3.2.5 Avaliação da comunidade de bactérias e fungos por PCR-DGGE.....	76
3 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS.....	93

RESUMO

Descrição da Comunidade Microbiana Associada à Rizosfera de Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar é uma cultura importante no contexto agrário brasileiro, sobretudo com relação a manutenção e sustentabilidade dos agroecossistemas e da biodiversidade do solo. As comunidades microbianas associadas à cana-de-açúcar são participantes da manutenção dos ciclos biogeoquímicos, podendo ter sua estrutura e diversidade alteradas por mudanças no manejo da cultura e nas condições climáticas. Esse estudo teve como objetivo avaliar a diversidade microbiana associada à rizosfera de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e empregar a metodologia de *Stable Isotope Probing* (DNA-SIP) para se avaliar a estrutura dos grupos responsivos a este ambiente. Para tanto, variedades de cana-de-açúcar foram selecionadas, extraíndo-se o DNA total rizosférico e do *bulk soil* para análise por PCR-DGGE das regiões do gene 16S rDNA de bactérias, selecionando-se amostras representativas para o sequenciamento da região V6 do gene 16S rDNA através da plataforma *Ion Torrent™*. Os resultados demonstraram diferenças entre a diversidade das comunidades microbianas da rizosfera e do *bulk soil*, havendo a predominância dos grupos *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Acidobacteria*. Para o estudo da estrutura dos grupos responsivos na rizosfera, plantas da variedade RB86-7515 foram cultivadas sob duas concentrações de CO₂ (350 e 700 ppm), realizando-se o enriquecimento com ¹³CO₂, e posteriormente realizando a extração do DNA rizosférico para aplicação na técnica de DNA-SIP. A eficiência desta técnica foi avaliada por meio da técnica de PCR-DGGE para as regiões 16S rDNA de bactérias e ITS de fungos, onde foi verificado que após 48 horas já ocorre a incorporação de ¹³C pelas comunidades microbianas, havendo diferença entre os grupos que incorporaram o ¹³C. Diferenças foram também observadas para as distintas concentrações de CO₂, indicando o DNA-SIP como uma poderosa ferramenta de estudos da ecologia das comunidades microbianas na rizosfera de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Mudanças climáticas; Métodos independentes de cultivo; Genes ribossomais; Stable Isotope Probing

ABSTRACT

Description of Microbial Community in the Rhizosphere of Sugarcane

The sugarcane is an important crop in Brazilian agrarian context, especially in respect to maintenance and sustainability of agroecosystems and soil biodiversity. The microbial communities associated to sugarcane are involved biogeochemical cycles processes and it may have their structure and diversity changed due to crop management and climatic conditions. The aim of this study was to evaluate the microbial diversity associated to the rhizosphere of different sugarcane's genotypes and employ the *Stable Isotope Probing* technique (DNA-SIP) to evaluate the structure of the groups that are responding to this environment attributes. Therefore, some sugarcane varieties were selected and the total DNA in bulksoil and rhizosphere for analysis by PCR-DGGE of 16S rDNA gene regions of bacteria was extracted, selecting representative samples for sequencing the 16S rDNA gene of V6 region by *Ion Torrent*™ platform. The results showed differences between the diversity of microbial communities in the rhizosphere and bulk soil, with the predominance of *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Acidobacteria* groups. To study the structure of the responsive rhizosphere groups, the genotype RB86-7515 were grown under two CO₂ concentrations (350 and 700 ppm), performing the ¹³CO₂ enrichment. Afterwards, was performed the extraction of DNA for application of the SIP-rhizosphere DNA technique. The efficiency of this technique was assessed by PCR-DGGE over the regions of bacteria 16S rDNA and fungi ITS, which of these showed that occurs after 48 hours the incorporation of ¹³C by microbial communities, and it elucidate differences between the groups that incorporate the ¹³C. These differences were also observed for those different CO₂ concentrations, indicating that the DNA-SIP is a powerful tool for studies of the ecology of microbial communities in the rhizosphere of sugarcane.

Keywords: Climate change; Cultivation-independent methods; Ribosomal genes; Stable Isotope Probing

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Cultivo de plantas de cana-de-açúcar em cuba acrílica aos três meses após o plantio, sob diferentes concentrações de CO₂ mantidas em casa de vegetação climatizada 44
- Figura 2 - Análise de dendogramas, por meio da técnica de PCR-DGGE, evidenciando diferenças entre as comunidades bacterianas colonizadoras do *bulk soil* (em vermelho) e da rizosfera (em azul) de diferentes variedades de cana-de-açúcar: RB86-7515; PO8862; RB85-5156; RB85-5453; SP5541; e SP5543. Os prefixos 'S' e 'R' significam bulk soil e rizosfera, respectivamente. Os grupos bacterianos foram acessados da comunidade total através de primers específicos para o grupo das bactérias totais (A), *α-proteobacteria* (B) e *β-proteobacteria* (C). Análises feitas no software PAST 1.90 52
- Figura 3 - Análise de componentes principais (PCA) para a matriz de similaridade (Bray-Curtis) das variedades de cana-de-açúcar obtidas por meio da técnica de PCR-DGGE, evidenciando diferenças entre as comunidades bacterianas colonizadoras do bulk soil e da rizosfera de diferentes variedades de cana-de-açúcar: RB7515; PO8862; RB85-5156 (C7III); RB85-5453 (C7V); SP5541 (D8); e SP5543 (D9). Os prefixos 'S' e 'R' significam bulk soil e rizosfera de cana-de-açúcar, respectivamente. Bactérias totais (16S rDNA), (A) *α-proteobacteria* (B) e *β-proteobacteria* (B). Análises feitas no software PAST 1.90..... 53
- Figura 4 - Análise de coordenadas principais (PCoA) para os grupos formados com base na análise de DGGE para comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA): a1 -> Rizosfera das variedades RB85-5156, SP5543, RB86-7515 e PO8862; a2 -> *Bulk soil* das variedades SP5541, RB85-5453, RB85-5156 e SP5543; a3 -> *Bulk soil* das variedades RB86-7515 e PO8892; a4 -> Rizosfera das variedades RB85-5453 e SP5541. Análises feitas no software PAST 1.90 56
- Figura 5 - Diversidade dos principais filos bacterianos, obtidos a partir dos dados da matriz de unidades taxonômicas operacionais (UTOs), para as diferentes variedades de cana-de-açúcar e seus respectivos nichos ecológicos: Rizosfera da variedade RB85-5453 (R1); Rizosfera da variedade RB85-5156

(R2); Rizosfera da variedade RB86-7515 (R3);e *Bulk soil* da variedade RB86-7515 (S). Feito no QIIME 59

Figura 6 – *Heatmap* da classificação filogenética baseada nos agrupamento das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs, ID = 70) encontradas em rizosfera e *bulk soil* de diferentes variedades de cana-de-açúcar (RB86-7515, RB85-5156 e RB85-5453) e a seus respectivos nichos ecológicos: Rizosfera da variedade RB85-5453 (R1); Rizosfera da variedade RB85-5156 (R2); Rizosfera da variedade RB86-7515 (R3);e *Bulk soil* da variedade RB86-7515 (S). Feito no QIIME 61

Figura 7 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA), baseada na matriz de distância UniFrac ponderada para OTUs, mostrando diferenças entre a diversidade de *β-proteobacteria* do *bulk soil* com relação à rizosfera de diferentes plantas de cana-de-açúcar: Rizosfera da variedade RB85-5453 (R1); Rizosfera da variedade RB85-5156 (R2); Rizosfera da variedade RB86-7515 (R3);e *Bulk soil* da variedade RB86-7515 (S). Feito no QIIME 63

Figura 8 - Análise de agrupamentos (*heatmap*) baseada nos dados de abundância total das UTOs para os filos (A) e classes (B) e de micro-organismos, encontradas em *bulk soil* e em diferentes rizosferas de variedades de cana-de-açúcar e seus respectivos nichos ecológicos Rizosfera da variedade RB85-5453 (R1); Rizosfera da variedade RB85-5156 (R2); Rizosfera da variedade RB86-7515 (R3);e *Bulk soil* da variedade RB86-7515 (S). Análise feita no software R 2.12 a partir da matriz de UTOs gerada pelo software MOTHUR v.1.7.2 com referência ao bando de dados do RDP..... 64

Figura 9 - Taxa média de fixação de CO₂ por plantas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos, aos 3 meses de idade mantidas a uma concentração atmosférica de CO₂ (350 ppm). A taxa média de fixação do CO₂ foi expressa em função do fotoperíodo com as plantas sendo cultivadas em pleno sol, com a umidade do solo mantida na capacidade de campo (CC) 68

Figura 10 - Esquema ilustrativo representando o enriquecimento de ¹³C nos tecidos vegetais de cana-de-açúcar ao longo dos oito dias de incubação: início da marcação (0); dois dias após a marcação (2s); quatro dias após a marcação (4s); e oito dias após a marcação (8s) 71

- Figura 11 - Curva da densidade buotante (DB) das frações obtidas pelos tubos brancos (controle de qualidade). Pode-se observar a permanência do padrão de homogeneidade do gradiente de centrifugação em solução de CsTFA/GB até a vigésima fração 71
- Figura 12 - Curva do índice de refração (IR) em função da densidade buotante média das frações, obtidas dos tubos brancos, evidenciando alta correlação com o modelo linear ($R=97.46\%$)..... 72
- Figura 13 - Picogramas das frações de DNA pesado e leve obtidas por ultracentrifugação após a aplicação da técnica de DNA-SIP para marcação do DNA das comunidades microbianas da rizosfera de cana-de-açúcar. A) Picograma para o DNA de bactérias associadas às plantas cultivadas em atmosfera de 350 ppm após 8 dias de marcação; B) Picograma para o DNA de bactérias associadas às plantas cultivadas em atmosfera de 700 ppm após 8 dias de marcação. As linhas cheias representam as amostras de DNA leve (^{12}C -DNA), e as pontilhadas às amostras de DNA pesado (^{13}C -DNA), detectado nas frações do gradiente com densidade entre 1,63 a 1,66 g.mL^{-1} 74
- Figura 14 - Amplificação Genoma inteiro das amostras de ^{13}C -DNA, através do kit WGA (Sigma) mostrando alta concentração de DNA entre os fragmentos de 300 a 1000pb. As reações foram corridas em gel de agarose (1%) a 100V por 45 minutos 75
- Figura 15 - Análise da estrutura das comunidades bacterianas da rizosfera de cana-de-açúcar cultivadas em diferentes concentrações de CO_2 (300 e 700 ppm): A) Gel de DGGE com o perfil de bandas amplificadas, para o gene 16S rDNA, mostrando diferenças no padrão de bandas dos perfis entre as estruturas das comunidades de bactérias marcadas e não marcadas com ^{13}C ; B) Dendograma de similaridade evidenciando agrupamento entre as amostras comuns. Análises feitas no software PAST 1.90..... 77
- Figura 16 - Agrupamentos das comunidades de bactérias totais da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar: A) Análise de coordenadas principais (PCoA) com uma explicação total de 37% da variação; B) *Box plot* da diferença entre as estruturas das comunidades de bactérias, obtido com o teste de ANOSIM aplicando o algoritmo de *Bray-Curtis* para amostras marcadas (M) e não

marcadas (C) em diferentes concentrações (350ppm e 700ppm). Análises feitas no software PAST 1.90 78

Figura 17 - Análise de coordenadas principais (PCoA) para os dados das comunidades de bactérias não marcadas com ^{13}C mostrando a variação da estrutura das comunidades bacterianas em função do período de incubação: A) Estrutura das comunidades da rizosfera das plantas incubadas a 350 com explicação de 66,5% da variação; B) Estrutura das comunidades da rizosfera de plantas incubadas a 700 ppm com explicação de 71,4% da variação. Análises feitas no software PAST 1.90 81

Figura 18 - Análise da estrutura das comunidades de fungos da rizosfera de cana-de-açúcar cultivadas em diferentes concentrações de CO_2 (300 e 700 ppm): A) Gel de DGGE com o perfil de bandas amplificadas, para a região ITS, mostrando grande número de bandas com diversas intensidades representando as estruturas de comunidades de fungos marcadas e não marcadas com ^{13}C ; B) Dendograma de similaridade evidenciando agrupamento entre as amostras comuns. Análises feitas no software PAST 1.90 84

Figura 19 - Agrupamentos das comunidades de fungos totais da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar: A) Análise de coordenadas principais (PCoA) com uma explicação total de 25,45% da variação; B) *Box plot* da diferença entre as estruturas das comunidades de fungos, obtido com o teste de ANOSIM aplicando o algoritmo de *Bray-Curtis* para amostras marcadas (M) e não marcadas (C) em diferentes concentrações (350ppm e 700ppm). Análises feitas no software PAST 1.90 85

Figura 20 - Análise de coordenadas principais (PCoA) para os dados das comunidades de bactérias não marcadas com ^{13}C mostrando a variação da estrutura das comunidades bacterianas em função do período de incubação: A) Estrutura das comunidades da rizosfera das plantas incubadas a 350 com explicação de 49,52% da variação; B) Estrutura das comunidades da rizosfera de plantas incubadas a 700 ppm com explicação de 55,48% da variação. Análises feitas no software PAST 1.90 87

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Lista de *primers* utilizados no experimento para a amplificação de diferentes alvos a partir do DNA total.....39
- Tabela 2 - Análise de similaridade de ANOSIM, utilizando o algoritmo de *Bray-Curtis*, para as comunidades de bactérias totais (análise do gene 16S rDNA): Todos os valores de R foram superiores a 75% evidenciando separação entre todos os grupos formados: a1 -> Rizosfera das variedades RB85-5156, SP5543, RB86-7515 e PO8862; a2 -> *Bulk soil* das variedades SP5541, RB85-5453, RB85-5156 e SP5543; a3 -> *Bulk soil* das variedades RB86-7515 e PO8892; a4 -> Rizosfera das variedades RB85-5453 e SP5541. Análises feitas no software PAST 1.9056
- Tabela 3 - Índices de diversidade e riqueza das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) para as quatro amostras representativas selecionadas pelos testes de similaridade entre estruturas de comunidades bactérias totais. As UTOs foram detectadas ao nível de 3% de dissimilaridade58
- Tabela 4 - Valores de R da análise de similaridade de ANOSIM utilizando o algoritmo de *Bray-Curtis* para estudo de distância entre comunidades de bactérias associadas à rizosfera de plantas de cana-de-açúcar: Comunidades marcadas de plantas incubadas a 350 ppm (M3); Comunidades marcadas de plantas incubadas a 700 ppm (M7); Comunidades não marcadas de plantas incubadas a 350 ppm (C3); Comunidades não marcadas de plantas incubadas a 700 ppm (C7). ANOSIM: i) valores: $R > 0,75$ - grupos bem separados; ii) valores: $0,5 < R < 0,75$ - grupos separados com sobreposições; iii) valores $0,25 < R < 0,5$ - grupos parcialmente separados; iv) valores de $R < 0,25$ – ausência de separação entre os grupos, ($p \leq 0,01$)79
- Tabela 5 - Valores de R da análise de similaridade de ANOSIM utilizando o algoritmo de *Bray-Curtis* para comparação da variação na estrutura das comunidades de bactérias não marcadas com ^{13}C ao longo do período de incubação nas atmosferas de 350 ppm e 700 ppm . ANOSIM: i) valores: $R > 0,75$ - grupos bem separados; ii) valores: $0,5 < R < 0,75$ - grupos separados com sobreposições; iii) valores $0,25 < R < 0,5$ - grupos parcialmente separados;

iv) valores de $R < 0,25$ – ausência de separação entre os grupos, ($p \leq 0,01$)	81
--	----

Tabela 6 - Valores de R da análise de similaridade de ANOSIM utilizando o algoritmo de <i>Bray-Curtis</i> para estudo de distância entre comunidades de fungos associadas à rizosfera de plantas de cana-de-açúcar: Comunidades marcadas de plantas incubadas a 350 ppm (M3); Comunidades marcadas de plantas incubadas a 700 ppm (M7); Comunidades não marcadas de plantas incubadas a 350 ppm (C3); Comunidades não marcadas de plantas incubadas a 700 ppm (C7). ANOSIM: i) valores: $R > 0,75$ - grupos bem separados; ii) valores: $0,5 < R < 0,75$ - grupos separados com sobreposições; iii) valores $0,25 < R < 0,5$ - grupos parcialmente separados; iv) valores de $R < 0,25$ – ausência de separação entre os grupos, ($p \leq 0,01$)	86
--	----

Tabela 7 - Valores de R da análise de similaridade de ANOSIM utilizando o algoritmo de <i>Bray-Curtis</i> para comparação da variação na estrutura das comunidades de fungos não marcados com ^{13}C ao longo do período de incubação nas atmosferas de 350 ppm e 700 ppm. ANOSIM: i) valores: $R > 0,75$ - grupos bem separados; ii) valores: $0,5 < R < 0,75$ - grupos separados com sobreposições; iii) valores $0,25 < R < 0,5$ - grupos parcialmente separados; iv) valores de $R < 0,25$ – ausência de separação entre os grupos, ($p \leq 0,01$)	88
--	----

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é umas das culturas mais importantes no mundo dos pontos de vista econômico, social e ambiental. O seu melhoramento varietal clássico tem sido realizado objetivando o plantio em áreas onde se dá o manejo por queimas. No entanto, o desenvolvimento das políticas de mitigação do CO₂ e a consequente intensificação da mecanização podem alterar esse cenário, levando a um novo panorama de cultivo desta planta.

A cana-de-açúcar é uma ótima fixadora do CO₂ atmosférico, principalmente devido a sua eficiência metabólica (tipo C4) e as grandes áreas ocupadas por esta cultura. Trabalhos demonstram que o carbono atmosférico fixado por gramíneas pode ser rapidamente encontrado em exsudatos de raízes após 24 horas. Isso evidencia a grande magnitude de transferência de carbono atmosférico para o solo em um período relativamente curto, sendo tal composto incorporado ao solo principalmente na forma de metabólitos que são distribuídos através dos distintos níveis tróficos do ambiente solo, dando origem a rizosfera.

Sabe-se que cerca de 99% dos micro-organismos que compõem a rizosfera nunca foram cultivados, o que leva a necessidade de abordagens independentes de cultivo para seu estudo. Tanto métodos de análise geral das comunidades, como o PCR-DGGE, ou métodos específicos de marcação de grupos ativos, como a marcação isotópica de material genômico com ¹³C, apresentam-se como poderosas ferramentas no estudo de tais comunidades.

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo estudar as possíveis variações da diversidade microbiana associada à rizosfera de distintos genótipos de cana-de-açúcar, e aplicar a metodologia de DNA-SIP para verificar a estrutura das comunidades de bactérias e fungos associados à rizosfera de plantas expostas a duas concentrações distintas de CO₂ atmosférico.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma das culturas mais importantes do mundo, representada por cerca de 30 espécies pertencentes à família *Poaceae*, que são cultivadas principalmente nas regiões tropicais. (EMBRAPA, 2005). O Brasil é atualmente o maior produtor mundial desta cultura, que é a *commodity* produzida em maior quantidade no país, ocupando uma área com cerca de 8,03 milhões de hectares, contando com uma produção de cerca de 625 milhões de toneladas e um rendimento médio de 77,798 ton.ha⁻¹ na safra 2010/2011 (CONAB, 2011). Essa demanda de produção se deve principalmente ao crescente emprego do etanol, combustível relativamente barato e renovável, como alternativa para a matriz energética mundial em resposta a substituição dos combustíveis fósseis. Entretanto, apenas um terço da biomassa da cana-de-açúcar é convertido em etanol, enquanto o restante constitui o bagaço e a palhada (GOLDEMBERG, 2008). Os trabalhos com essa cultura vêm sendo realizados com o objetivo de desenvolver novas variedades melhoradas e mais adaptadas a diversas condições edafoclimáticas, visando um aumento da produtividade e uma expansão da cultura para regiões anteriormente consideradas inaptas a tal prática (MAULE; MAZZA; MARTHA, 2001).

A produção de cana-de-açúcar é um dos principais sistemas de uso e ocupação da terra no bioma da Mata Atlântica, influenciando significativamente no balanço do carbono e na emissão de gases de efeito estufa (GEE) basicamente de três formas: através da substituição da gasolina pelo etanol combustível; pela utilização do bagaço da planta como fonte de energia em caldeiras, gerando energia elétrica; e pelo sequestro de carbono nos solos de

cultivo da cultura, em especial nos sistemas mecanizados (CERRI et al., 2007; CARVALHO et al., 2010).

