CAROLINA BERTINI DA SILVA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS PRESENTES
EM UTRÍCULOS DA PLANTA CARNÍVORA *Utricularia*
foliosa (LENTIBULARIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2013

CAROLINA BERTINI DA SILVA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS PRESENTES
EM UTRÍCULOS DA PLANTA CARNÍVORA *Utricularia*
foliosa (LENTIBULARIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo

Versão Corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Silva, Carolina Bertini da.

Diversidade genética de microrganismos presentes em utrículos da planta carnívora *Utricularia foliosa* (Lentibulariaceae) / Carolina Bertini da Silva. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Interação planta-bactéria; genética de microrganismos.

Versão do título para o inglês: Microbial diversity inside the utricles of carnivorous plant *Utricularia foliosa* (Lentibulariaceae).

1. Diversidade bacteriana 2. Associação planta-bactéria 3. *Utricularia*
4. Pirosequenciamento I. Araújo, Prof. Dr. Welington Luiz de II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0128/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Carolina Bertini da Silva.

Título da Diversidade genética de microrganismos presentes em
utrículos da planta carnívora *Utricularia foliosa*
(Lentibulariaceae).

Orientador(a): Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

DEDICO

À Deus, por me guiar e pelas oportunidades à mim concedidas. À minha mãe e irmãs pelo apoio, dedicação e incentivo constante para a minha formação. Ao meu pai, que de onde está continua olhando por mim.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo pela confiança depositada, pela oportunidade dada, pelos ensinamentos e pelo incentivo em todas as horas.

À minha mãe Aderli, pelo apoio total, dedicação, amor, investimento e paciência sempre. Às minhas irmãs Cíntia e Cristiana, pela cumplicidade, companheirismo, amizade, amor e paciência nos momentos de stress.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana: Aline Neves, Emy Mano e Marília Sanchez pela amizade dentro e fora do laboratório e pela paciência em me ajudarem no início da carreira científica. Ao Almir Ferreira, sem o qual esse trabalho não teria acontecido, pela amizade, parceria, companheirismo nos momentos difíceis e ajuda na hora de analisar as sequências. Ao Felipe Lima, Raíssa Mesquita, Priscila Romano, Mabel Ortiz, Jennifer Salguero e todos os outros que estão ou estiveram no laboratório pelo apoio e pelos momentos de descontração.

Ao pessoal do Laboratório Genômica Estrutural por disponibilizar equipamentos necessários para a realização do projeto.

Ao Francisco Dini Andreote pelo auxílio na preparação das amostras para o sequenciamento. Ao Fernando Dini Andreote pelas dicas sobre qual caminho seguir durante as análises.

Ao Prof. Dr. Vitor Miranda pelos artigos disponibilizados e conhecimento passado sobre a planta *Utricularia*.

À Universidade de São Paulo pela oportunidade de mestrado e pelos cursos realizados que muito ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

À Fapesp pelo financiamento do projeto e ao auxílio financeiro do CNPq.

Muito obrigada!

*“Não se pode ensinar alguma coisa a
alguém, pode-se apenas auxiliar a
descobrir por si mesmo”.*

Galileu Galilei

RESUMO

SILVA, C. B. **Diversidade de microrganismos presentes em utrículos da planta carnívora *Utricularia foliosa* (Lentibulariaceae)** 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As plantas carnívoras possuem aproximadamente 600 espécies representantes e dividem-se entre diversos grupos taxonômicos com ampla distribuição. Diferentes padrões morfológicos estão relacionados ao hábito de carnivoria destas plantas. Suas presas são capturadas por armadilhas, as quais em sua maioria são folhas modificadas e adaptadas em ambientes ácidos e pobres em alguns nutrientes. Dentre as plantas carnívoras, o gênero *Utricularia* é o que apresenta a maior riqueza quando comparado aos demais táxons com o mesmo hábito. O conhecimento da associação entre plantas carnívoras e a comunidade bacteriana pode mostrar uma diversidade ainda não conhecida, além de proporcionar um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na interação de ambas. Dessa forma, a utilização de ferramentas mais atuais, como a análise de bibliotecas do gene 16S rRNA, podem auxiliar na caracterização dessa diversidade. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade microbiana presente em utrículos de *Utricularia foliosa* provenientes de dois locais através da análise de bibliotecas do gene 16S rRNA obtida por pirosequenciamento. Os resultados indicam que existe diferença significativa na riqueza e diversidade microbiana das plantas de pontos diferentes. No ponto 1, Proteobacteria (58%), Firmicutes (11%), Cyanobacteria (11%), Acidobacteria (7%), Verrucomicrobia (5%), Actinobacteria (3%) Chlamidia (2%) e Bacteroidetes (1%) foram os grupos dominantes. Já no ponto 2 houve uma maior presença de Eukaryota (51%), sendo que os grupos mais presentes foram Streptophyta (88%), Bacillariophyta (7%) e Chlorophyta (2%). Entretanto, foi observado, que de forma geral os grupos predominantes em ambas as amostras são semelhantes, diferindo apenas em relação a sua densidade, sugerindo que pode ocorrer uma seleção da planta para certas comunidades. Além disso, a grande presença de algas encontradas pode estar relacionada à disponibilidade de nutrientes nos utrículos e gerar um acréscimo de carbono e nitrogênio à cadeia alimentar no interior da armadilha.

Palavras-chave: Diversidade bacteriana. Associação planta-bactéria. *Utricularia*. Pirosequenciamento.

ABSTRACT

SILVA, C. B. **Microbial diversity inside the utricles of carnivorous plant *Utricularia foliosa* (Lentibulariaceae)**, 2013. 64 p. Master Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The carnivorous plants have approximately 600 species clustered in different taxonomic groups worldwide. Different morphological patterns are related to the carnivorous habit of these plants. Normally, the prey is captured by traps, which are leaves adapted and modified in acidic and nutritionally poor environments. Among carnivorous groups, the genus *Utricularia* present the highest richness when compared to the other groups with the same ability. Therefore, knowing the microbial community inside these plants we may be able to understand the role these microorganisms take place in the establishment of the host plant in different sites. In this way, the aim of this study was to evaluate the microbial diversity present in utricles of *Utricularia foliosa* and evaluate the effect of plant growth site in this diversity. For this the 16S rRNA gene library was sequenced by pyrosequencing (454-Roche). The results indicate that there is significantly difference between the microbial diversity and richness of utricles from the two different sites. In point 1, the dominants groups were composed by Proteobacteria (58%), Firmicutes (11%), Cyanobacteria (11%), Acidobacteria (7%), Verrucomicrobia (5%) Actinobacteria (3%) Chlamidia (2%) and Bacteroidetes (1%), while in the point 2, Eukaryota (51%), such as Streptophyta (88%), Bacillariophyta (7%) and Chlorophyta (2%) were