A cana-de-açúcar tem uma alta demanda de nutrientes, com destaque para o nitrogênio e o fósforo (SIMÕES-NETO et al., 2009). Neste contexto, a fração orgânica do solo correspondente a biomassa microbiana, tendo em vista que os produtos do seu metabolismo constituem uma das principais fontes do nitrogênio mineral e fósforo para as plantas (COLORO et al., 2007). As modificações no sistema de plantio da cana-de-açúcar podem afetar a dinâmica dos nutrientes no solo, principalmente com relação a disponibilização destes para os micro-organismos do solo e para a cultura (BASANTA et al., 2003; GAVA et al., 2005). Outro processo que pode ser alterado é a humificação da matéria orgânica do solo (SKJEMSTAD et al., 1999), que é fundamental para a incorporação do carbono junto a parte mineral do solo, promovendo o aumento da CTC (capacidade de troca de cátions) e a estabilização dos agregados formados no solo (BRONICK; LAL, 2005).

O sistema de colheita da cana-de-açúcar pode influenciar na produção e longevidade da cultura, sendo que nas regiões onde se praticam queimadas, além do aumento das concentrações de gás carbônico (CO_2) na atmosfera, ocorre uma redução no teor da matéria orgânica no solo (SOUZA, et al., 2005). A ausência de queimadas permite um acúmulo da palhada no solo, formando uma extensa cobertura residual que é gradativamente incorporada ao solo. Estima-se que a permanência da palhada no campo permite o sequestro de $1,5 \text{ Mt C ano}^{-1}$ e a mitigação de $0,05 \text{ Mt C ano}^{-1}$ de metano (CERRI, 2004). Essas modificações podem refletir na produtividade da cana-de-açúcar, especialmente na fase de rebrota da soca (VASCONCELOS, 2002).

As alterações iniciais no conteúdo da matéria orgânica do solo, devido as modificações ambientais no sistema de manejo da cana-de-açúcar e de outras culturas, podem influenciar na estrutura e composição das comunidades microbianas, pois a biomassa microbiana compõe a principal fração ativa na dinâmica da matéria orgânica do solo e na ciclagem de nutrientes (MARCHIORI; MELO, 1999; ROSCOE et al., 2006; GALDOS; CERRI; CERRI, 2009). Sendo a cana-de-açúcar uma planta de metabolismo do tipo C_4 , o aumento da sua taxa

fotossintética é bem perceptível em resposta ao aumento dos níveis de CO₂ atmosférico, o que também pode provocar alterações nos padrões de exsudação radicular que, por sua vez, podem influenciar na composição e estrutura das comunidades microbianas associadas ao seu sistema rizosférico (DRIGO, et al., 2010).

A predominância da cultura da cana-de-açúcar em um vasto território torna esta cultura efetiva com relação a regulação da dinâmica do carbono presente na atmosfera e no solo, tendo em vista a sua alta eficiência metabólica em fixar o CO₂ atmosférico. Estima-se que cada tonelada de carbono fixado na fitomassa corresponde ao equivalente de uma mitigação de 3,67 t de CO₂ atmosférico (NISHI et al., 2005). Outro trabalho evidenciou que a produção de uma tonelada de fitomassa de matéria seca de cana-de-açúcar fixa no mínimo 0,42 t em carbono, correspondendo a uma mitigação de 1,54 t de dióxido de carbono da atmosfera (PAULA et al., 2010).

Diante do exposto, a cultura da cana-de-açúcar mostra-se como uma importante participante no processo de ciclagem do carbono no ambiente e na sua transferência para as comunidades microbianas do solo, que também desempenham funções fundamentais nos ciclos biogeoquímicos e encontram-se associada de alguma forma as plantas de cana-de-açúcar e a outros organismos presentes no sistema solo-planta.

2.1.2 O carbono no solo

O solo é a maior e mais estável fonte de carbono terrestre (CARNEY et al., 2007), sendo que a massa de carbono pode ser depositada no solo de diversas formas, como por exemplo, por meio do aumento do volume de raízes no solo, descamação celular, ruptura dos tecidos vegetais, aumento da exsudação radicular ou através da deposição, em longo prazo, de serapilheira (DRIGO et al., 2010).

Além de ser o mais importante reservatório de carbono existente, os solos, principalmente os de ecossistemas florestais, representam, juntamente com a vegetação, em termos gerais, cerca de 20 a 25 % do carbono terrestre (CERRI et al., 2001). A deposição e decomposição das raízes mortas é uma das principais formas de fornecimento da matéria orgânica ao solo, mas esse processo também ocorre com estas ainda por meio da excreção de vários compostos de baixo peso molecular, exsudatos, ou compostos de elevado peso molecular, mucilagem (WOOD, 1995).

A matéria orgânica é o maior reservatório de carbono do solo, sendo considerada equivalente a praticamente o dobro da soma das quantidades de carbono presentes na atmosfera e na biomassa vegetal (SWIFT, 2001). Desta forma, a matéria orgânica presente no solo apresenta um importante e fundamental papel na participação global do ciclo do carbono. Entre diferentes frações que compõem a matéria orgânica do solo, existe a fração leve, ou seja, a porção em que se encontram grande parte dos resíduos em variados estágios de decomposição. Essa fração pode ser usada como indicadora de mudanças na qualidade do solo por indicar alterações do carbono lábil que são afetadas pelas mudanças de uso da terra e por fatores ambientais que influenciam a atividade microbiana no solo (ARAÚJO et al., 2011). Na cultura da cana-de-açúcar, a colheita sem queimadas proporciona o estabelecimento dessa fração leve da matéria orgânica sob a superfície, influenciando nas características físico-químicas do solo, na ciclagem do carbono e na diversidade de micro-organismos dos solos (ROSCOE et al., 2006; GALDOS; CERRI; CERRI, 2009).

O balanço do carbono presente nos diversos reservatórios pode sofrer alterações ao longo do tempo através de diversos fatores, entre eles a substituição das florestas tropicais nativas por atividades agropastoris, que é uma dos principais efeitos antrópicos responsáveis pelo incremento de CO₂ na atmosfera (PAIVA e FARIA, 2007). Em contrapartida, isso não é observado na cultura da cana-de-açúcar quando não ocorre a prática da queima para colheita, ocasionando mudanças no uso do solo que podem provocar diversas alterações no balanço de CO₂ atmosférico. A substituição dos sistemas florestais, principalmente por ecossistemas de pastagem e de cana-de-açúcar, refletem de

maneira clara as modificações do solo por decorrência da alteração na cobertura vegetal, principalmente, quanto à distribuição das frações orgânicas humificadas (FERNANDES et al., 1999), os aspectos quantitativos e qualitativos da biomassa microbiana (FEARNSIDE; BARBOSA, 1998) e quanto às características físico-químicas do solo (MAKEWITZ et al., 2004).

As concentrações dos gases da atmosfera também é um fator que influencia ativamente na dinâmica do processo fotossintético das plantas e, conseqüentemente, nas vias metabólicas das mesmas, podendo provocar alterações na estrutura e composição das comunidades microbianas do solo (DRIGO et al., 2010). Trabalhos indicam que a elevação do CO₂ atmosférico provocaria uma maior assimilação de carbono pelas plantas, ocasionando o aumento na oferta desse elemento abaixo do solo, o que pode contribuir com a estabilização das concentrações atmosféricas desse gás, porém interferindo na comunidade microbiana existente neste ambiente (CRAMER, W. et al., 2001; PENDALL et al., 2004; CARNEY et al., 2007).

Vários fatores podem estar correlacionados com as alterações das concentrações de CO₂ atmosférico e com o balanço dos estoques de carbono no solo. A modificação do uso da terra é considerada uma das maiores fontes de emissão de carbono antropogênico para a atmosfera, ficando atrás somente da queima de combustíveis fósseis (FITZSIMMONS et al., 2003). Além disso, dados do painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas das Nações Unidas (IPCC) mostram que cerca de 25% das emissões globais de CO₂ provém da derrubada de florestas (PIMM; JENKINS, 2005), mostrando o grande impacto que a modificação da cobertura vegetal e a sua remoção do local de origem podem representar, tanto para a conservação do solo quanto para os micro-organismos nele presentes. Esses elementos também se tornam bem visíveis no cultivo da cana-de-açúcar, principalmente com relação a grande quantidade de biomassa produzida, a captura de CO₂ e o tipo de colheita praticada, com ou sem queima.

Pouco se sabe sobre a participação dos micro-organismos associados à cana-de-açúcar na ciclagem da Matéria orgânica (MO) neste ambiente, e como a liberação de fontes de Carbono e Nitrogênio das raízes pode afetar a

composição de tais comunidades. Portanto, estudos utilizando marcadores moleculares podem comprovar a participação de grupos microbianos específicos, elucidando alguns sistemas de transferência do carbono da planta e sua distribuição entre distintos níveis tróficos estabelecidos nos solo cultivados com cana-de-açúcar.

2.1.3 Micro-organismos associados à cana-de-açúcar

Os micro-organismos associados às plantas de cana-de-açúcar têm sido explorados por muitos trabalhos visando, principalmente, a promoção do crescimento vegetal e a aplicação biotecnológica, podendo citar como exemplo a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico, antagonismo a fitopatógenos, produção de sideróforos, reguladores de crescimento vegetal e produção de enzimas de interesse industrial, entre outros (BODDEY et al., 2003; KUSS et al., 2007; ROBLEDO et al., 2008; MAKOI, et al 2008; COMPANT et al., 2010).

As regiões mais próximas às raízes de cana-de-açúcar, principalmente o rizoplane e a rizosfera, são os locais preferenciais de colonização de micro-organismos, sendo tal seleção guiada pela grande disponibilidade de nutrientes, oriundos da exsudação radicular, e os quais podem ser utilizados para o crescimento e metabolismo microbiano (MEDEIROS et al., 2006). Esse fato tem dado suporte ao desenvolvimento de trabalhos sobre a diversidade microbiana da rizosfera (GRAYSTON; JONES, 1996; COCKING, 2003). De forma geral, a rizosfera é a principal zona de contato do solo com a raiz das plantas, que por sua vez é a principal região de interação com os micro-organismos do solo devido à liberação de metabólitos vegetais, ricos em nutrientes que são determinantes na distribuição dos organismos neste nicho (KANG et al., 2004).

Drigo e colaboradores (2010) estudaram a distribuição de composto exsudatos das raízes de gramíneas nos sucessivos níveis tróficos das comunidades microbianas. Tais autores observaram que os primeiros grupos

responsivos a estes compostos são os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), principalmente os das famílias *Acaulosporaceae* e *Glomeraceae*, responsáveis pela transferência de carbono para as comunidades bacterianas do solo, principalmente as dos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*, que também podem assimilar diretamente o carbono resultante da exsudação, só que em menor quantidade.

A cultura da cana-de-açúcar vem passando por grandes modificações, que podem afetar significativamente a estrutura, composição e diversidade das comunidades microbianas da rizosfera, e o emprego de metodologias de abordagens independentes de cultivo é essencial na determinação da abundância e estruturação de tais comunidades (SIX et al., 2006). Também existem trabalhos sobre as alterações dos níveis isotópicos naturais em resposta a mudança do uso da terra e sua posterior influência sobre as comunidades microbianas (PEREIRA; BENEDITO, 2007; COSTA et al., 2009, GALDOS, et al., 2009). Recentes estudos também têm feito o uso dos isótopos estáveis para se avaliar o papel das comunidades microbianas no meio ambiente (BOSCHER; MIDDELBURG, 2002; WHITBY et al., 2005; HUANG et al.; 2009; DUMONT et al., 2011).

Outra característica importante a se considerar no estudo da comunidade microbiana da cana-de-açúcar são as estratégias metabólicas desempenhadas pelos micro-organismos rizosféricos para se estabelecerem na zona rizosférica (SANTOS, 2011). Um exemplo disso é o complexo mecanismo denominado comumente de efeito “*priming*” (FONTAINE et al. 2007), baseado na competição por nutrientes e energia entre os micro-organismos, onde temos aqueles de crescimento rápido, especializados em decompor matéria orgânica fresca (MOF) e respondem prontamente a uma nova fonte de MO lábil (estrategistas ‘R’); e micro-organismos generalistas, de crescimento lento, que se alimentam principalmente da matéria orgânica polimerizada do solo (MOS) (estrategistas ‘K’). Os estrategistas K podem utilizar componentes mais complexos e insolúveis, se beneficiando mais do que os micro-organismos estrategista ‘R’ em casos específicos (GUEDES et al., 2006). Desta forma, a modificação da vegetação pode ocasionar uma substituição gradativa da matéria orgânica

presente, modificando a estrutura do solo e a sua composição em termos quantitativos e qualitativos.

Outro grupo microbiano importante nesta cultura é formado pelos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (FREY-KLETT et al., 2007). Os FMA são um grupo funcionalmente importante no sequestro de carbono de origem vegetal, podendo disponibilizá-lo para os demais subníveis tróficos da microbiota do solo (STADDON, 2005; DRIGO et al., 2010). Vários estudos evidenciam a participação ativa dos FMA no processo de transferência do exsudatos radiculares de cana-de-açúcar para os demais micro-organismos do solo. Entre as principais espécies de FMA associados à cana-de-açúcar podem ser citadas *Acaulospora* sp., *Scutellospora heterogama*, *Glomus etunicatum*, *Glomus occultum* e *Gigaspora margarita*. *A. diazotrophicus* (REIS et al., 1999).

Apesar da grande diversidade de micro-organismos associados à cana-de-açúcar, apenas uma pequena fração é conhecida e pode ser cultivada, limitando os métodos tradicionais de bioprospecção da biodiversidade microbiana também neste sistema (AMANN et al., 1995). Neste aspecto, as técnicas independentes de cultivo têm contribuído para o conhecimento da diversidade desses micro-organismos e do potencial biotecnológico das comunidades microbianas e processos ainda não explorados (LEE; WONG, 2009; MARQUES et al., 2008). Dentre tais métodos, destaca-se a metodologia de marcação com isótopos estáveis (*Stable Isotope Probing* - SIP) (DRIGO et al., 2010), que possibilita a diferenciação de grupos específicos de micro-organismos com base na sua função no ambiente. Esse método pode ser complementado com metodologias de abordagem metagenômica que permitam avaliar os perfis das comunidades microbianas. A metodologia de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* - DGGE) é uma dessas metodologias, apresentando alta eficiência em demonstrar variabilidade dentro das comunidades e fazer comparações entre amostras e tratamentos específicos (THIES, 2007; GABRIEL, 2010).

O desenvolvimento das técnicas independentes de cultivo tem proporcionado uma grande aplicação dos marcadores moleculares com o objetivo de se estudar a diversidade de comunidades microbianas, embora se

estime que menos de um 1% dessas comunidades possa ser cultivada por métodos tradicionais (HE et al., 2008). Os estudos empregando marcadores filogenéticos, como o gene 16S rRNA (para bactérias) e a região ITS (para fungos) têm sido promissores no fornecimento de respostas relevantes sobre a organização e a diversidade dos micro-organismos em diversos ambientes. Porém, tais análises são pouco informativas quanto ao aspecto funcional de tais comunidades, não indicando grupos ativos em determinados processos. Este tipo de análise é mais correlacionado com metodologias como o SIP. Sendo assim, a associação dessas metodologias de abordagem metagenômica com a técnica de marcação do DNA de micro-organismos associados à rizosfera de plantas de cana-de-açúcar por meio de isótopos estáveis (DNA-SIP), pode fornecer informações valiosas sobre a estrutura, a composição e a diversidade microbiana associada a plantas de cana-de-açúcar, bem como a influencia de alterações nos níveis de CO₂ atmosférico sobre essas comunidades.

2.1.4 A metodologia do SIP (Stable Isotope Probing)

A metodologia de SIP (*Stable Isotope Probing*) é uma técnica promissora, baseada na incorporação de substratos marcados com isótopos estáveis (¹³C ou ¹⁵N) de baixa abundância natural, em biomarcadores celulares que podem ser usados para identificar os principais grupos de micro-organismos “ativos” presentes na biomassa onde foi incorporado o substrato (BOSCHER & MIDDELBURG, 2002). Após a incorporação, o ácido nucleico enriquecido (¹³C-DNA ou ¹³C-RNA) é na maioria dos casos o material alvo, que é então extraído e analisado, fornecendo informações filogenéticas que proporcionam a avaliação da dinâmica metabólica e da identidade das comunidades microbianas presentes no ambiente (NEUFELD et al. 2007).

Essa técnica consiste no processo de separação do DNA ou RNA, marcado com isótopo estável, por ultracentrifugação em gradiente de densidade com cloreto de cério (CsCl) ou trifluoracetato de cério (CsTFA), levando-se em conta as diferenças quantitativas na massa das moléculas marcadas ou não

(WHITBY et al., 2005). Embora a densidade do material genético varie de acordo com o seu conteúdo de citosina-guanina (C+G), a incorporação de grandes quantidades de isótopo ao DNA aumenta significativamente a diferença de densidade entre as frações marcadas e não marcadas, permitindo uma adequada separação por ultracentrifugação. (RADAJEWSKI et al. 2003). Isso pode permitir a marcação de genomas completos, fato que destaca o SIP entre um número limitado de metodologias capazes de identificar micro-organismos responsáveis, em particular, por processos biogeoquímicos específicos (MANEFIELD et al., 2002). Além disso, é possível a identificação de novas vias metabólicas através do uso de vetores bacterianos usados para clonagem de DNA marcado com isótopos estáveis, ou o uso de *primers* específicos para a amplificação de genes funcionais que codificam enzimas-chave de vias metabólicas diversas, sendo estas abordagens complementares a serem realizadas com base no material genético marcado (RADAJEWSKI et al. 2000; GRAY; HEAD 2001; RADAJEWSKI et al. 2003; WELLINGTON et al. 2003).

A utilização de diferentes moléculas como alvo de análise pela técnica de SIP apresentam vantagens e desvantagens. A principal vantagem do rRNA-SIP é a alta sensibilidade dos resultados e uma rápida acumulação dos isótopos dentro do RNA quando comparado com o DNA-SIP (MANEFIELD et al., 2002; DUMONT et al., 2011). A técnica de DNA-SIP, no entanto, permite a rotulação dos genomas completos, possibilitando a amplificação de genes funcionais através da técnica de PCR e seu posterior sequenciamento (CHEN et al, 2008; KALYUZHNYAYA et al, 2008; SUL et al, 2009). O mRNA-SIP, por sua vez, caracteriza-se pela combinação das vantagens dos métodos anteriores, apresentando alta sensibilidade dos resultados e obtenção de informações funcionais, tratando-se de um poderoso método de abordagem em ecologia microbiana, contribuindo com a identificação de organismos envolvidos em processos de assimilação de substratos bem como da expressão gênica envolvida (DUMONT et al., 2011).

As combinações dessas metodologias podem fornecer valiosas informações sobre as atividades, diversidade, crescimento populacional e alimentação cruzada de metabólitos entre os organismos (DUMONT et al.,

2011). Essa metodologia é adequada por fornecer um material mais selecionado e refinado a ser posteriormente analisado por técnicas mais comuns das análises independentes de cultivo. Dentre estas, podem-se listar o DGGE, a biblioteca de clones, ou até mesmo o pirosequenciamento, feitos com base em genes filogenéticos ou funcionais, esclarecendo o papel de determinados organismos em processos específicos no ambiente em que se encontram (HUANG et al.; 2009).

O primeiro trabalho na área de microbiologia ambiental utilizando a técnica de SIP foi realizado por Radajewski e colaboradores (2000), que descreveram a inserção de metano marcado [$^{13}\text{CH}_4$] em uma amostra de solo, revelando o envolvimento de linhagens de *α -proteobacteria* e *Acidobacteria* na assimilação dessa molécula. O trabalho de Manefield et al. (2002), utilizando a metodologia de SIP, demonstrou que micro-organismos do gênero *Thauera* foram capazes de degradar fenol marcado com ^{13}C em um biorreator aeróbio industrial. A metodologia de SIP utilizada por Leuders et al. (2004) demonstrou a participação de membros da família *Methylobacteriaceae* no metabolismo do metanol marcado [^{13}C -metanol] em um microcosmo de solo. O trabalho realizado em biorreator por Singleton et al. (2005), a técnica de SIP identificou populações microbianas dos gêneros *Pseudomonas* e *Ralstonia* capazes de degradar silicato e naftaleno num período de incubação de dois dias no solo, enquanto o gênero *Acidovorax* foi associado à degradação do fenatreno em um período de incubação de sete dias no solo. A técnica de SIP foi utilizada por Leigh et al. (2007) para determinar as comunidades bacterianas utilizando bifenil e seus genes funcionais em uma região próxima a rizosfera de *Pinus nigra* L. crescendo em solo contaminado com bifenilo. Esse trabalho identificou que 75 gêneros diferentes estavam associados à degradação do substrato marcado, entre eles predominaram os gêneros *Pseudonocardia*, *Kribella*, *Nocardiodes* e *Sphingomonas*. Além disso, o trabalho permitiu a identificação de novas sequências de dioxigenases por meio da análise das sequências obtidas.

Diante do exposto, o trabalho que mais se assemelha ao desenvolvido no presente estudo foi o desenvolvido por Drigo et al. (2010), realizado com gramíneas micorrizadas da Europa, cultivadas sob duas concentrações de $^{13}\text{CO}_2$

(350 ppm, concentração ambiental de CO₂; e 700 ppm, concentração elevada de CO₂). Este trabalho demonstrou que a gramínea *Festuca rubracomem* assimilou o ¹³C presente no CO₂, e o disponibilizou para os FMA logo no primeiro dia após a exposição. Após este período inicial, houve um decréscimo na taxa de assimilação, e o grupo microbiano mais responsivo na rizosfera foi a comunidade bacteriana (4 a 5 dias da marcação). Em contraste, a comunidade bacteriana associada à espécie de *Carex arenaria* apresentou uma rápida incorporação de ¹³C logo no início do experimento. Esses resultados indicaram que a maior parte do ¹³C que é assimilada pela comunidade bacteriana na rizosfera é derivado do metabolismo dos FMA. De maneira similar, o presente estudo se embasou na proposta de determinar a diferença entre os grupos microbianos “ativos”, na rizosfera de cana-de-açúcar, capazes de metabolizar os exsudatos de raiz destas plantas, dos que não conseguem, bem como estudar o efeito das concentrações de CO₂ sobre a diversidade desses micro-organismos.

2.2 Materiais e Métodos

O presente trabalho é composto de dois experimentos. O primeiro estudou a diversidade bacteriana associada à rizosfera de vários genótipos de cana-de-açúcar, com experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia, situado no Departamento de Ciências do Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) em Piracicaba – SP. O segundo experimento teve como objetivo desenvolver a técnica de SIP (*Stable Isotope Probing*) para o estudo da estrutura dos grupos microbianos responsivos a exsudação radicular de cana-de-açúcar cultivada sob duas concentrações de CO₂ atmosférico. As metodologias de separação e fracionamento do DNA total submetido à rotulagem com ¹³CO₂ foram realizadas no Laboratório de Ecologia de Microorganismos, coordenado pela Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari, localizado no Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. Neste segundo experimento contamos com o suporte da Dra. Daniella Vilella, orientada da Profa. Dra. Vivian H. Pellizari, para aplicação da técnica.

2.2.1 Estudo da Estrutura e diversidade bacteriana associada a cana-de-açúcar

2.2.1.1 Obtenção do material vegetal e preparo das amostras

Para esta análise foram coletadas seis variedades de cana-de-açúcar (cana-planta), com aproximadamente seis meses de idade. As plantas foram coletadas em dois locais, sendo que as variedades **RB86-7515** e **PO8862** foram coletadas de canteiros da **Fazenda Areão**, localizada no município de Piracicaba (SP). As variedades **RB85-5156**, **RB85-5453**, **SP5541** e **SP5543** foram obtidas de canteiros localizados em área da “**Usina A**” localizada na cidade de Cerquilha (SP). As plantas coletadas tiveram as suas raízes envoltas em sacos plásticos para a preservação da umidade, tomando-se o cuidado de manter uma

boa porção do solo agregado às raízes das plantas. O experimento foi conduzido em triplicatas. As plantas coletadas foram levadas para o laboratório onde foi feita a separação do *bulk soil* e da rizosfera para a posterior extração dos ácidos nucléicos. Foram obtidos um total de 18 amostras de rizosfera e 18 de *bulk soil*, totalizando 36 amostras. Amostras da rizosfera receberam o prefixo 'R' enquanto as amostras do *bulk soil* receberam o prefixo 'S' na nomenclatura. Após as coletas, as amostras vegetais foram levadas para o laboratório para a imediata separação do *bulk soil* e do solo rizosférico. O solo não aderido às raízes coletado para compor as amostras de *bulk soil*, enquanto a fração do solo ligada às estruturas radiculares das plantas a uma distância máxima de 2 mm foi removida cuidadosamente para compor as amostras de solo rizosférico.

2.2.1.2 Extração de ácidos nucleicos

As amostras obtidas foram pesadas, e valores próximos a 0,4 g foram usados na metodologia de extração de DNA, realizada com do kit comercial *MoBio Powersoil™* DNA Isolation (*MoBio Laboratories Inc, Carlsbad, CA, EUA*) de acordo com instruções do fabricante. O DNA extraído foi verificado e quantificado em gel de agarose 1% (w/v), corado com SYBR® Green I (1:1000) (*Molecular Probes, Eugene, OR, EUA*), utilizando como marcador de peso e massa molecular "Low Mass DNA Ladder" (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*), visualizado e fotodocumentado em luz UV.

2.2.1.3 Análise da estrutura bacteriana por meio da técnica de PCR-DGGE

A metodologia da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*Polimerase Chain Reaction -Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – PCR-DGGE*) foi aplicada as amostras obtidas para o experimento da avaliação da diversidade em função das variedades de cana-de-açúcar. Esse procedimento foi adaptado com base na metodologia adotada por Haichar et al. (2008). O DNA

das amostras foi submetido à amplificação com *primers* específicos e descritos na literatura (Tabela 1), incluindo os genes da região do 16S DNAr de uma maneira geral, e também focando separadamente nos grupos de α -proteobacteria e β -proteobacteria. A amplificação do fragmento do gene 16S DNAr (Bactéria) foi realizada com os *primers* U968-GC e 1378R, resultando em *amplicons* de aproximadamente 430 pb. Os ciclos para amplificação foram: desnaturação inicial de 5' a 95°, seguida de 35 ciclos de 1' a 95°C, 1' a 55°C, 2' a 72°C, e uma extensão final de 10' 72°C, resultando em 50 μ L de produto de PCR.

A amplificação do fragmento de interesse para o grupo das α -proteobacteria utilizou na primeira reação os genes AlphaU e 1378R. Os ciclos para amplificação foram: desnaturação inicial de 4' a 94°, seguida de 35 ciclos de 1' a 94°C, 1' a 56°C, 1' a 72°C, e uma extensão final de 10' a 72°C. A segunda reação foi a mesma descrita para a amplificação direta do fragmento do gene 16S DNAr, resultando em 50 μ L de produto de PCR. A amplificação do fragmento de interesse para o grupo das β -proteobacteria utilizou na primeira reação os *primers* Beta-2 e 1378R. Os ciclos para amplificação foram: desnaturação inicial de 4' a 94°, seguida de 35 ciclos de 5' a 94°C, 1,5' a 61°C, 2' a 72°C, e uma extensão final de 10' a 72°C. A segunda reação foi a mesma descrita para a amplificação direta do fragmento do gene 16S DNAr, resultando em 50 μ L de produto de PCR.

Após a obtenção dos *amplicons*, os produtos da PCR foram todos avaliados em gel de agarose a 1%, seguido de coloração em brometo de etídeo e visualização em luz ultravioleta. A análise de DGGE foi realizada no aparelho *phorU2 system* (ingeny, Goes, Holanda). O gradiente desnaturante (uréia e formamida deionizada) foi de 45% a 65%. Os gradientes foram formados a partir de soluções estoque de poliacrilamida (6%) contendo 0% e 100% de desnaturantes. As condições da eletroforese foram de 65°C por 16 horas a 100 V. Após a eletroforese, os géis foram corados com SYBR-gold (Invitrogen, Breda, The Netherlands) em TAE 0,5 x no escuro por 120 minutos. As imagens resultantes foram usadas para conversão dos géis em matrizes de

presença/ausência de bandas com o software *ImageQuant TL unidimensional* (Amersham Biosciences, Amersham, UK, v.2003) (MCCAIG et al. 2001).

2.2.1.4 Análises multivariadas dos dados de estrutura bacteriana

O software PAST 1.90 (HAMMER et al., 2001) foi utilizado para a análise dos dados binários e agrupamentos por similaridade dos perfis utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) com base no coeficiente de similaridade de Bray-Curtis. Para avaliar a variação entre os grupos encontrados na análise de cluster, foi empregada a análise de similaridade de ANOSIM, que permite testar a ocorrência de diferença significativa entre dois ou mais grupos de amostras, com base em algoritmos de distâncias médias (CLARKE, 1993). Esse método compara a distância entre os grupos gerando uma correlação R onde se pode constatar que os grupos estão claramente separados ($R = 1$) ou não ($R = 0$). Os valores de $R > 0,75$ são significativos que os grupos se encontram bem separados, para $0,5 < R < 0,75$ os grupos estão separados, porém apresentam sobreposições e $R < 0,25$ significa que não existe separação entre os grupos. (CLARKE; GORLEY, 2001). Para avaliar a similaridade entre os grupos observados também foram realizadas os métodos multivariados de Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis - PCA*) e Análise de Coordenadas Principais (*Principal Coordinates Analysis - PCoA*).

Tabela 1 - Lista de *primers* utilizados no experimento para a amplificação de diferentes alvos a partir do DNA total

Primers	Sequências (5' - 3')	Alvo	Referência
1378R	CGG.TGT.GTA.CAA.CGC.CCG.GGA.ACG	Gene 16S DNAr	HEUER ET AL., 1997
U968-GC	CGC.CCG.GGG.AGC.GCC.CCG.GGC.GGG.GCG.GGG.GCA.CGG. GGG.GAA.CGC.GAA.G	Gene 16S DNAr	HEUER ET AL., 1997
AlfaU	CCG.CAT.ACG.CCC.TAC.GGG.GGA.AAG.ATT.TAT	Gene 16S DNAr (α)	GOMES ET AL., 2001
Beta-2	CGC.ACA.AGC.GGT.GGA.TGA	Gene 16S DNAr (β)	GOMES ET AL., 2001
Ef4	CGA.AGG.GRT.GTA.TTT.ATT.AG	Gene ITS	ANDERSON ET AL., 2003a
ITS4	TCC.TCC.GCT.TAT.TGA.TAT.GC	Gene ITS	ANDERSON ET AL., 2003a
ITS2	GCT.GCG.TTC.TTC.ATC.GAT.GC	Gene ITS	ANDERSON ET AL., 2003b
ITS1f-GC	CCC.GCC.GCG.GGG.CGC.GGC.GGG.GGG.CGG.GGC	Gene ITS	ANDERSON ET AL., 2003b

2.2.1.5 Análise da diversidade filogenética por Ion Torrent™

As amostras mais representativas (com maior diferenciação), de acordo com os resultados obtidos pela análise dos perfis gerados pela metodologia de PCR-DGGE, foram submetidas ao sequenciamento de *amplicons* por meio da plataforma de nova geração *Life Technologies Ion Torrent™*, realizado na Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna – SP, sendo escolhidas para tanto três amostras de rizosfera (variedades **RB86-7515**, **RB85-5453** e **RB85-5156**) e uma de *bulk soil* (variedade **RB86-7515**). Para tanto, o DNA extraído foi amplificado com *primers* franquecedores da região V6 do gene 16S rDNA. Amplicons destas amostras foram gerados com *primers forward* marcados com distintas tags, formado por 5 pares de bases (*barcodes*), permitindo a identificação da origem das sequências geradas (VAMPS, 2012).

2.2.1.6 Metodologias de bioinformática para avaliação dos dados do sequenciamento

Para análise das sequências obtidas, inicialmente foi utilizado o programa *CLC Genomics Workbench (CLCbio)*, separando-se as sequências de cada amostra com base nos *barcodes*. As sequências obtidas no sequenciamento foram inicialmente processadas no RDP (*Ribosomal Database Project*), onde foram analisadas com base na ferramenta *Classifier* (COLE et al., 2007), empregado para atribuições taxonômicas. Em seguida, as análises das sequências foram feitas utilizando o programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (CAPOROSO et. al., 2010). Para as análises no QIIME foram empregadas linhas de comando específicas, conforme as análises desejadas. Deste modo, o agrupamento das UTOs (*Operational Taxonomic Units*) foi realizado para um nível de distância de 3%, empregando-se para tanto o comando *picy_UTOs.py*. Os comando *align_seqs.py* foi empregado para o alinhamento pelo método PYNAST. A classificação taxonômica foi feita pelo comando *assing_taxonomy.py*, utilizando o método *Blast* e o banco de dados do

Greengenes chamado *Caporoso Reference UTOs* (GREENGENES, 2012). A tabela de UTOs foi obtida por meio do comando *make_otu_table.py*. Os gráficos de classificações taxonômicas foram obtidos através do comando *summarize_taxa_through_plots.py*. A análise de β -diversidade também foi realizada empregando-se, para tanto, a seguinte sequencia de linhas de comando: *beta_diversity.py*, *make_principal_coordinates.py* e *make_2d_plots.py*. Os números de UTOs, e suas respectivas sequências, foram computados para o cálculo dos índices de diversidade de *Shannon* e para a estimativa de riqueza de espécies, pelo método não paramétrico de *Chao* (CHAO; BUNGE, 2008). O softwares descritos foram implementados na plataforma Linux (Ubuntu 12.10, 2012).

Após as etapas anteriores, também foi feita uma análise das sequencias geradas por meio do software MOTHUR v.1.7.2, com o objetivo de se compara a classificação das OTUs, para os principais filos e classes, determinadas através de métodos e algoritmos distintos. Além disso, enquanto no QIIME é utilizado o banco-de-dados de referência do Greenenes (GREENGENES, 2012), no MOTHUR foi utiliza o banco de dados do RDP (*Ribosomal Database Project*) (RDP, 2012). A matriz de UTOs gerada pelo MOTHUR foi avaliada através do software R 2.12, o que permitiu a construção de *heatmaps* para avaliar tanto a diversidade quanto a abundância dos principais filos e classes de bactérias presentes nas amostras sequenciadas.

2.2.2 Análise da diversidade microbiana por meio da técnica de SIP

2.2.2.1 Amostragem do material vegetal

A variedade de cana-de-açúcar escolhida para a realização do experimento foi a RB86-7515, que foi lançada pela Universidade Federal de Viçosa. O material vegetal utilizado para se realizar o experimento da técnica de SIP, foi coletado no bando de mudas localizado na Fazenda Areão, que se situa no município de Piracicaba, na parte central do Estado de São Paulo, nas coordenadas geográficas: 22°41,716' de Latitude Sul e 47°38,478' de Longitude Oeste, com altitudes variando entre os 520 e 600 metros em relação ao nível do mar (ESALQ, 2012). Nesta área foi feita a coleta de colmos da variedade RB86-7515, para a obtenção de propágulos sadios para o emprego no experimento de influência das concentrações de CO₂ atmosférico sobre a diversidade de micro-organismos associados à cana-de-açúcar.

2.2.2.2 Plantio das gemas e obtenção das mudas

Para o experimento do SIP, o cultivo das mudas foi feito em área do Departamento de Ciência do Solo, na ESALQ (USP). O experimento foi conduzido em vasos, através do plantio de gemas da variedade RB86-7515. Foi adotada uma padronização durante a seleção dos colmos para plantio em vasos, sendo escolhidas gemas que apresentassem comprimentos e diâmetros médios de 6 cm e 4 cm, respectivamente. Essa padronização foi importante para promover uma homogeneização no crescimento e desenvolvimento das plantas para serem utilizadas posteriormente. O solo utilizado no experimento foi adquirido da mesma área, sendo classificado como Nitossolo Vermelho Eutroférico Latossólico (EMBRAPA, 1999), que possui textura argilosa. Foram feitas coletas do solo entre as profundidades de 0,0 (zero) a 20 cm, objetivando-se amostrar comunidades microbianas autóctones do solo do ambiente de onde

as plantas do experimento foram inicialmente obtidas. As gemas foram plantadas nos vasos a uma profundidade de aproximadamente 5 cm e cultivados em pleno-sol e em boas condições de aeração, sendo realizadas irrigações diárias. Após a emergência, as mudas foram levadas para a casa de vegetação onde foram realizadas as demais etapas de tratamentos.

Foram inicialmente tomados os devidos cuidados com o local de permanência dos vasos, para manter as boas condições de sanidade e uma temperatura ótima de emergência das gemas (entre 27 a 32°C) de acordo com as orientações de Buso (2006).

2.2.2.3 Incubação das plantas em dióxido de carbono (CO₂)

O experimento de enriquecimento atmosférico foi realizado com base no trabalho desenvolvido por Drigo et al. (2010), que utilizou duas espécies de gramíneas micorrizadas da Europa, cultivadas sob duas concentrações de CO₂ no estudo das comunidades microbianas ativas na rizosfera, sendo essas concentrações aplicadas com base no padrão atmosférico do local (350 ppm) e a outra nas condições de saturação de CO₂ (700 ppm). No presente experimento, as plantas de cana-de-açúcar foram também cultivadas sob duas condições distintas de concentração de CO₂ [concentração atmosférica padrão (350 ppm), e de atmosfera saturada (700 ppm)]. Durante a realização do experimento também se preferiu adotar, para o tratamento com a menor concentração de CO₂, o valor 350 ppm, sendo que este valor está em torno das concentrações médias atuais de CO₂ do local do experimento, sendo a atual média mundial de concentração de CO₂ na atmosfera de cerca de 395 ppm (NOAA, 2012) Desta forma, pode-se avaliar possíveis ocorrências de alterações na comunidade microbianas associadas à rizosfera de cana-de-açúcar em função das variações dos níveis de CO₂ comparando-se os tratamentos em níveis atmosféricos padrão (350 ppm) e saturado (700 ppm).

Para tanto, um mês após a emergência, as plantas em vasos foram transferidas para cubas acrílicas devidamente vedadas, construídas para essa

finalidade, localizadas no interior de casa de vegetação climatizada, fazendo com que as plantas se permanecessem em diferentes concentrações de CO₂ (350 e 700 ppm) a uma temperatura média entre 26 a 28 °C (Figura 1).

Figura 1 - Cultivo de plantas de cana-de-açúcar em cuba acrílica aos três meses após o plantio, sob diferentes concentrações de CO₂ mantidas em casa de vegetação climatizada

As plantas foram mantidas nessas condições durante aproximadamente 3 meses, onde foram realizadas substituições da atmosfera das cubas e irrigação regulares a cada 2 dias. O monitoramento e o controle das concentrações de CO₂ dentro das cubas foram realizados diariamente com o auxílio de cromatógrafo gasoso modelo TRACE GC Ultra (Thermo Scientific®), empregando-se para tanto de seringas cromatográficas de 1 mL e utilizando o software *ChromQuest 5.0* (Thermo Scientific®, 2008), com os parâmetros operacionais devidamente estabelecidos para se trabalhar com detecção de CO₂. As amostragens gasosas foram sempre realizadas em triplicatas através de septos dispostos na lateral das cubas de acrílico. As injeções de CO₂ nas cubas foram realizadas pelos mesmos os septos laterais, com o auxílio de uma seringa com agulha acoplada a uma mangueira inserida no cilindro de CO₂ por meio de um regulador de vazão e pressão acoplado a nanômetro.

2.2.2.4 Enriquecimento das plantas com $^{13}\text{CO}_2$

Após a injeção do gás marcado dentro das caixas com os diferentes tratamentos (350 e 700 ppm), se esperasse que esse possa ser assimilado pelas plantas e posteriormente transferido para as raízes na forma de metabólitos secundários (Drigo et al., 2010; XIAO et al., 2012). Os dias de amostragem foram determinados de acordo com os resultados obtidos para as taxas de respiração das plantas. Para tanto, após os três meses de permanência das plantas nas caixas, sob diferentes concentrações de CO_2 , foram medidos os valores médios da fixação de CO_2 por planta ao longo das horas do dia. Além disso, foi determinada a área foliar média das plantas (AF), sendo medidos os comprimentos da folha +2 (dm), a maior largura da folha +2 (dm) e número de folhas abertas com pelo menos 20% de área verde de cada planta, de acordo com a metodologia proposta por Santos et al. (2009). Isso permitiu determinar a taxa média de fixação de CO_2 por planta ao longo das horas do dia.

O procedimento de enriquecimento das atmosferas das cubas com $^{13}\text{CO}_2$ (99% $^{13}\text{C}-\text{CO}_2$; Cambridge Isotope Laboratories) para os tratamentos correspondentes a 350 ppm e 700 ppm, foi feito injetando-se o gás pelos septos laterais (ver Figura 1). Para tanto, foram introduzidos aproximadamente 500 g de $^{13}\text{CO}_2$ em cada uma das caixas de incubação, totalizando o uso de aproximadamente 1000 g de gás marcado ($^{13}\text{CO}_2$), sendo que dois outros tratamentos foram feitos para as duas concentrações (350 e 700 ppm) sem o enriquecimento da atmosfera com $^{13}\text{CO}_2$ (controle negativo). Deste foram utilizadas 32 plantas no experimento, sendo nove para cada tratamento. As amostragens das rizosferas foram feitas a dois (48 horas), 4 (96 horas) e 8 (192 horas) dias a partir do enriquecimento com $^{13}\text{CO}_2$, sendo feitas em triplicatas.

Desta forma, foram determinados os períodos de amostragem das plantas de modo que pudessem ser acessados tanto os micro-organismos dominantes na assimilação de metabólitos marcados com ^{13}C (primeiros dias da marcação) quanto àqueles que apresentam uma incorporação mais tardia do ^{13}C permitindo, deste modo, avaliar a estrutura das comunidades de micro-organismos presentes nos diferentes níveis tróficos estabelecidos nas

proximidades da rizosfera das plantas de cana-de-açúcar. Isso permitiu montar o seguinte delineamento experimental:

T1 – *enriquecimento com $^{13}\text{CO}_2$ e incubação a 350 ppm* -> amostras **M11-3**, **M12-3** e **M13-3** (2º dia); amostras **M21-3**, **M22-3** e **M23-3** (4º dia); amostras **M31-3**, **M32-3**, **M33-3** e **M34-3** (8º dia).

T2 - *enriquecimento com $^{13}\text{CO}_2$ e incubação a 700 ppm* -> amostras **M11-7**, **M12-7** e **M13-7** (2º dia); amostras **M21-7**, **M22-7** e **M23-7** (4º dia); amostras **M31-7**, **M32-3**, **M33-3**, **M34-3** (8º dia).

T3 – *incubação a 350 ppm sem enriquecimento* -> amostras **C11-3**, **C12-3** e **C13-3** (2º); amostras **C21-3**, **C22-3** e **C23-3** (4º dia); amostras **C31-3**, **C32-3** e **C33-3** (8º).

T4 - *incubação a 700 ppm sem enriquecimento* -> amostras **C11-7**, **C12-7** e **C13-7** (2º); amostras **C21-7**, **C22-7** e **C23-7** (4º dia); amostras **C31-7**, **C32-7** e **C33-7** (8º dia)].

2.2.2.5 Extração e preparo das amostras de DNA da rizosfera

Cada amostra coletada, ao longo do período de marcação com $^{13}\text{CO}_2$, foi imediatamente levada para o laboratório, onde o solo não aderido às raízes foi removido, mantendo-se o solo aderido a uma distância máxima 2 mm da raiz para compor o material rizosférico utilizado no experimento. Os ácidos nucleicos foram removidos com kit comercial *MoBio PowersoilTM DNA Isolation* empregando-se todos os procedimentos descritos no item '2.2.1.2' (ver materiais e métodos). Após extração, o DNA foi quantificado no equipamento NanoDrop® ND-1000 UV-Vis *Spectrophotometer* (Uniscience). A determinação das concentrações de ácidos nucleicos presentes nas amostras é fundamental para se determinar os devidos ajustes operacionais na etapa de separação por fracionamento. Após a quantificação, as amostras foram submetidas a procedimentos de diluições ou concentrações, quando necessário, para se poder

padronizar a concentração de todas as amostras em torno de 50 ng/μL. Quando necessário, o procedimento de concentração foi realizado com o concentrador a vácuo *Vacufuge® plus* (Eppendorf) a 45 °C por em média 10 a 15 minutos.

2.2.2.6 Separação do DNA total por ultracentrifugação

A separação do DNA marcado (^{13}C -DNA) foi realizada de acordo a adaptação da metodologia feita por Manefield et al. (2002), que utiliza a centrifugação por gradiente de densidade com uma solução de trifluoroacetato de cério (CsTFA; Amersham Biosciences) (SAIA et al., 2010). Para cada procedimento de centrifugação foram preparados 12 mL de solução de CsTFA/GB de modo que a solução final apresente uma densidade de 1,61 g.mL⁻¹ a 1,62 g.mL⁻¹. Para tanto, é necessário se fazer uma solução com 7,4 mL de CsTFA (densidade 2,0 g.mL⁻¹) e 4,6 mL do Tampão GB (densidade 1,0 g.mL⁻¹) aferindo-se, posteriormente, a densidade da solução com o auxílio do Refratômetro AR200 (Reichert) e fazendo as devidas adições de solução até se obter a densidade ideal. Optou-se por trabalhar sempre com a solução de CsTFA/GB com a densidade de 1,62 g.mL⁻¹. Aliquotas de 10 μL do DNA total extraído de cada amostra, correspondendo a aproximadamente 500 ng de ^{12}C -DNA e ^{13}C -DNA, foi adicionado a tubos de 2,2 mL, contendo 2,090 mL de CsTFA/GB com densidade de 1,62 g.mL⁻¹ (SAIA et al., 2010). Tubos controle também foram preparados, contendo 10 μL de água ultrapura. Os tubos foram centrifugados em ultracentrífuga de bancada Optima TLX 120000 (Beckman, USA), com rotor de ângulo fixo TLA 120.2, a 64000 rpm por 40h, a 20 °C.

2.2.2.7 Fracionamento dos gradientes de centrifugação

Após o período de centrifugação, as frações foram imediatamente obtidas por fracionamento com seringa de 60 mL contendo 20 mL de água ultrapura estéril com 20 μL de solução de resazurina 0,1%, para que a água tenha

coloração azul e assim permita a visualização do esgotamento dos tubos. O esgotamento foi feito do topo à base dos tubos, utilizando o Sistema de Recuperação de Fracionamento (Beckman), com seringa acoplada à bomba de infusão. Um total de 25 frações, contendo 80 µL de amostra cada foram coletadas sob uma vazão de 0,2 mL.min⁻¹. Para cada alíquota determinou-se o gradiente de densidade utilizando-se o Refratômetro AR200 (Reichert) e as frações com gradiente de densidade entre 1,60 a 1,65 (SAIA et al., 2010) foram armazenadas por conter o DNA marcado. Após as medida dos índices de refração das frações foi elaborada a curva de densidade (g.mL⁻¹) com o índice de refração (IR) e, a partir da equação da reta ($y = ax + b$, aonde $y = IR$ e $x =$ densidade) foi calculado o R^2 da regressão. As frações foram quantificadas no fluorômetro Qubit (Invitrogen) utilizando o kit Quant-iT dsDNA HS (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante.

2.2.2.8 Precipitação do DNA das frações do gradiente

O DNA contido em cada fração da solução de CsTFA/GB, obtidas após a etapa de fracionamento, foi precipitado overnight a 4°C pela adição de 500 µL de isopropanol gelado. Os microcubos contendo o material foram então centrifugados por 30 min em rotação máxima (~14.000 rpm), à temperatura de 4°C. O sobrenadando foi removido invertendo-se os tubos delicadamente. Em seguida, os precipitados foram lavados com 500 µL de etanol 70% gelado e os tubos foram centrifugados novamente por 15 min a ~14.000 rpm, à temperatura de 4°C. O etanol foi removido invertendo-se os tubos cuidadosamente. Para reduzir o tempo de evaporação do etanol residual, os tubos foram centrifugados por mais 30 segundos a 14.000 rpm e o excesso foi removido com pipeta. Em seguida, após completa evaporação do etanol residual, o DNA foi eluído em solução em água livre de nucleases (ultrapura autoclavada) e estocado a -20°C (SAIA et al., 2010).

2.2.2.9 Amplificação do genoma inteiro

Devido as obtenções de baixas quantidades de DNA marcado, após a etapa de purificação e precipitação do DNA, tais amostras foram submetidas à metodologia de amplificação total do genoma com o *Whole Genome Amplification* (WGA4) Kit (Sigma). Para tanto, 9,0 µL de cada amostra contendo o DNA foram utilizados. Em cada amostra foi adicionado 2,0 µL da solução 1XSingle-Cell-Library-Preparation-Buffer e, em seguida, foi adicionado 1,0 µL de Library Stabilization Solution. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 95°C por 2'. Em seguida, as amostras foram arrefecidas em gelo e depois foram consolidadas em breve spin. Foi adicionado 1,0 µL da solução Library Preparation Enzyme, totalizando um volume de 14 µL por amostra. As amostras foram homogeneizadas e, posteriormente, submetidas a seguinte incubação: 16°C por 20', 24 °C por 20', 37°C por 20', 75°C por 5' e arrefecimento final a 4°C. Após a incubação, as amostras foram levemente centrifugadas e depois foi adicionado a cada uma 7,5 µL de 10XAmplification Master Mix, 48,5 µL de Água ultrapura livre de nucleases e 5,0 µL de WGA DNA Polimerase. A solução foi homogeneizada e levemente centrifugada para em seguida ser submetida a seguinte ciclagem de reação: desnaturação a 94°C por 30 segundos e anelamento/extensão a 65°C por 5', por 25 ciclos. Por fim as amostras foram resfriadas a 4°C e armazenadas. Os produtos da reação foram avaliados em gel de agarose a 1%, seguido de coloração em brometo de etídeo e visualização em luz ultravioleta.

2.2.2.10 Análise da estrutura bacteriana da rizosfera por meio de PCR-DGGE

A metodologia da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) também foi aplicada para analisar a diversidade microbiana dos grupos rizosféricos separados através da técnica de SIP e amplificados por meio do

WGA kit. A técnica foi feita de acordo com Haichar et al. (2008), utilizando os mesmo procedimentos descritos no subitem '2.2.2.1' (materiais e métodos).

As reações foram feitas tanto para o gene 16S rDNA de bactérias quanto para a região ITS e fungos. A metodologia de PCR-DGGE para o gene 16S rDNA (Bactéria) adotada neste experimento foi exatamente a mesma detalhada no número '2.2.2.1' da metodologia. A amplificação do fragmento do gene ITS DNAr foi realizada através de duas reações. A primeira utilizou os *primers* EF4 e ITS4. Os ciclos para amplificação foram: desnaturação inicial de 5' a 94°, seguida de 35 ciclos de 0,5' a 94°C, 0,5' a 55°C, 1,30' a 72°C, e uma extensão final de 5' a 72°C. A segunda reação utilizou os *primers* ITS1f-GC e ITS2. Os ciclos para amplificação da segunda reação para região ITS foram os mesmos da primeira, resultando em 50 µL de produto de PCR. O gradiente desnaturante foi de variando entre 30 a 50%, onde 100% de desnaturação consiste na concentração de 7 M de ureia e 40% de formamida, formados a partir de soluções estoque de poliacrilamida (8%) contendo 0% e 100% de desnaturantes. O gel obtido foi tratado de acordo com todos os procedimentos descritos anteriormente nos itens. '2.2.1.3' (ver materiais e métodos).

2.2.2.11 Análises multivariadas dos dados de estrutura bacteriana

Os dados fornecidos pela análise dos perfis de banda gerados pela metodologia de DGGE, foram todos analisados por meio do software PAST 1.90 usando todos os procedimentos e métodos descritos no subitem '2.2.1.4' (ver materiais e métodos).

2.3 Resultados e Discussões

2.3.1 Diversidade microbiana associada a variedades de cana-de-açúcar

2.3.1.1 Análise dos perfis gerados de DGGE

A técnica de DGGE permitiu inferir sobre a estrutura das comunidades microbianas pelo número (qualitativo) e intensidade (quantitativo) das bandas encontradas, respectivamente. No entanto, a literatura recomenda se realizar uma ampla amostragem para garantir uma boa representatividade dos ambientes estudados (BOA-SORTE, 2009). Sendo assim, o presente estudo buscou realizar uma amostragem de diferentes variedades de cana-de-açúcar a fim de se obter um maior número de dados para análise comparativa da diversidade bacteriana entre o *bulk soil* e a rizosfera.

Os dendogramas obtidos por meio da técnica de DGGE mostraram que houve uma tendência de separação entre as comunidades bacterianas do *bulk soil* e da rizosfera para as diferentes variedades de cana-de-açúcar. Ainda, pode-se observar uma maior similaridade entre as amostras de solo, enquanto que as amostras da rizosfera de cada variedade se mostram mais distintas entre si (Figura 2). As diferenças existentes entre as estruturas das comunidades de bactérias do *bulk soil* e da rizosfera podem ser explicadas em função dos teores e da diversidade das fontes de carbono existentes nessas regiões, pois na rizosfera é liberada uma grande quantidade de metabólitos distintos que podem influenciar na distribuição e diversidade dos micro-organismos do solo (KANG et al., 2004; MEDEIROS et al., 2006; COMPANT et al., 2010).

Os resultados são condizentes quando são comparados os perfis obtidos para a análise geral de bactérias com os perfis obtidos para as análises de grupos específicos de α -proteobactérias e β -proteobactérias. Isto mostra que dentro do grupo geral de bactérias, tais grupos também são responsivos a influência da rizosférica de diferentes cultivares de cana-de-açúcar, o que corrobora dados da literatura (MARIN et al., 1999; RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; BODDEY et al., 2003; BALDANI, 2005; MOREIRA et al., 2010).

Figura 2 - Análise de dendogramas, por meio da técnica de PCR-DGGE, evidenciando diferenças entre as comunidades bacterianas colonizadoras do **bulk soil** (em vermelho) e da rizosfera (em azul) de diferentes variedades de cana-de-açúcar: **RB86-7515**; **PO8862**; **RB85-5156**; **RB85-5453**; **SP5541**; e **SP5543**. Os prefixos 'S' e 'R' significam bulk soil e rizosfera, respectivamente. Os grupos bacterianos foram acessados da comunidade total através de primers específicos para o grupo das bactérias totais (A), α -proteobactéria (B) e β -proteobactéria (C). Análises feitas no software PAST 1.90

De maneira mais específica, várias separações de variedades específicas podem ser observadas. Um exemplo disso mostra que as comunidades de α -proteobactéria e β -proteobactéria do **bulk soil** da variedade SP5543 (C7V) formaram um cluster separado dos demais cultivares.

Outros resultados obtidos através da análise de componentes principais (PCA) revelaram que a estrutura das comunidades bacterianas totais da rizosfera se distancia da presente no **bulk soil**, havendo a formação de dois

grupos, um com uma maior concentração de comunidades do solo e outro com maiores concentrações das comunidades da rizosfera (Figura 3).

Figura 3 - Análise de componentes principais (PCA) para a matriz de similaridade (Bray-Curtis) das variedades de cana-de-açúcar obtidas por meio da técnica de PCR-DGGE, evidenciando diferenças entre as comunidades bacterianas colonizadoras do bulk soil e da rizosfera de diferentes variedades de cana-de-açúcar: **RB7515**; **PO8862**; **RB85-5156** (C7III); **RB85-5453** (C7V); **SP5541** (D8); e **SP5543** (D9). Os prefixos 'S' e 'R' significam bulk soil e rizosfera de cana-de-açúcar, respectivamente. Bactérias totais (16S rDNA), (A) α -proteobacteria (B) e β -proteobacteria (B). Análises feitas no software PAST 1.90

Para se testar a ocorrência de significância para as separações das comunidades da rizosfera e do *bulk soil*, a análise de similaridade de ANOSIM foi aplicada. Essa análise permite avaliar o distanciamento entre grupos através das correlações (R) entre eles. Valores de R próximos a 1,0 (um) indicam plena separação entre os grupos, enquanto os valores entre 0,5 a 0,7 representam separações com sobreposições (CLARKE; GORLEY, 2001).

A análise geral mostrou que as comunidades de bactérias totais (gene 16S rDNA) da rizosfera e do *bulk soil* se separam com sobreposições, o que significa que os dois grupos se distinguem, porém, compartilham de algumas grupos semelhantes de micro-organismos ($R_{\text{Bray-Curtis}} = 0,550$, $p \leq 0,01$). Também houve separação dos *clusters*, com sobreposições, entre as comunidades β -*proteobacteria* da rizosfera e do *bulk soil* ($R_{\text{Bray-Curtis}} = 0,570$, $p \leq 0,01$). O mesmo não foi observado entre as comunidades de α -*proteobacteria* ($R_{\text{Bray-Curtis}} = 0,440$, $p \leq 0,01$). Nascimento (2006), estudando estrutura das comunidades de β -*proteobacteria* observou que as variações em tais grupos estavam mais relacionadas à quantidade de bactérias do que com a diversidade. Entretanto, sabe-se que diferentes espécies vegetais têm distintas peculiaridades metabólicas, exsudando compostos diferentes, o que pode interferir diferencialmente na diversidade dos micro-organismos próximos as raízes (MEDEIROS et al., 2006).

A análise de similaridade de ANOSIM também permitiu a comparação entre as estruturas das comunidades de bactérias associadas às plantas cultivadas nas duas regiões de coleta (Fazenda Areão e Usina A). Os resultados demonstraram que houve separação com sobreposição entre as comunidades de bactérias totais (16S rDNA) da rizosfera ($R_{\text{Bray-Curtis}} = 0,55$, $p \leq 0,01$), entretanto, as comunidade do *bulk soil* da Fazenda Areão diferiu muito da comunidade encontrada no *bulk soil* da Usina A ($R_{\text{Bray-Curtis}} = 0,772$, $p \leq 0,01$). Os resultados também demonstraram a ocorrência de separações com sobreposições entre os grupos de bactérias do *bulk soil* da Fazenda Areão e da Usina A, tanto para as comunidades de α -*proteobacteria* ($R_{\text{Bray-Curtis}} = 0,607$, $p \leq 0,01$) como para β -*proteobacteria* ($R_{\text{Bray-Curtis}} = 0,627$, $p \leq 0,01$). O mesmo não foi observado na rizosfera, tanto para α -*proteobacteria* ($R_{\text{Bray-Curtis}} = 0,406$, $p \leq 0,01$) quanto para β -*proteobacteria* ($R_{\text{Bray-Curtis}} = 0,298$, $p \leq 0,01$). Esses resultados sugerem uma maior especificidade do ambiente rizosférico de cana-de-açúcar em selecionar grupos específicos que se associam com as plantas mesmo sob diferentes características dos solos e condições de manejo das culturas de cana-planta com a mesma idade. Essas variações podem estar correlacionadas com o processo de exudação da cana-de-açúcar e de outras espécies como grama (MEDEIROS et al., 2006; DRIGO et al., 2010), explicando o motivo de se

observar variações na estrutura das comunidades de bactérias, principalmente as *β-proteobacteria*, tendo em vista a alta versatilidade metabólica desse grupo na utilização de diversos compostos para seu metabolismo (BODDEY et al., 2003; MENDES et al., 2007).

A análise de similaridade de ANOSIM foi feita também para comparar a diferença nas estruturas de bactérias da rizosfera e do *bulk soil* entre todas as variedades de cana-de-açúcar, revelando distinção de todas as variedades entre si para cada teste realizado (bactérias totais, *α-proteobacteria* e *β-proteobacteria*), resultando $R_{\text{Bray-Curtis}} = 1,000$ ($p \leq 0,01$) para cada comparação feita entre amostras do mesmo ambiente (rizosfera e *bulk soil*). Isso significa que a estrutura das comunidades de bactérias tanto da rizosfera quanto do *bulk soil* é diferente em cada variedade de cana-de-açúcar, o que não é observado quando se faz a análise geral entre as comunidades da rizosfera e *bulk soil*, como foi demonstrado anteriormente.

Com base ainda nos resultados obtidos com as análises de agrupamento de bactérias totais (gene 16S DNA), foram estabelecidos quatro grupos: **a1 -> Rizosfera** das variedades **RB85-5156, SP5543, RB86-7515 e PO8862**; **a2 -> Bulk soil** das variedades **SP5541, RB85-5453, RB85-5156 e SP5543**; **a3 -> Bulk soil** das variedades **RB86-7515 e PO8892**; **a4 -> Rizosfera** das variedades **RB85-5453 e SP5541**. Com bases nesses agrupamentos, foi feita uma análise de coordenada principais (PCoA) demonstrando haver separações principalmente entre os grupos a1 (rizosfera), a3 (*bulk soil*) e a4 (rizosfera) (Figura 4).

	Rizosfera (a1)	Bulk Soil (a2)	Bulk Soil (a3)	Rizosfera (a4)
Rizosfera (a1)	0	0.7163	0.9573	0.9441
Bulk Soil (a2)	-	0	0.7718	0.7855
Bulk Soil (a3)	-	-	0	0.9926
Rizosfera (a4)	-	-	-	0

Esses resultados permitiram a seleção de amostras representativas de rizosfera e *bulk soil*, presentes nos grupos que mais se distanciaram entre si, com o objetivo de se realizar a análise de sequenciamento por *Ion Torrent*TM. Como os grupos que mais se distanciaram foram a1 (rizosfera), a3 (*bulk soil*) e a4 (rizosfera), desses foram selecionadas quatro amostras para serem sequenciadas. Além desses dados, sabe-se que a rizosfera é um ambiente onde geralmente ocorre uma maior diversidade de espécies microbianas, em contraste com as regiões mais afastadas dessa zona, devido à liberação de metabólitos diversos pelas raízes das plantas que podem alterar o perfil de espécies associadas à rizosfera (BAUDOIN et al., 2003; COCKING, 2003; KANG et al., 2004), o que corroborou com o critério de seleção das amostras mais representativas para o sequenciamento.

Diante dos resultados obtidos com as análises de agrupamentos e significância, foram selecionadas três amostras da rizosfera das variedades **RB85-5453**, **RB86-7515** e **RB85-5156** uma do *bulk soil* da variedade **R-RB86-7515** para se realizar o sequenciamento, sendo que o teste de ANOSIM revelou plena separação entre as comunidades de bactérias totais (genes 16S rDNA) representadas pelas quatro amostras ($R_{\text{Bray-Curtis}} = 1$, $p \leq 0,01$), ao mesmo tempo em que essas amostras representaram bem os grupos que pertencem. Desta forma, pode-se avaliar a ocorrência de possíveis grupos diferenciais entre as amostras de rizosfera e *bulk soil* de diferentes variedades de cana-de-açúcar, sendo este o objetivo central deste trabalho.

2.3.1.2 Estudo da diversidade bacteriana na rizosfera de cana-de-açúcar por meio de sequenciamento via *Ion Torrent*TM

O sequenciamento gerou um conjunto de dados de 47.906 sequências (em média 11.976.5 por amostra) com um fragmento de aproximadamente 75 pb. Utilizando o software QIIME, foi possível a afiliação das sequências a UTOs (*Operational Taxonomic Units*) a um nível de 97% de similaridade pelo método *uclust* utilizando o software QIIME. Devido a dimensão dos dados, o comando

'*pick_rep_set.py*' foi aplicado no QIIME com o objetivo de selecionar sequências mais representativas das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) agrupadas. Esse procedimento facilitou o processo de alinhamento pela metodologia PYNASY realizada pelo comando '*align_seqs.py*'.

Os resultados demonstraram que para a amostra de *Bulk soil* a diversidade e riqueza foram menores do que nas amostras de rizosfera, de acordo com os índices de Chao1 e Shannon-Weaver, respectivamente (Tabela 3). Sabendo-se que os resultados anteriores classificaram as quatro amostras utilizadas no sequenciamento (rizosferas das variedades **RB85-5453**, **RB86-7515** e **RB85-5156**; e *bulk soil* da variedade **R-RB86-7515**) como amostras bem representativas dos principais grupos de rizosfera e *bulk soil*, infere-se que uma resposta similar pode ocorrer para as estruturas das comunidades bacterianas do *bulk soil* e da rizosfera pertencentes às outras variedades não utilizadas no sequenciamento. Os resultados demonstraram que para um nível de dissimilaridade de 3%, o número de UTOs detectado nas comunidades das quatro áreas foi próximo do número de UTOs estimados pelo índice de riqueza de Chao1, evidenciando uma boa cobertura das sequências representativas da comunidade total de bactérias através do método de sequenciamento utilizado. O índice de Chao1 demonstrou uma maior riqueza de UTOs na rizosfera da variedade RB85-5453 e menor riqueza no *bulk soil* da variedade RB86-7515. Além disso, os resultados demonstraram que as regiões apresentaram diversidades de UTOs, semelhantes de acordo com o índice de diversidade de Simpson. Entretanto, o índice de diversidade de Shannon mostrou que houve maior diversidade no ambiente rizosférico da variedade RB86-7515 e menor diversidade no solo, que foi cultivado com essa mesma variedade.

Tabela 3 - Índices de diversidade e riqueza das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) para as quatro amostras representativas selecionadas pelos testes de similaridade entre estruturas de comunidades bacterianas totais. As UTOs foram detectadas ao nível de 3% de dissimilaridade

Amostra (ambiente)	Nº sequências	Nº OTU	Chao1	Shannon	Simpson
RB86-7515 (rizosfera)	35.628	11509	11813.75	11.459	0.9993
RB85-5156 (rizosfera)	19.808	6463	11857.37	11.201	0.9992
RB85-5453 (rizosfera)	24.120	8109	14523.04	11.377	0.9991
RB86-7515 (<i>bulk soil</i>)	16.256	6067	6539.25	10.564	0.9983

A análise das sequências geradas permitiu a classificação das bactérias com base na matriz de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) formada pelo software QIIME, mostrando um índice de cobertura em torno de 88% das sequências totais geradas.

Os resultados mostraram que os filos mais abundantes encontrados foram: *Actinobacteria* (29,1%), *Proteobacteria* (22,8%), *Acidobacteria* (13,1%), *Firmicutes* (6,6%), *Verrucomicrobia* (4,5%), *Bacteroidetes* (2,8%), *Chloroflexi* (2,1%), *Gemmatimonadetes* (1,6%), *Cyanobacteria* (1,5%) e *Planctomycetes* (1,1%) (Figura 5).

Figura 5 - Diversidade dos principais filos bacterianos, obtidos a partir dos dados da matriz de unidades taxonômicas operacionais (UTOs), para as diferentes variedades de cana-de-açúcar e seus respectivos nichos ecológicos: Rizosfera da variedade RB85-5453 (R1); Rizosfera da variedade RB85-5156 (R2); Rizosfera da variedade RB86-7515 (R3); e Bulk soil da variedade RB86-7515 (S). Feito no QIIME

O grupo das *Actinobacteria* foi o mais abundante em todas as amostras, sendo um grupo frequentemente associado a gramíneas (DUNBAR et al., 2002), compreendendo o grupo de micro-organismos com alto teor de G+C da família *Actinomycetales* e gêneros relacionados (STACKEBRANDT et al., 1997). O filo *proteobacteria* foi o segundo mais frequente, sendo que esse filo corresponde a micro-organismos encontrados em solos de cultivo de pastagem em regiões tropicais (NÜSSLEIN; TIEDJE, 1999) e também em solos contaminados com metais pesados e de pH elevado e até em ambientes marinhos (NOLD et al., 2000; SANDAA et al., 2001; VAL-MORAES, 2008). Além disso, são encontrados na natureza, grupos de Proteobacterias desempenhando papel ativo no ciclo do nitrogênio, principalmente as *β-proteobacteria* e *γ-proteobacteria* amônio-oxidantes, sendo representadas as *Nitrosomonas*, *Nitrospira* e *Nitrosococcus* (NOLD et al., 2000; PURKHOLD et al., 2003). Portanto, as *Proteobacteria* desempenham um papel importante no meio ambiente e, em especial, nos solos cultivados.

Além do grupo das *Proteobacteria* possuem representantes envolvidos com os processos de ciclagem do nitrogênio no solo, também existem micro-organismos nesse grupo, pertencentes à classe *α-proteobacteria*, que possuem a capacidade de assimilar moléculas orgânicas, como o metano, junto com outros organismos do filo das *Acidobacteria* (RADAJEWSKI et al., 2000). Smit e colaboradores (2001) estudando grupos microbianos relacionados às condições de fertilidade do solo, usaram dados da sequência do gene 16S rRNA para estudo de cinco divisões bacterianas (*Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Nitrospira*, *Cyanobacteria* e bactérias verdes sulfóreas), fizeram a comparação da relação entre abundância desses grupos com a fertilidade do solo, apontando que a razão entre o número de *Proteobacteria* e *Acidobacteria* serve como um dos indicadores da condição nutricional do solo. Esse sistema se justifica pelo fato de representantes do filo *Proteobacteria* crescerem melhor em solos de pH elevado (SANDAA et al., 2001), que geralmente são os solos de cultivo devido aos tratamentos culturais, principalmente calagem (NÜSSLEIN e TIEDJE, 1999). Isso esclarece os motivos de se ter encontrado uma alta frequência de Proteobacterias tanto no *bulk soil* quanto nas rizosferas de cana-de-açúcar. Além disso, a diversidade microbiana geralmente é maior nas zonas mais próximas a rizosfera (Tabela 3)

devido a maior diversidade de compostos orgânicos importantes para a manutenção da diversidade nesses ambientes (KANG et al., 2004; MEDEIROS et al., 2006), auxiliando ainda na qualidade físico-química do solo, entre elas pH, próximo às raízes das plantas (FEARNSIDE; BARBOSA, 1998). As sequências obtidas com o sequenciamento também permitiram a determinação dos principais arranjos filogenéticos com base na matriz de UTOs (Figura 6). Esses resultados permitiram demonstrar que dentro da classe das *α-proteobacterias*, se destacaram os grupos pertencentes às ordens *Rhizobiales* e *Sphingomonadales*, envolvidas do processo de fixação biológica de nitrogênio (VAL-MORAES, 2008).

Figura 6 – *Heatmap* da classificação filogenética baseada nos agrupamento das Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs, ID = 70) encontradas em rizosfera e *bulk soil* de diferentes variedades de cana-de-açúcar (RB86-7515, RB85-5156 e RB85-5453) e a seus respectivos nichos ecológicos: Rizosfera da variedade RB85-5453 (R1); Rizosfera da variedade RB85-5156 (R2); Rizosfera da variedade RB86-7515 (R3); e *Bulk soil* da variedade RB86-7515 (S). Feito no QIIME

Os resultados também demonstram que dentro do filo *Proteobacteria* a classe das γ -*proteobacteria* foi a mais frequente, principalmente na região rizosférica, o que evidencia a importância do grupo das *Proteobacteria* na associação com a cana-de-açúcar. A classe β -*proteobacteria* teve como o principal representante o gênero *Burkholderia*, frequentemente relatado pela literatura como um gênero intimamente associado a plantas de cana-de-açúcar, possuindo uma grande versatilidade metabólica (BALDANI et al., 1997), podendo promover o desenvolvimento das plantas por diversos mecanismos como a fixação biológica do nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico, produção de reguladores de crescimento vegetal e de controle de fitopatógenos (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006; BALDANI et al., 1997; BODDEY et al., 2003; SALLES, 2005). Além disso, esse gênero pode penetrar nos tecidos das plantas, assumindo característica de endofítico (MENDES et al., 2007; KUSS et al., 2007). No caso dos grupos das *Proteobacterias* e *Acidobacteria*, tão frequente em solos e rizosfera de cana-de-açúcar, podem ser encontrados representantes importantes na participação de ciclos biogeoquímicos e na assimilação de moléculas importantes como, por exemplo, o fenol, o metano (RADAJEWSKI et al., 2000; MANEFIELD et al., 2004; DUMONT et al., 2011).

Devido a grande importância do grupo das β -*proteobacteria* para a cana-de-açúcar, as sequências também foram analisadas no QIIME, utilizando a matriz de UTOs, através da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) comparação, realizada para testar as variações na estrutura desse grupo entre as diferentes amostras sequenciadas. Os resultados demonstraram haver uma contrastante separação da diversidade β -*proteobacteria* entre a rizosfera (variedades **RB86-7515**, **RB85-5156** e **RB85-5453**) e o *bulk soil* (variedade **RB86-7515**), explicando um total de 91,55% da variabilidade total existente (Figura 7).

Além desses resultados, com o objetivo de se comparar a classificação das OTUs, realizada pelo software QIIME, para os principais filos e classes de bactérias, as sequências também foram analisadas por meio do software MOTHUR v.1.7.2 que utiliza como referência o banco de dados fornecido pela plataforma do RDP (*Ribosomal Database Project*).

Figura 7 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA), baseada na matriz de distância UniFrac ponderada para OTUs, mostrando diferenças entre a diversidade de *β-proteobacteria* do *bulk soil* com relação à rizosfera de diferentes plantas de cana-de-açúcar: Rizosfera da variedade RB85-5453 (**R1**); Rizosfera da variedade RB85-5156 (**R2**); Rizosfera da variedade RB86-7515 (**R3**); e *Bulk soil* da variedade RB86-7515 (**S**). Feito no QIIME

A matriz de UTOs para classes e filos serviu como base de dados de entrada para o software R 2.12 com, permitindo gerar *heatmaps* agrupando os principais filos e classes de bactérias em função das amostras sequenciadas (Figura 8). Os resultados foram semelhantes aos que foram obtidos no QIIME, indicando, mais uma vez, que o *Acidobacteria* foi mais frequente para o *bulk soil* comparado a rizosfera de cana-de-açúcar encontrando uma grande frequência de grupos das classes *Acidobacteria*, *Solibacteria* e *Chloracidobacteria*. Apesar desses dados, verificaram-se algumas peculiaridades entre os resultados do *heatmap* gerado pelo software QIIME, que utilizou o banco de dados do *Greengenes*, com relação aos resultados gerado com base na matriz de UTOs obtida pelas análises realizadas no software MOTHUR, usando o banco de dados do RDB (*Ribosomal Database Project*).

Os resultados gerados pelo MOTHUR destacaram mais a diferenciação da rizosfera com relação ao *bulk soil*, sendo especialmente importante por destacar o papel dos filos e, principalmente, das classes de micro-organismos na

variação da estrutura das comunidades de bactérias nesses nichos. Além disso, os resultados obtidos pelo MOTHUR evidenciaram participação da *classe* β -*proteobacterias* nas amostras avaliadas, informação pouco enfatizada pelos dados resgatados pelas análises no QIIME. Esses resultados mostram a importância da escolha dos bancos de dados, bem como dos algoritmos utilizados para o alinhamento, e demais análises metagenômicas para abordagem microbiológica ambiental. Além disso, a presença marcante de β -*proteobacterias*, principalmente no ambiente rizosférico de plantas de cana-de-açúcar, é um fato importante, pois se sabe que ao longo do cultivo das plantas a variação desse grupo na nesse ambiente está mais relacionada ao número de indivíduos do que com a sua diversidade (NASCIMENTO, 2006).

Figura 8 - Análise de agrupamentos (*heatmap*) baseada nos dados de abundância total das UTOs para os filos (A) e classes (B) e de micro-organismos, encontradas em *bulk soil* e em diferentes rizosferas de variedades de cana-de-açúcar e seus respectivos nichos ecológicos Rizosfera da variedade RB85-5453 (R1); Rizosfera da variedade RB85-5156 (R2); Rizosfera da variedade RB86-7515 (R3); e *Bulk soil* da variedade RB86-7515 (S). Análise feita no software R 2.12 a partir da matriz de UTOs gerada pelo software MOTHUR v.1.7.2 com referência ao bando de dados do RDP

Os *heatmaps* mostraram que para os agrupamentos com referência aos filós, a separação entre as comunidades de bactérias da rizosfera e do *bulk soil* não foi tão perceptível. Entretanto, para o agrupamento com referência as principais classes, foi verificada a distinção entre as amostras de rizosfera e a do *bulk soil*. Esses resultados foram semelhantes aos dados obtidos pela análise de coordenadas principais (PCoA) feita com os dados de DGGE para verificar as comunidades bacterianas totais por meio da reação de PCR do gene 16S rDNA (ver Figura 4) assim como foram semelhantes as análises feitas no QIIME para a β -diversidade (ver Figura 7). Isso comprova a alta representatividade da técnica de DGGE em descrever as bases da variabilidade estrutural das comunidades microbianas colonizadoras de ambientes contrastantes. De forma geral, os resultados indicam que a cana-de-açúcar estabelece um nicho específico na sua zona rizosférica, com relação ao *bulk soil*, favorecendo a permanência de micro-organismos distintos, principalmente os representantes dos filós *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Acidobacteria*, o que demonstram maiores variações em suas estruturas, riqueza e diversidade em função do afastamento da rizosfera da rizosfera. Neste contexto, o estudo da diversidade microbiana associada às plantas de cana-de-açúcar é importante, sobretudo, por que os principais grupos identificados em associação com essa planta têm demonstrados mecanismos potenciais para melhorar as características econômicas da cultura pela diminuição do uso de produtos não renováveis empregados na fabricação de fertilizantes (BODDEY et al., 2003; MENDES et al., 2007; LUVIZOTTO et al., 2010). Além disso, percebe-se também que tanto a diversidade como a riqueza das espécies de bactérias totais associadas às plantas de cana-de-açúcar sofrem alterações com o distanciamento da zona rizosférica. Também se observou maior variação no índice de Chao1 do que nos índices de Shannon e Simpson, o que pode indicar que a variação ocorrida nas comunidades microbianas associadas às diferentes variedades de cana-de-açúcar, está mais correlacionada com a quantidade de bactérias do que com a diversidade.

As variações observadas no trabalho para a estrutura das comunidades bacterianas da rizosfera e do *bulk soil* de cana-de-açúcar podem ocorrer por diversos motivos. Basicamente, isso se deve pelo fato da diversidade microbiana nos solos ser bastante dinâmica e apresentar alta reprodutibilidade dos

organismos, elevando a capacidade adaptativa em função das alterações ambientais (ABBY; DAUBIM, 2007). Isso sugere que a transição de micro-organismos do solo para as regiões mais próximas a zona radicular, pode afetar a estrutura das comunidades nativas, devido fatores como alterações nos teores de matéria orgânica (ROSCOE et al., 2006; GALDOS; CERRI; CERRI, 2009), teores de carbono lábil (ARAÚJO et al., 2011), competição entre micro-organismos (FONTAINE et al. 2007) e mais recentemente estudos apontam para o efeito da exsudação radicular e a influência das concentrações de CO₂ sobre a diversidade microbiana de bactérias e fungos rizosféricos arbusculares (FMA) (BAUDOIN et al., 2003; CARNEY et al., 2007; DRIGO, et al., 2010; XIA JIA, et al., 2011). Entretanto, não há na literatura, até o presente momento, estudos respeito dessa interação dos micro-organismos com os metabólitos exsudados cana-de-açúcar em função das concentrações de CO₂ atmosférico. É importante também frisar que o emprego metodologias modernas, como a técnica de SIP pode ajudar a elucidar uma série de processos e ciclos metabólicos, muitas vezes complexos, fornecendo informações preciosas sobre grupos de micro-organismos que apresentam alta versatilidade metabólica (RADAJEWSKI et al., 2000)

2.3.2 Análise da estrutura de bactérias e fungos por meio de SIP

2.3.2.1 Resultados dos testes de respiração das plantas

O princípio de Marcação com Isótopo Estável (SIP – Stable Isotope Probing) é na incorporação, pela biomassa microbiana, de substratos enriquecidos isótopos estáveis de baixa abundância natural (^{13}C ou ^{15}N) permitindo uma distinção desses grupos de outros que não apresentam tal versatilidade (BOSCHKER; MIDDELBURG, 2002). No presente estudo, o elemento $^{13}\text{CO}_2$ serviu de substrato para a planta que, por sua vez, assimilou esse elemento e o disponibilizou na forma de compostos orgânicos, enriquecidos com o ^{13}C proveniente da atmosfera. Para tanto, as medições nos níveis de CO_2 no interior das cubas do experimento foram fundamentais, pois permitiram determinar a taxa média de fixação do CO_2 por planta durante todo o período de realização da incubação e também durante os dias de marcação com $^{13}\text{CO}_2$. Essa informação é fundamental para se poder calcular o volume mínimo de $^{13}\text{CO}_2$ que deve ser usado para o enriquecimento das plantas, permitindo a recuperação de uma quantidade de ^{13}C -DNA que seja suficiente para a realização dos procedimentos posteriores. Com base nas características fisiológicas das plantas de cana-de-açúcar aos três meses de idade, foi possível se calcular a área foliar média de cada planta utilizada no experimento com base na equação proposta por Santos et al. (2009) (Equação 1).

$$\mathbf{AF = C \times L \times N \times 0,75} \quad (\text{Equação 1})$$

AF – Área foliar por planta ($\text{dm}^2.\text{planta}^{-1}$);

C - comprimento da folha +2 (dm);

L - maior largura da folha +2 (dm);

N - número de folhas abertas com pelo menos 20% de área verde e 0,75 é o fator de correção para área foliar.

Essa equação permitiu calcular a área foliar de cada planta, o que forneceu um valor médio em torno de $100 \text{ dm}^2.\text{planta}^{-1}$. Com base nessa informação e nos dados de medições diárias nos níveis de CO_2 dentro das cubas,

foi possível calcular a taxa média de fixação de CO₂ em função do fotoperíodo (Figura 9).

Figura 9 - Taxa média de fixação de CO₂ por plantas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos, aos 3 meses de idade mantidas a uma concentração atmosférica de CO₂ (350 ppm). A taxa média de fixação do CO₂ foi expressa em função do fotoperíodo com as plantas sendo cultivadas em pleno sol, com a umidade do solo mantida na capacidade de campo (CC)

Esses valores se mostraram próximos dos que foram encontrados no trabalho de Rodrigues e colaboradores (1995), que afirmou que a cana-de-açúcar é considerada altamente eficiente na conversão de energia radiante em energia química, com taxas fotossintéticas calculadas em até 100 mg.dm⁻².h⁻¹ de CO₂ fixado por área foliar por hora, variando de acordo com a intensidade e quantidade de luz, concentrações de CO₂ e velocidade do vento (RODRIGUES, 1995). Entretanto, a grande capacidade da cana-de-açúcar para a produção de matéria orgânica reside na alta taxa de fotossíntese por unidade de superfície de terreno cultivado devido a relação com o aumento da área foliar por unidade de espaço da área coberta (BARROS, 2011).

O metabolismo da cana-de-açúcar é um importante fator a ser considerado durante a avaliação dos efeitos da concentração de CO₂ atmosférico sobre as comunidades microbianas associadas à rizosfera das plantas. Isso se deve, entre outros fatores, a as diferentes respostas que podem ser observadas nesse ambiente devido a alterações nas concentrações de CO₂

(AINSWORTH et al., 2008; ANDERSON et al., 2001; ANDREWA; LORIMER, 1987; GHANNOUM et al., 2000; LEAKEY et al, 2006; POORTER; PÉREZ-SOBA, 2002; SOUZA, 2011; VU. et al., 2006).

Em plantas de metabolismo C3 a saturação de O₂ na atmosfera aumenta a competição de CO₂ pelos sítios ativos da enzima Rubisco diminuindo a fotorrespiração (ANDREWA e LORIMER, 1987). O mesmo não é tão evidente em plantas de metabolismo C4, nas quais a concentração de CO₂ nas células da bainha vascular é cerca de cinco vezes maior do que no ambiente externo o que faria com que as plantas, teoricamente, não respondam tanto aos incrementos de CO₂ (SOUZA, 2011). Com base nessas observações, a análise cromatográfica permitiu observar um gradativo aumento nas concentrações de CO₂ dentro das cubas à medida que a intensidade de radiação solar vai diminuindo no período da tarde (ver Figura 9). Neste caso, o acúmulo de CO₂ dentro das folhas é liberado devido ao princípio de equilíbrio das concentrações gasosas entre os ambientes interno da folha e externo da cuba.

Em outros aspectos, vários trabalhos tem mostrado que existem respostas variadas associadas ao cultivo de plantas C4 em elevadas concentrações de CO₂ explicadas por diversos fatores como, por exemplo: a presença de diferentes tipos de enzimas de decarboxilação, aumento na atividade da enzima Rubisco, aumento da temperatura foliar, redução da condutância estomática e aumento da resposta devido ao estresse hídrico pelo efeito indireto de fechamento estomático (AINSWORTH et al., 2008; ANDERSON et al., 2001; GHANNOUM et al., 2000; VU. et al., 2006). Outros trabalhos realizados com cana-de-açúcar demonstraram que o cultivo dessa cultura sob concentrações de CO₂ elevadas tem ocasionado aumento da taxa fotossintética (POORTER & PÉREZ-SOBA, 2002; LEAKEY et al, 2006; VU et al, 2006), o que seria interessante uma vez que pode intensificar a liberação de compostos diversos no ambiente rizosférico mediante exsudação (MEDEIROS et al., 2006; DRIGO et al., 2010).

2.3.2.2 Rotulagem das plantas com $^{13}\text{CO}_2$

Os resultados das taxas de fixação de CO_2 e da área foliar das plantas cana-de-açúcar, permitiram estipular que após aproximadamente três meses, a partir da emergência das plantas, essas poderiam ser utilizadas para rotulagem com $^{13}\text{CO}_2$, realizando-se a aplicação do gás em duas cubas, cada uma contendo 10 plantas. Deste modo, foi possível fazer a distribuição de aproximadamente 1,0 kg de $^{13}\text{CO}_2$ para as duas cubas (ou 20 plantas), realizando-se as aplicações por volta das 10 horas da manhã, período em que as concentrações de CO_2 natural dentro das caixas é reduzido por volta de 80 ppm, permitindo uma saturação do ambiente interno com $^{13}\text{CO}_2$. Esse procedimento contribui para o aumento das chances de haver um pico máximo de disponibilização de substratos orgânicos, marcados com ^{13}C , na região do sistema radicular, pois se sabe que em atmosfera saturada com CO_2 ocorre um aumento da taxa fotossintética média e, conseqüentemente, da translocação dos metabólitos elaborados até a rizosfera (MEDEIROS et al., 2006; DRIGO et al., 2010). Com base nos resultados obtidos com a metodologia desenvolvida por Drigo e colaboradores (2009), que verificou a marcação de DNA microbiano já após 24 horas, e levando-se em conta a taxa de fixação de CO_2 , que é proporcional a atividade fotossintética (POORTER & PÉREZ-SOBA, 2002; LEAKEY et al, 2006; VU et al, 2006), optou-se em estabelecer um período de incubação total de oito dias realizando-se a retirada de triplicadas ao longo de três amostragens em 2, 4 e 8 dias (Figura 10). Assim, os dias escolhidos para se realizar as amostragens foram determinados de forma a se estabelecer uma progressão geométrica, aumentando a escala do tempo de observação, bem como o período de incubação das plantas na atmosfera concentrada com $^{13}\text{CO}_2$. Isso possibilitou uma maior incorporação de C nas plantas e, posteriormente, uma maior translocação dos compostos orgânicos ricos em ^{13}C para a região rizosférica. Além disso, foi possível um melhor aproveitamento do $^{13}\text{CO}_2$.

Figura 10 - Esquema ilustrativo representando o enriquecimento de ^{13}C nos tecidos vegetais de cana-de-açúcar ao longo dos oito dias de incubação: início da marcação (**0**); dois dias após a marcação (**2s**); quatro dias após a marcação (**4s**); e oito dias após a marcação (**8s**)

2.3.2.3 Resultados da centrifugação e fracionamento das amostras

A densidade da solução de CsTFA/GB, bem como o gradiente e as condições de centrifugação estiveram adequada durante todo o experimento, permitindo verificar a linearidade do gradiente até a vigésima fração, significando que este é o limite máximo do intervalo onde o gradiente da solução de CsTFA/GB mantém-se estável (Figura 11).

Figura 11 - Curva da densidade buotante (DB) das frações obtidas pelos tubos brancos (controle de qualidade). Pode-se observar a permanência do padrão de homogeneidade do gradiente de centrifugação em solução de CsTFA/GB até a vigésima fração

Com base nesses resultados, foi construído o modelo linear do índice de refração em função da densidade buotante da solução de CsTFA/GB, fornecendo um valor de $R^2 = 0,9746$ (Figura 12).

Figura 12 - Curva do índice de refração (IR) em função da densidade buotante média das frações, obtidas dos tubos brancos, evidenciando alta correlação com o modelo linear ($R=97.46\%$)

O resultado da separação do ^{12}C -DNA e do ^{13}C -DNA pela técnica de ultracentrifugação, demonstrou que houve marcação a partir da primeira amostragem (48 horas após o início da marcação), porém, em concentrações muito baixas com a ocorrência em apenas em duas amostras, sendo uma de planta cultivada a 350 ppm e outra de plantas cultivadas a 700 ppm. Isso mostra que as comunidades de micro-organismos associadas à rizosfera de cana-de-açúcar da variedade RB86-7515, aos quatro meses de cultivo com uma atura média aproximada de 1m (a partir do nível do solo), já assimilam os metabólitos exsudados neste ambiente pela planta. Para o segundo período de amostragem (4 dias) também foi observado o mesmo, com duas amostras sendo recuperadas uma para plantas cultivada a 350 ppm e outra de plantas cultivadas a 700 ppm. Todas as amostras correspondentes às plantas amostradas oito dias após a marcação apresentaram ^{13}C -DNA entre as suas frações. Esses resultados evidenciam que, para as condições específicas do experimento, as plantas de

cana-de-açúcar levam entre 2 a 4 dias para começar a disponibilizar os compostos orgânicos na rizosfera em concentrações adequadas para serem recuperadas pela metodologia do SIP empregada neste estudo, alcançando um nível ideal a partir do oitavo dia.

A quantificação do DNA dentre as frações permitiu identificar as frações leve e pesada entre as densidades de $1,50\text{-}1,60\text{ g.mL}^{-1}$ e $1,63\text{-}1,65\text{ g.mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 13).

De forma geral, foram obtidas frações de cerca de $20\mu\text{L}$ a $50\mu\text{L}$ de DNA marcado em solução com uma concentração entre $0,2\text{ ng/mL}$ a $1,0\text{ ng/mL}$, após a purificação e ressuspensão em água, necessitando, portanto, de um procedimento para a ampliação do genoma inteiro (ver na metodologia).

Um ponto importante a ser considerado para a determinação da localização do DNA nas frações é a densidade buotante (DB) dos ácidos nucleicos, tendo em vista que DB pode variar de acordo com conteúdo de GC que, por sua vez, pode variar de acordo com a comunidade microbiana. Um exemplo de grupo de organismos com alto teor de G+C são os da família *Actinomycetales* e gêneros relacionados (STACKEBRANDT et al., 1997), enquanto os representantes do filo Firmicutes são descritos como bactérias gram-positivas com baixo teor de G+C (ATLAS & BARTHA, 1997). O que deve ser considerado na hora de identificar os grupos de micro-organismos marcados com ^{13}C .

Figura 13 - Picogramas das frações de DNA pesado e leve obtidas por ultracentrifugação após a aplicação da técnica de DNA-SIP para marcação do DNA das comunidades microbianas da rizosfera de cana-de-açúcar. **A)** Picograma para o DNA de bactérias associadas às plantas cultivadas em atmosfera de 350 ppm após 8 dias de marcação; **B)** Picograma para o DNA de bactérias associadas às plantas cultivadas em atmosfera de 700 ppm após 8 dias de marcação. As linhas cheias representam as amostras de DNA leve (^{12}C -DNA), e as pontilhadas às amostras de DNA pesado (^{13}C -DNA), detectado nas frações do gradiente com densidade entre 1,63 a 1,66 g.mL^{-1} .

2.3.2.4 Amplificação do DNA total

A metodologia de SIP permitiu a recuperação de um total de 14 amostras do DNA marcado e 18 amostras do DNA não marcado, mais abundante nas frações de centrifugação, totalizando 32 amostras, sendo elas pertencentes a quatro grupos distintos formados ao longo dos três períodos de amostragens (2º, 6º e 8º dia de marcação): **GRUPO M3** –micro-organismos que assimilaram ^{13}C de plantas incubadas a 350 ppm [**M11-3** (2º dia); **M23-3** (4º dia); **M31-3**, **M32-3**, **M33-3**, **M34-3** (8º dia)]; **GRUPO M7** - micro-organismos que assimilaram ^{13}C de plantas incubadas a 700 ppm [**M11-7** (2º dia); **M23-7** (4º dia); **M31-7**, **M32-7**, **M33-7**, **M34-7**, **M35-7**, **M36-7** (8º)]; **GRUPO C3** - micro-organismos que não assimilaram ^{13}C de plantas incubadas a 350 ppm [**C11-3**, **C12-3**, **C13-3** (2º); **C21-3**, **C22-3**, **C23-3** (4º dia); **C31-3**, **C32-3**, **C33-3** (8º)]; **GRUPO C7** - micro-organismos que não assimilaram ^{13}C de plantas incubadas a 7000 ppm [**C11-3**, **C12-3**, **C13-3** (2º); **C21-3**, **C22-3**, **C23-3** (4º dia); **C31-3**, **C32-3**, **C33-3** (8º dia)]. Após a obtenção e purificação do DNA rizosférico obtido pela metodologia de SIP, foi feita a amplificação do genoma inteiro com o *Whole Genome Amplification* – *WGA4 Kit* (Sigma) (Figura 14).

Figura 14 - Amplificação Genoma inteiro das amostras de ^{13}C -DNA, através do kit WGA (Sigma) mostrando alta concentração de DNA entre os fragmentos de 300 a 1000pb. As reações foram corridas em gel de agarose (1%) a 100V por 45 minutos

Deste modo, foi possível se recuperar uma grande quantidade de DNA, com bandas mais concentradas entre 300 a 1000pb, revelando a eficiência da metodologia na amplificação a partir de baixas concentrações de DNA purificado.

2.3.2.5 Avaliação da comunidade de bactérias e fungos por PCR-DGGE

2.3.2.5.1 Estrutura da comunidade de bactérias

A análise de DGGE demonstrou haver uma diferença entre os perfis de bandas correspondentes as comunidades de bactéria marcadas e não marcadas com ^{13}C (Figura 15A). A análise de agrupamentos demonstrou que houve uma grande similaridade entre os grupos bacterianos que não metabolizaram compostos marcados oriundos das plantas, formando um grande *cluster* no centro da árvore de similaridade (Figura 15B). As comunidades marcadas, por sua vez, apresentaram uma maior variação no perfil de bandas, embora tenham também apresentando uma tendência na formação de um *cluster* bem separado das comunidades não assimiladoras de ^{13}C , evidenciando diferenças entre as estruturas das comunidades bacterianas marcadas e não marcadas.

O teste de a ANOSIM permitiu quantificar o distanciamento desses grupos, demonstrando que os grupos de bactérias totais (recuperadas de ambas concentrações) que metabolizaram os compostos marcados com ^{13}C na rizosfera de cana-de-açúcar se distanciaram dos que não apresentaram tal versatilidade, havendo algumas sobreposições entre os grupos ($R_{\text{Bray-Curtys}} = 0,57$; $p \leq 0,01$). O mesmo teste revelou que não houve separação significativa das comunidades de bactérias (marcadas e não marcadas com ^{13}C) para as diferentes concentrações de CO_2 ($R_{\text{Bray-Curtys}} = 0,15$; $p \leq 0,01$).

Figura 15 - Análise da estrutura das comunidades bacterianas da rizosfera de cana-de-açúcar cultivadas em diferentes concentrações de CO_2 (300 e 700 ppm): **A)** Gel de DGGE com o perfil de bandas amplificadas, para o gene 16S rDNA, mostrando diferenças no padrão de bandas dos perfis entre as estruturas das comunidades de bactérias marcadas e não marcadas com ^{13}C ; **B)** Dendrograma de similaridade evidenciando agrupamento entre as amostras comuns. Análises feitas no software PAST 1.90

A análise de coordenadas principais (PCoA) revelou uma clara separação entre os grupos de bactérias marcadas e não marcadas com ^{13}C , principalmente entre as comunidades oriundas de plantas incubadas 700 ppm de CO_2 (Figura 16A), mostrando uma explicação de 37% da variação. Esse resultado pode ser mais claramente representado pelos desvios padrões dos valores médios obtidos pela análise de ANOSIM (figura 16B).

Figura 16 - Agrupamentos das comunidades de bactérias totais da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar: **A)** Análise de coordenadas principais (PCoA) com uma explicação total de 37% da variação; **B)** Box plot da diferença entre as estruturas das comunidades de bactérias, obtido com o teste de ANOSIM aplicando o algoritmo de Bray-Curtis para amostras marcadas (M) e não marcadas (C) em diferentes concentrações (350ppm e 700ppm). Análises feitas no software PAST 1.90

A análise de similaridade de ANOSIM também foi feita pra avaliar as relações entre os quatro grupos distintos (C3, C7, M3 e M7) permitindo diversas comparações. A análise mostrou que a comunidade bacteriana da rizosfera de plantas cultivadas a 700 ppm de CO_2 marcadas com ^{13}C (M7), apresentou maior separação com relação a estrutura das comunidades não marcadas (C3 e C7) ($R_{\text{Bray-Curtis}} = 0,807$; $p \leq 0,01$), enquanto a comunidade marcada desta mesma concentração (M3) apresentou separação com sobreposições com relação as mesmas comunidades (C3 e C7) (Tabela 4). As comunidades marcadas (M3 e

M7) não apresentaram separação quanto ao efeito das concentrações atmosféricas ($R_{\text{Bray-Curtys}} = 0,441$; $p \leq 0,01$). As comunidades bacterianas não marcadas oriundas de plantas tratadas com diferentes concentrações de CO_2 (C3 e C7) se distanciaram entre si quanto a havendo a sobreposição de algumas amostras ($R_{\text{Bray-Curtys}} = 0,698$; $p \leq 0,01$)

Tabela 4 - Valores de R da análise de similaridade de ANOSIM utilizando o algoritmo de *Bray-Curtis* para estudo de distância entre comunidades de bactérias associadas à rizosfera de plantas de cana-de-açúcar: Comunidades marcadas de plantas incubadas a 350 ppm (**M3**); Comunidades marcadas de plantas incubadas a 700 ppm (**M7**); Comunidades não marcadas de plantas incubadas a 350 ppm (**C3**); Comunidades não marcadas de plantas incubadas a 700 ppm (**C7**). **ANOSIM:** **i)** valores: $R > 0,75$ - grupos bem separados; **ii)** valores: $0,5 < R < 0,75$ - grupos separados com sobreposições; **iii)** valores $0,25 < R < 0,5$ - grupos parcialmente separados; **iv)** valores de $R < 0,25$ – ausência de separação entre os grupos, ($p \leq 0,01$)

	M3	M7	C3	C7
M3	0	0.441	0.665	0.663
M7	-	0	0.807	0.784
C3	-	-	0	0.698
C7	-	-	-	0

A análise de ANOSIM também foi realizada com o objetivo de detectar possíveis alterações nas comunidades de bactérias marcadas ao longo dos dias de incubação. Tendo em vista que, para os grupos microbianos marcados com ^{13}C , só foram recuperadas quatro amostras marcadas com períodos de incubação inferiores a seis dias, sendo duas oriundas do tratamento correspondente a atmosfera de 350 ppm (amostras M11-3 e M23-3) e as outras duas oriundas dos tratamento correspondente a atmosfera de 700 ppm (amostras M11-7 e M23-7).

A análise de ANOSIM também revelou plena distinção entre a comunidade de bactérias marcadas até o quarto dia com as marcadas no oitavo dia de incubação, retornando um $R_{\text{Bray-Curtys}} = 1$ ($p \leq 0,01$) para ambos tratamentos (350 e 700 ppm). Isso indica que houve uma transferência do ^{13}C ,

presente nas comunidades de bactérias dominantes, marcadas nos primeiros dias da incubação, para as demais comunidades de bactérias que não conseguem metabolizar os compostos orgânicos fornecidos diretamente pelas raízes (marcadas após o oitavo dia de incubação), mostrando que a técnica de SIP é uma poderosa ferramenta capaz de identificar os principais grupos de micro-organismos ativos, presentes na biomassa microbiana, responsáveis em metabolizar o composto marcado e os seus derivados (BOSCHER; MIDDELBURG, 2002). Essas variações representam um típico processo de transferência do carbono dentro dos diversos subníveis tróficos, o que é fundamental para a manutenção da diversidade microbiana nos solos (XIA JIA, et al., 2011). Os resultados também indicam que a cana-de-açúcar pode apresentar uma íntima relação com grupos específicos de bactérias que são dominantes na região da rizosfera, por causa da especificidade que as plantas têm quanto a síntese de metabólitos disponibilizados na região da rizosfera (BAUDOIN et al., 2003; CARNEY et al., 2007; DRIGO, et al., 2010; XIA JIA, et al., 2011).

As comunidades de bactérias que não metabolizaram compostos marcados das plantas também foram analisadas separadamente para avaliação da influência dos tempos de incubação sobre a estrutura das comunidades bacterianas. A análise de coordenadas principais, realizadas para as comunidades bacterianas não marcadas, demonstrou a existência de nítidos agrupamentos, tanto para as comunidades de rizosfera de cana-de-açúcar cultivada a 350 ppm (Figura 17A) quanto para as cultivadas em atmosfera a 700 ppm (Figura 17B).

Figura 17 - Análise de coordenadas principais (PCoA) para os dados das comunidades de bactérias não marcadas com ^{13}C mostrando a variação da estrutura das comunidades bacterianas em função do período de incubação: **A)** Estrutura das comunidades da rizosfera das plantas incubadas a 350 com explicação de 66,5% da variação; **B)** Estrutura das comunidades da rizosfera de plantas incubadas a 700 ppm com explicação de 71,4% da variação. Análises feitas no software PAST 1.90

A análise de ANOSIM também foi realizada com o objetivo de confirmar a separação entre os grupos formados pela análise de coordenadas principais (PCoA) (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de R da análise de similaridade de ANOSIM utilizando o algoritmo de *Bray-Curtis* para comparação da variação na estrutura das comunidades de bactérias não marcadas com ^{13}C ao longo do período de incubação nas atmosferas de 350 ppm e 700 ppm. **ANOSIM:** i) valores: $R > 0,75$ - grupos bem separados; ii) valores: $0,5 < R < 0,75$ - grupos separados com sobreposições; iii) valores $0,25 < R < 0,5$ - grupos parcialmente separados; iv) valores de $R < 0,25$ - ausência de separação entre os grupos, ($p \leq 0,01$)

Atmosfera a 350 ppm			
	2ºdia	4ºdia	8ºdia
2ºdia	0	<u>0,963</u>	<u>1</u>
4ºdia	-	0	0,333
8ºdia	-	-	0
Atmosfera a 700 ppm			
	2ºdia	4ºdia	8ºdia
2ºdia	0	<u>0.741</u>	<u>1</u>
4ºdia	-	0	<u>0.926</u>
8ºdia	-	-	0

Os resultados revelaram um maior distanciamento entre as comunidades do segundo e do oitavo dia após marcação, tanto para a as concentrações de

350 ppm ($R_{\text{Bray-Curtys}} = 1$; $p \leq 0,01$) quanto para as concentrações a 700 ppm ($R_{\text{Bray-Curtys}} = 1$; $p \leq 0,01$), demonstrando total separação entre essas comunidades.

Esses resultados podem indicar que o processo de incubação e marcação das plantas ao longo do período de oito dias pode ter influenciado, de alguma forma, a estrutura das comunidades bacterianas que não metabolizaram os compostos liberados pelas raízes, necessitando de mais estudos para a confirmação dessa hipótese.

2.3.2.5.1 Estrutura da comunidade de fungos

A análise de DGGE para as comunidades de fungos através da amplificação da região ITS, não demonstrou nítida distinção no padrão de bandas como ocorreu entre as comunidades bacterianas marcadas e não marcadas com ^{13}C (Figura 18A). A análise de agrupamentos também não demonstrou uma aproximação homogeneia entre os grupos comuns, formando *clusters* diversos ao longo do perfil da árvore de similaridade (Figura 18B). Porém, a separação entre comunidades marcadas e não marcadas foi mais nítida na árvore de similaridade.

O teste de ANOSIM também foi aplicado, confirmando que não houve uma nítida separação entre as comunidades de fungos (para ambas concentrações) marcados e não marcados com ^{13}C ($R_{\text{Bray-Curtys}} = 0,26$; $p \leq 0,01$). Também não houve separação significativa entre as comunidades de fungos (marcados e não marcados com ^{13}C) para as diferentes concentrações de CO_2 (350 e 700 ppm) ($R_{\text{Bray-Curtys}} = 0,118$; $p \leq 0,01$). Esses resultados indicam que não ocorreu variação significativa na estrutura das comunidades fúngicas, associadas à rizosfera de cana-de-açúcar, em função da concentração atmosférica e assimilação de compostos orgânicos exsudados pelas raízes.

Apesar desses resultados, o detalhamento de grupos individuais que se destacaram no *cluster* demonstrou que as comunidades de fungos totais que foram recuperadas de amostras marcadas do segundo (M11-3, M11-7) e do quarto dia de incubação (M23-3, M23-7), se distanciaram significativamente das outras amostras, de acordo com o teste de ANOSIM ($R_{\text{Bray-Curtys}} = 1$; $p \leq 0,01$).

Figura 18 - Análise da estrutura das comunidades de fungos da rizosfera de cana-de-açúcar cultivadas em diferentes concentrações de CO_2 (300 e 700 ppm): **A)** Gel de DGGE com o perfil de bandas amplificadas, para a região ITS, mostrando grande número de bandas com diversas intensidades representando as estruturas de comunidades de fungos marcadas e não marcadas com ^{13}C ; **B)** Dendrograma de similaridade

evidenciando agrupamento entre as amostras comuns. Análises feitas no software PAST 1.90

A análise de coordenadas principais (PCoA) evidenciou uma grande dispersão das amostras com uma baixa explicação total da variação observada (25,45%) (Figura 19A), o que significa que a estrutura das comunidades de fungos associadas à rizosfera de cana-de-açúcar não sofre uma grande variação em função das concentrações de CO₂ e assimilação de compostos marcados. O maior afastamento foi o das comunidades marcadas nas incubações a 350 ppm (C3), porém esse grupo apresentou uma grande dispersão (Figura 19A) que fica mais clara de ser observada pelos desvios padrões dos valores médios obtidos pela análise de ANOSIM (Figura 19B).

Figura 19 - Agrupamentos das comunidades de fungos totais da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar: **A)** Análise de coordenadas principais (PCoA) com uma explicação total de 25,45% da variação; **B)** *Box plot* da diferença entre as estruturas das comunidades de fungos, obtido com o teste de ANOSIM aplicando o algoritmo de *Bray-Curtis* para amostras marcadas (M) e não marcadas (C) em diferentes concentrações (350ppm e 700ppm). Análises feitas no software PAST 1.90

A análise de similaridade de ANOSIM também foi feita pra avaliar as relações entre os quatro grupos distintos (C3, C7, M3 e M7). Não foram verificadas separações significativas entre os grupos (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores de R da análise de similaridade de ANOSIM utilizando o algoritmo de *Bray-Curtis* para estudo de distância entre comunidades de fungos associadas à rizosfera de plantas de cana-de-açúcar: Comunidades marcadas de plantas incubadas a 350 ppm (**M3**); Comunidades marcadas de plantas incubadas a 700 ppm (**M7**); Comunidades não marcadas de plantas incubadas a 350 ppm (**C3**); Comunidades não marcadas de plantas incubadas a 700 ppm (**C7**). **ANOSIM:** **i**) valores: $R > 0,75$ - grupos bem separados; **ii**) valores: $0,5 < R < 0,75$ - grupos separados com sobreposições; **iii**) valores $0,25 < R < 0,5$ - grupos parcialmente separados; **iv**) valores de $R < 0,25$ – ausência de separação entre os grupos, ($p \leq 0,01$)

	M3	M7	C3	C7
M3	0	0.3595	0.4561	0.3725
M7	-	0	0.4384	0.4332
C3	-	-	0	0.2812
C7	-	-	-	0

A análise de ANOSIM também foi realizada com o objetivo de detectar possíveis alterações nas comunidades de fungos marcados ao longo dos dias de incubação semelhante ao que foi feito para o grupo das bactérias. A análise de ANOSIM não revelou a distinção da comunidade de fungos marcados até o quarto dia com os marcados no oitavo dia de incubação, retornando um $R_{\text{Bray-Curtys}} = 0,36$ ($p \leq 0,01$) para as plantas incubadas a 350 ppm e um $R_{\text{Bray-Curtys}} = 0,44$ ($p \leq 0,01$) para as plantas incubadas a 700 ppm.

Apesar desse resultado, deve-se atentar para o fato de que tanto a comunidades de fungos quanto a de bactérias apresentaram rápida incorporação do carbono disponibilizado na rizosfera, o que aponta para o papel importante desses organismos nesse ambiente. Ainda é importante considerar que as plantas de cana-de-açúcar utilizadas no experimento tinham 3 meses de idade. Plantas menores provavelmente levariam menos tempo para assimilar o $^{13}\text{CO}_2$ e depois disponibilizá-lo na forma de metabólitos diversos na rizosfera, semelhante ao que foi demonstrado por Drigo et al., (2010) onde, para a espécie de gramínea *Festuca rubracomem*, ocorreu uma forte marcação de ^{13}C no prazo de 24 horas, onde houve forte marcação do DNA de FMAs (fungos micorrízicos arbusculares) e, posteriormente, houve uma diminuição gradual da incorporação

de ^{13}C seguida pelo aumento significativo na incorporação de ^{13}C pela comunidade bacteriana, após 4 a 5 dias da marcação.

As comunidades de fungos que não metabolizaram compostos marcados das plantas também foram analisadas separadamente quanto à influência dos tempos de incubação. As análises de coordenadas principais (PCoA) foram feitas com o objetivo de detectar possíveis alterações das comunidades de fungos ao longo dos dias de incubação. Ao contrário do que foram observados nas análises anteriores, os resultados revelaram que não houve sobreposição entre boa parte dos agrupamentos, havendo distinção entre comunidades (Figura 20).

Figura 20 - Análise de coordenadas principais (PCoA) para os dados das comunidades de bactérias não marcadas com ^{13}C mostrando a variação da estrutura das comunidades bacterianas em função do período de incubação: **A)** Estrutura das comunidades da rizosfera das plantas incubadas a 350 com explicação de 49,52% da variação; **B)** Estrutura das comunidades da rizosfera de plantas incubadas a 700 ppm com explicação de 55,48% da variação. Análises feitas no software PAST 1.90

O teste de ANOSIM também foi aplicado para confirmar a separação desses grupos, revelando que a estrutura das comunidades de fungos que não incorporaram ^{13}C , também sofrem alterações ao longo dos oito dias de incubação, tanto para 350 como para 700 ppm de CO₂ (Tabela 7). Os resultados

demonstraram que a comunidade de fungos sofre maiores variações nas rizosferas de plantas incubadas a 700 ppm. Foi observado que na concentração de CO₂ igual a 360 ppm, a comunidade de fungos apresentou uma separação com sobreposições com relação a comunidade do segundo dia ($R_{\text{Bray-Curtys}} = 0,555$ ($p \leq 0,01$)). Na concentração 700 ppm, a resposta foi mais nítida, sendo que foi observada uma variação crescente da estrutura da comunidade de fungos ao longo do período de incubação, ocorrendo uma distinção da comunidade de fungos do oitavo dia com relação as comunidades dos dias de amostragens anteriores ($R_{\text{Bray-Curtys}} = 0,703$ ($p \leq 0,01$)).

Tabela 7 - Valores de R da análise de similaridade de ANOSIM utilizando o algoritmo de *Bray-Curtis* para comparação da variação na estrutura das comunidades de fungos não marcados com ¹³C ao longo do período de incubação nas atmosferas de 350 ppm e 700 ppm. **ANOSIM:** **i)** valores: $R > 0,75$ - grupos bem separados; **ii)** valores: $0,5 < R < 0,75$ - grupos separados com sobreposições; **iii)** valores $0,25 < R < 0,5$ - grupos parcialmente separados; **iv)** valores de $R < 0,25$ – ausência de separação entre os grupos, ($p \leq 0,01$)

Atmosfera a 350 ppm			
	2ºdia	4ºdia	8ºdia
2ºdia	0	0.555	0.333
4ºdia	-	0	0.037
8ºdia	-	-	0
Atmosfera a 700 ppm			
	2ºdia	4ºdia	8ºdia
2ºdia	0	0.407	0.518
4ºdia	-	0	<u>0.703</u>
8ºdia	-	-	0

Mesmo tratando-se de uma análise feita sobre comunidades de fungos que não incorporaram o ¹³C, esse resultado foi interessante, pois demonstrou uma variação dessas comunidades em função dos dias de incubação, resultado não verificado para as diferenças da estrutura das comunidades totais de fungos em função das concentrações de CO₂ e assimilação de compostos vegetais marcados. Drigo e colaboradores (2010) também estudaram o efeito das concentrações de CO₂ sobre a dominância na assimilação de compostos liberados na rizosfera de grama, por grupos de fungos, mostrando que fungos da

família *Acaulosporaceae* (*A. lacunose-like*) têm dominância na assimilação quando as plantas são cultivadas a 350 ppm enquanto a os da família *Glomeraceae* (*G. claroideum-like*) assume a liderança para uma concentração de 700 ppm. Isso também pode explicar o fato de ocorrer modificações da estrutura das comunidades de fungos em um dado momento, seguindo com o restabelecimento da estrutura inicial por motivos de alterações de tratamentos, como concentrações de CO₂, por exemplo.

Esses resultados indicam que, assim como foi observado para comunidades de bactérias, as alterações nas comunidades de fungos não rotulados com ¹³C varia em função dos períodos de incubação das plantas no CO₂.

De modo geral, os resultados obtidos através da técnica de SIP foram semelhantes aos descritos por Drigo et al., (2010), que demonstrou que a alteração dos níveis de CO₂ na atmosfera de cultivo de gramíneas pode alterar algumas respostas da comunidade microbiana associada a rizosfera, efeito esse observado na rizosfera da variedade RB86-7515 de cana-de-açúcar, com a ressalva de que os mesmos efeitos não foram tão evidentes para a estrutura das comunidades de fungos rizosféricos.

Com relação aos fatores que podem estar correlacionados as alterações nas estruturas microbianas do solo, podem ser citado como um dos principais elementos a diversidade de metabólitos vegetais secundários que passam a ser mais abundantes na rizosfera em decorrência do aumento da fotossíntese (DUMONT et al., 2011). Esses metabólitos podem ser naturalmente disponibilizados às comunidades microbianas da rizosfera, sendo metabolizado apenas por grupos específicos de micro-organismos, sobretudo os que apresentam intima relação com a planta hospedeira (BAUDOIN et al., 2003; CARNEY et al., 2007; DRIGO, et al., 2010; XIA JIA, et al., 2011). Essas modificações nos padrões de exsudação podem provocar variações na estrutura das comunidades microbianas associadas à rizosfera das plantas (DRIGO et al., 2010; XIA JIA, et al., 2011).

Apesar dos recentes progressos sobre o entendimento do fluxo do carbono no solo e sua participação da formação das estruturas de bactérias e fungos rizosféricos, pouco se sabe sobre a função de determinados grupos biológicos do sistema solo-planta (OLSSON; JOHSON, 2005; STRAND et al., 2008). Além disso, o presente trabalho é um dos poucos realizados para o estudo da estrutura das comunidades de micro-organismos associados a rizosfera de gramíneas, sendo atualmente o único que demonstra haver diferenças na organização das comunidades de bactérias e fungos da rizosfera de cana-de-açúcar em função das alterações dos níveis atmosféricos de CO₂ e períodos de incubação. Além disso, este trabalho evidencia as diferenças entre a estrutura das comunidades microbianas que assimilam compostos das plantas das que não possuem semelhante versatilidade.

3 CONCLUSÕES

As comunidades bacterianas da rizosfera e do *bulk soil* de cana-de-açúcar são diferentes, sendo que essas distintas zonas apresentam mais variações sobre as mudanças estruturais das comunidades do que o efeito das variedades.

Os grupos de *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Acidobacteria* são os principais filos associados às plantas de cana-de-açúcar, sendo que mesmo afastados do ambiente rizosférico, apresentam dominância sobre os outros grupos de bactérias que constituíntes da mesma comunidade.

As plantas de cana-de-açúcar da variedade RB86-7515, com idade por volta de 3 meses, têm a capacidade de fixar o CO₂ atmosférico e disponibilizar os compostos orgânicos, sintetizados a partir dessa molécula, para os organismos do solo em até 46 horas. Além disso, as comunidades de bacterianas e de fungos apresentam uma rápida transferência do carbono incorporado dentro dos níveis tróficos da biomassa microbiana, indicando uma grande participação de grupos de estruturas distintas no processo de ciclagem do carbono no solo.

A estrutura e composição das comunidades de bactérias, associadas às raízes de cana-de-açúcar, e que metabolizam os compostos da exsudação dessa cultura são diferentes das comunidades que não apresentam, predominantemente, essa versatilidade. Além disso, a estrutura e a composição dessas comunidades também são alteradas em função da variação das concentrações atmosféricas de CO₂.

Os resultados ainda permitem afirmar que a técnica de SIP é uma poderosa e funcional ferramenta para o estudo da estrutura das comunidades microbianas, podendo também ser empregada para avaliar o papel funcional de grupos específicos de micro-organismos associados a plantas e a processos diversos.

REFERÊNCIAS

- ABBY, S.; DAUBIN, V. Comparative genomics and the evolution of prokaryotes. **Trends in Microbiology**, Amsterdam. v. 3, p. 135-141, 2007.
- AMANN, R.L.; LUDWIG, W. ; SCHELIEFER, K.-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 59, p. 143-169, 1995.
- ANDERSON, I.C.; CAMPBELL, C.D.; PROSSER, J.I. Diversity of fungi in organic soils under a moorland— Scots pine (*Pinus Sylvestris* L.) gradient. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 5, p. 1121–1132, 2003a.
- ANDERSON, I.C.; CAMPBELL, C.D.; PROSSER, J.I. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 5, p. 36–47, 2003a.
- ANDERSON, L.I.; MAHERALI, H.; JOSHON H.B.; POLLEY H.W.; JACKSON, R.B. Gas exchange and photosynthetic acclimation over subambient to elevated CO₂ in a C3-C4 grassland. **Global Change Biology**, Oxford, v. 7, p. 693-707, 2001.
- ANDREWS, J.T.; LORIMER, G.H. Rubisco: structure, mechanisms and prospects improvements. In: HALEH, M.D. & BOARDMAN (Ed.). **Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1987. p.133-207.
- ARAÚJO, E.A.; KER, J.C.; MENDONÇA, E.S.; SILVA, I.R. OLIVEIRA, E.K. Impacto da conversão floresta - pastagem nos estoques e na dinâmica do carbono e substâncias húmicas do solo no bioma Amazônico. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 41, p. 103-114, 2011
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology**; Fundamentals and Applications. 4th ed. Addison-Wesley Pub, 1997. 306p.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, p.549-579, 2005.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.
- BARROS A.C.; COELHO, R.D.; MARIN, F.R.; POLZER, D.L.; AGUIAR-NETTO, A.O. Utilização do sistema CANEGRO para estimativa da produtividade de cana-de-açúcar irrigada em diferentes regiões do Brasil. **Irriga**, Botucatu, v. 17, n. 2, p. 189 - 207, abril - junho, 2012.

BASANTA, M.V.; DOURADO NETO, D.; REICHARDT, K.; BACCHI, O.O.S.; OLIVEIRA, J.C.M.; TRIVELIN, P.C.O.; TIMM, L.C.; TOMINAGA, T.T.; CORRECHEL, V.; CÁSSARO, F.A.M.; PIRES, L.F.; MACEDO, J.R. Management effects on nitrogen recovery in a sugarcane crop grown in Brazil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 116, p. 235-248, 2003.

BOA-SORTE, P.M.F. **Uso da técnica de DGGE para montar o estabelecimento de bactérias diazotróficas Endofíticas inoculadas em duas variedades de cana-de-açúcar**. 2009. 69p. Dissertação (Mestrado na área de Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, London, v. 252, p. 139-149, 2003.

BOSCHER, H.T S.;MIDDELBURG, J.J. Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 1334, p. 1–12, 2002.

BRONICK, C.J.; LAL, R. Soil structure and management: a review. **Geoderma**, Amsterdam, v. 124, p 3-22, 2005.

BUSO, P.H.M. **Estudo do Sistema Radicial de Cana-de-Açúcar no Plantio em Gema e Tolete**. 2006. 88p. Dissertação (Mestrado na area de Produção Vegetal)- Universidade Federal do Paraná, 2006.

CARNEY, K.M.; HUNGATE, B.A.; DRAKE, B.G.; MEGONIGAL, J.P. Altered soil microbial community at elevated CO₂ leads to loss of soil carbon. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, p. 4990–4995, 2007.

CARVALHO, J.L.N.; AVANZI, J.C.; SILVA, M.L.N.; MELLO, C.R. de; CERRI, C.E.P. Potencial de sequestro de carbono em diferentes biomas do Brasil: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.34, p.277-289, 2010.

CERRI, C.C.; BERNOUX, M.; CARVALHO, M.C.S.C. & VOLKOFF, B. **Primeiro inventário brasileiro de emissões antrópicas de gases de efeito estufa: Emissões e remoções de dióxido de carbono pelos solos por mudanças de uso da terra e calagem**. Brasília:Ministério da Ciência e Tecnologia, 2001. 41p.

CERRI, C.C.;CERRI, C.E.P. Agricultura e aquecimento global. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, p. 40–44, 2007.

CERRI, C.C.; CERRI, C.E.P.; DAVIDSON, E.A.; BERNOUX, M.; FELLER, C. A Ciência do solo e o sequestro de carbono. **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo: Boletim Informativo**, Viçosa, v.29, 6p., 2004.

CHAO, A.; BUNGE, J. Estimating the number of species in a stochastic abundance model. **Biometrics**, Malden, v. 58, n. 3, p. 531–539, 2002.

CHEN, Y.; DUMONT, M.G.; NEUFELD, J.D.; BODROSSY, L.; STRALIS-PAVESE, N.; MCNAMARA, N.P.; et al. Revealing the uncultivated majority: combining DNA stable-isotope probing, multiple displacement amplification and metagenomic analyses of uncultivated *Methylocystis* in acidic peatlands. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 10, p. 2609-2622, 2008.

COCKING, E. 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p 169-175, 2003.

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; BANDELA, A.M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing my RDP space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p. 169–172, 2007.

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

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. 2011. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento**.

COSTA, O.V.; CANTARUTTI, R.B.; FONTES, L.E.F.; COSTA, L.M.; NACIFI, P.G.S.; FARIA, J.C. Estoque de carbono do solo sob pastagem em área de tabuleiro costeiro no sul da bahia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 1137-1145, 2009.

CRAMER, W.; BONDEAU, A.; WOODWARD, F.I.; PRENTICE, I.C.; BETTS, R.A.; BROVKIN, V.; COX, P.M.; FISHER, V.; FOLEY, J.A.; FRIEND, A.D. et al. Global response of terrestrial ecosystem structure and function to CO₂ and climate change: results from six dynamic global vegetation models. **Global Change Biology**, Oxford, v. 7, p. 357–373, 2001.

DRIGO, B.; PIJL, A.S.; DUYTS, H.; KIELAK, A.; GAMPER, H.A.; HOUTEKAMER, M.J.; BOSCHER, H.T.S.; BODELIER, P.L.E.; WHITELEY, A.S.; VAN VEEN, J.A.; KOWALCHUK, G.A. Shifting carbon flow from roots into associated microbial communities in response to elevated atmospheric CO₂, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, p. 10938–10942, 2010.

DUMONT, M.G.; POMMERENKE, B.; CASPER, P.; CONRAD, R. DNA-, rRNA- and mRNA-based stable isotope probing of aerobic methanotrophs in lake sediment. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 13, p. 1462-2920, 2011.

DUNBAR, J.; BARNS, S.M.; TICKNOR, L.O.; KUSKE, C.R. Empirical and Theoretical Bacterial Diversity in Four Arizona Soils. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3035-3045, 2002.

EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília, 1999. 412p.

EMBRAPA. **Agroecologia da cana-de-açúcar**. 2012. Disponível em: <<http://www.cana.cnpm.embrapa.br/agroeco.html>>. Acesso em: 12 Nov. 2012.

ESALQ - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 2012. **Fazenda Areão, Descrição**. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/instituicao/>>. Acesso em: 04 Jul. 2012.

FEARNSIDE, P.M.; BARBOSA, R.I. Soil carbon changes from conversion of forest to pasture in Brazilian Amazonia. **Forest Ecology and Management**, Canada, v. 108, p. 147-166, 1998.

FERNANDES, F.A.; CERRI, C.C.; FERNANDES, A.H.B.M. Alterações na matéria orgânica de um Podzol Hidromórfico pelo uso com pastagens cultivadas no Pantanal Mato-Grossense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1943-1951, 1999.

FITZSIMMONS, M.J.; PENNOCK, D.J.; THORPE, J. Effects of deforestation on ecosystem carbon densities in central Saskatchewan. **Canada Forest Ecology and Management**, Canada, v.188, p.349-361, 2003.

FONTAINE, S.; BAROT, S.; BARRÉ, P.; BDIQUI, N.; MARY, B.; CORNELIA, R. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. **Nature**, London, v. 450, p. 277-280, 2007.

FREY-KLETT, P.; GARBAYE, J.; TARKKA, M. The mycorrhiza helper bacteria revisited **New Phytologist**, Oxford, v. 176, p. 22-36, 2007.

GABRIEL, J. Development of soil microbiology methods: from respirometry to molecular approaches. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 37, n. 12, p. 1289-1297, 2010.

GALDOS, M.V.; CERRI, C.C.; CERRI, C.E.P. Soil carbon stocks under burned and unburned sugarcane in Brazil. **Geoderma**, Amsterdam, v. 153, p 347-352, 2009.

GAVA, G.J.C.; TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, M.W. Urea and sugarcane straw nitrogen balance in a soil-sugarcane crop system. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 689-695, 2005.

GOLDEMBERG, J.; NIGRO, F.E.B.; COELHO, S.T. **Bioenergia no estado de São Paulo: situação atual, perspectivas e propostas**. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2008. 152p.

GOMES, N.C.M.; HEUER, H.; SCHÖNFELD, J.; COSTA, R.; MENDONÇA 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**, London, v. 232, p. 167-180, 2001.

GRAY, N.D.; HEAD, I.M. Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 3, p. 481-492, 2001.

GRAYSTON, S.J.; JONES, D.V.D. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with an annual plant: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.5, p.29-56, 1996.

GREENGENES, **16s rRNA gene database and workbench compatible with ARB**. 2012. Disponível em: http://greengenes.lbl.gov/Download/Sequence_Data/Fasta_data_files/. Acesso em: 22 nov. 2012.

GUEDES, M.C.; ANDRADE, C.A.; POGGIANI, F.; MATTIAZZO, M.E. Propriedades químicas do solo e nutrição do eucalipto em função da aplicação de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, p. 267-280, 2006.

HAICHAR, F.Z.; MAROL, C. BERGE1, O. RANGEL-CASTRO, J.I.; PROSSER, J.I.; BALESDENT, J.; HEULIN, T. ACHOUAK, W. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal**, New York v. 2, p. 1221-1230, 2008.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K. todos et al. 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.

HUANG, W.E.; FERGUSON, A.; SINGER, A.C.; LAWSON, K.; THOMPSON, I.P.; KALIN, R.M.; Larkin, M.J.; Bailey, M.J.; and Whiteley, A.S.. Resolving genetic functions within microbial populations: in situ analyses using rRNA and mRNA stable isotope probing coupled with single-cell Raman-fluorescence in situ hybridization. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 75, p. 234-241, 2008.

KALYUZHNYAYA, M.G.; LAPIDUS, A.; IVANOVA, N.; COPELAND, A.C.; MCHARDY, A.C.; SZETO, E.; SALAMOV, A.; GRIGORIEV, I.V.; SUCIU, D.; LEVINE, S.R.; MARKOWITZ, V.M.; RIGOUTSOS, I.; TRINGE, S.G.; BRUCE, D.C. RICHARDSON, P.M.; LIDSTROM, M.E.; CHISTOSERDO, L. High resolution metagenomics targets specific functional types in complex microbial communities **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, p. 1029-1034, 2008.

KANG, S.; MILLS A.L. Soils Bacterial Community structure changes following disturbance of the overlying plant community. **Soil Science**, New Brunswick, v. 169, n.1, p. 55-65, 2004.

KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T; FLÔRES, M.L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p.1459-1465, 2007.

LEAKEY, A.B.D.; URIBELARREA, M.; AINSWORTH, E.A.; NAIDU, S.L.; ROGES, A.; ORT, D.R. ; LONG, S.P. Photosynthesis, productivity and yield of maize are not affected by open-air elevation of CO₂ concentration in the absence of drought. **Plant Physiology**, Illinois, v. 140, p. 779-790, 2006.

LEE, A.; WONG, E. Optimization and the Robustness of BOX A1R PCR for DNA Fingerprinting Using Trout Lake E. coli Isolates. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)**, Vancouver, v. 13, p. 104-11, 2009.

LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F. .; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A.A.C.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, New York, v. 26, p.1829-1836, 2010.

MAKOI, J.; NDAKIDEMI, P. Selected Soil Enzymes: Examples of their potencial roles in the ecosystem. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, p. 181-191, 2008.

MANEFIELD, M.; WHITELEY, A.S.; BAILEY, M.J. What can stable isotope probing do for bioremediation? **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 54, p. 163-166, 2004.

MANEFIELD, M.; WHITELEY, A.S.; GRIFFITHS, R.I.; BAILEY, M.J. RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 5367-5373, 2002.

MARCHIORI, M.; MELO, W.J. Carbono, carbono da biomassa microbiana e atividade enzimática em um solo sob mata natural, pastagem e cultura do algodoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, p. 257-263, 1999.

MARIN, V.A.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; BALDANI, J.I. **Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical** 1999. 32p. (Série Documentos, EMBRAPA Agrobiologia, 91).

MARQUES, A.S.A.; MARCHAISON, A.; GARDAN, L.; SAMSON, R. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 106-115, 2008.

MAULE, R.F.; MAZZA, J.A.; MARTHA, G.B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n. 2, p. 295-301, 2001.

MCCAIG AE, GLOVER LA, PROSSER JI. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimes by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4554-4559, 2001.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAUJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: Genetic and biochemical characterization of Burkholderia cepacia complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 7259-7267, 2007.

MEDEIROS, A.F.A.; POLIDORO, J.C.; REIS, V.M. Nitrogen source effect on Gluconacetobacter diazotrophicus colonization of sugarcane (Saccharum spp.). **Plant and Soil**, London, v. 279, p. 141-152, 2006.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NOBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, Terezina, v.1, n.2, p. 74-99, 2010.

NASCIMENTO, C.B. Isolamento de micrroorganismos endofíticos da rizosfera de cana-de-açúcar (Saccharum officinarum L.) e análise da diversidade genética, antimicrobiana e celulolítica. **Revista de Biologia Neotropical**, Goiânia, v. 3, n.2, p. 187-188, 2006.

NEUFELD, J.D.; VOHRA J.; DUMONT, M.G.; LUEDERS, T.; MANEFIELD, M.; FRIEDRICH, M.W.; MURRELL, J.C. DNA stable-isotope probing. **Nature Protocols**, London, v. 2, p. 860 – 866, 2007.

NISHI, M.H.; JACOVINE, L.A.G.; SILVA, M.L.; VALVERDE, S.R.; NOGUEIRA, H.P.; ALVARENGA, A.P. Influência dos créditos de carbono na viabilidade financeira de três projetos florestais. **Revista Árvore**, Viçosa v.29, n.2, p.263-270, 2005.

NOAA – **National Oceanic and Atmospheric Administration**. 2012. Disponível em: <<http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>>. Acesso em: Jul 2012.

NOLD, S.C.; ZHOU, J.; DEVOL, A.H.; TIEDJE, J.M. Pacific Northwest marinesediments contain ammonia-oxidizing bacteria in the subdivision of the Proteobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4532–4535, 2000.

NÜSSLEIN, K.; TIEDJE, J. M. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 8, p. 3622-3626, 1999.

OLSSON, P.A.; JOHNSON, N.C. Tracking carbon from the atmosphere to the rhizosphere. **Ecology Letters**, Oxford, v. 8, p. 1264-1270, 2005.

PAIVA, A.O.; FARIA, G.E. Estoque de carbono do solo sob cerrado sensu stricto no Distrito Federal, Brasil. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v.1, n.1, p.59, 2007.

PAULA, M.; PEREIRA, F.A.R.; ARIAS, E.R.A.; SCHEEREN, B.R.; SOUZA, C.C.; MATA, D.S. Fixação de carbono e a emissão dos gases de efeito estufa na exploração da cana-de-açúcar. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 34, p. 633-640, 2010.

PENDALL, E.; BRIDGHAM, S.; HANSON, P. J.; HUNGATE, B.; KICKLIGHTER, D. W.; JOHNSON, D. W.; LAW, B. E.; LUO, Y.; MEGONIGAL, J. PATRICK; OLSRUD, M.; RYAN, M. G.; WAN, S. . Below-ground process responses to elevated CO₂ and temperature: A discussion of observations, measurement methods, and models. **New Phytologist**, Oxford, v. 162, p. 311-322, 2004.

PEREIRA, A.L. ;BENEDITO, E. Isótopos estáveis em estudos ecológicos: métodos, aplicações e perspectivas. **Revista Biociências**, Taubaté, v.13, n.1/2, p.16-27, 2007.

PIMM, S.L.; JENKINS, C. Conservação da Biodiversidade. **Scientific American**, Harvard, n.41, p.58-65, 2005.

PURKHOLD, U.; WAGNER, M.; TIMMERMANN, G.; POMMERENING-ROSER, A.; KOOPS, H.P. 16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. **Int. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Great Britain, v. 53, n.5, p. 1485-1494, 2003.

POORTER, H.; PÉREZ-SOBA, M. Plant growth at elevated CO₂. In: **Encyclopedia of global environmental change**, Chichester:John Wiley, 2002. p. 489-496.

RADAJEWSKI, S.; INESON, P.; PAREKH, N.R.; MURRELL, J.C. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. **Letters to Nature**, London, v. 403, p. 646-649, 2000.

RADAJEWSKI, S.; MCDONALD, I.R.; MURRELL, J.C. Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, London v. 14, p. 296-302, 2003.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2010. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

RDP. **Ribosomal Database Project**. 2012. Disponível em: <<http://pyro.cme.msu.edu/>>. Acesso em: 16 nov. 2012.

REIS, V.M.; PAULA, M.A.; BOBEREINER, J. Ocorrência de micorrizas arbusculares e da bactéria diazotrófica acetobacter diazotrophicus em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.10, p.1933-1941, 1999.

ROBLEDO, M.; JIMENEZ-ZURDO, J.I.; VELAZQUEZ, E.; TRUJILLO, M.E.; ZURDOPINEIRO, J.L.; RAMIREZ-BAHENA, M.H.; RAMOS, B.; DIAZ-MINGUEZ, J.M.; DAZZO, F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; MATEOS, P.F. Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 105, p. 7064-7069, 2008.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 17, p. 319-339, 1999.

RODRIGUES, J.D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: UNESP, 1995. 100p.

ROSCOE, R.; MERCANTE, F.M.; SALTON, J.C. (Ed.). **Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas**: modelagem matemática e métodos auxiliares. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. p. 163-198.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant and Microorganisms Interactions**, Saint Paul, v. 8, p. 827-837, 2006.

SAIA, F.T.; LIMA, D.V.; LINHARES, D.C.; NAKAYAMA, C.R.; ARAÚJO, A.C.V.; PELLIZARI, V.H. . 2010. **Desenvolvimento das técnicas de DNA-Stable Isotope Probing (SIP) para identificar dinâmicas e populações microbianas e seus genes funcionais responsáveis pela degradação de compostos orgânicos em amostras ambientais**. São Paulo: Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, 2010. 62p. Disponível em: <http://www.prosabmicrobiologia.org.br/rede/manuais>. Acesso em: 10 Set. 2010.

SALLES, J.F. **Burkholderia community structure in soils under different agricultural management**. 2005. 144p. (Ph.D. thesis) – Leiden University, Institute of Biology Leiden, 2005.

SANDAA, R-A.; TORVISK, V.; ENGER, Ø. Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 287-295, 2001.

SANTOS, T.R. **Reserva nitrogenada no gênero Beijerinckia isolada da rizosfera de cana-de-açúcar**. 2011. 87p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SANTOS, V.R.; FILHO, G.M.; ALBUQUERQUE, A.W.; COSTA, J.P.V; SANTOS, C.G.; SANTOS, A.C.I.; Crescimento e produtividade agrícola de cana-de-açúcar em diferentes fontes de fósforo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.13, n.4, p.389–396, 2009.

SIMÕES-NETO, D.E.; OLIVEIRA, A.C.; FREIRE, F.J.; FREIRE, M.B.G.S.; NASCIMENTO, C.W.A.; ROCHA, A.T. Extração de fósforo em solos cultivados com cana-de-açúcar e suas relações com a capacidade tampão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, p. 840–848, 2009.

SINGLETON, D.R.; POWELL, S.N.; SANGAIAH, R.; GOLD, A.; BALL, L.M.; AITKEN, M.D. Stable-isotope probing of bacteria capable of degrading salicylate, naphthalene, or phenanthrene in a bioreactor treating contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1202-1209, 2005.

SIX, J.; FREY, S.D.; THIES, R.K.; BATTEN, K.M. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. **Soil Science Society of America Journal**, Guilford Roadv, 70, p. 555-569, 2006.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; ELSAS, J.D. van; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.2614-2621, 1999.

SOUZA, A.P. **Mecanismos fotossintéticos e relação fontedreno em cana-de-açúcar cultivada em atmosfera enriquecida em CO₂**. 2011. 208p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Botânica) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2011.

SOUZA, Z.M.; PRADO, R.M.; PAIXÃO, A.C.S.; CESARIN, L.G. Sistemas de colheita e manejo da palhada de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.3, p.271-278, 2005.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F.A.; WARD-RAINEY, N.L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Iowa, v. 47, p. 479-491, 1977.

STADDON, P.L. Mycorrhizal fungi and environmental change: The need for a mycocentric approach. *New Phytologist*, Oxford, v. 167, p. 635-637, 2005.

STRAND, A.E.; PRITCHARD, S.G.; MCCORMACK, M.L.; DAVIS, M.A.; OREN, R. Irreconcilable differences: Fine-root life spans and soil carbon persistence. **Science**, Washington, v. 319, p. 456–458, 2008.

SWIFT, R.S. Sequestration of carbon by soil. **Soil Science**, New Brunswick, v.166, p.858-871, 2001.

THIES, J.E. Soil microbial community analysis using terminal restriction fragmentlength polymorphisms. **Soil Science Society of America Journal**, Guilford Road, v. 71, n. 2, p. 579-591, 2007.

VAL-MORAES, S.P. **Impacto do lodo de esgoto na comunidade bacteriana do solo: avaliação por microarranjo de DNA**. 2008. 171p. Tese (Doutorado na área de Microbiologia Agropecuária) - Universidade de São Paulo, Jaboticabal, 2008.

VAMPS - **Visualization and Analysis of Microbial Population Structures**, 2012. Disponível em: <<http://vamps.mbl.edu/resources/primers.php>>

VASCONCELOS, A.C.M. **Desenvolvimento do sistema radicular da parte aérea de socas de cana-de-açúcar sob dois sistemas de colheita: crua mecanizada e queimada manual**. 2002. 140p. Tese (Doutorado na área de) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2002.

VU, J.C.V.; ALLEN, L.H.; GESCH, R.W. Up-regulation of photosynthesis and sucrose metabolism enzymes in young expanding leaves of sugarcane under elevated growth CO₂. **Plant Science**, Chicago, v. 171, p. 123-131, 2006.

WELLINGTON, E.M.; BERRY, A.; KRSEK, M. Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, p. 295-301, 2003.

WHITBY, C.; BAILEY, M.J.; KILLHAM, K.; MURRELL, J.C.; PROSSER, J.I.; WHITELEY, A.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Stable Isotope Probing Links Taxonomy with Function in Microbial Communities. **News and Views**, Bristol, v. 71, p. 169-173, 2011.

WOOD, MARTIN. **Environmental Soil Biology**. Glasgow. **Blackie Academic & Professi**, London, 1995.150p.

XIA JIA, CHUN-JUAN, Z. Effects of Long-Term Elevated CO₂ on Rhizosphere and *bulk soil* Bacterial Community Structure in *Pinus sylvestris* Seedlings Fields. **Advanced Materials Research**, Providence, v. 351, p. 343-344, 2011.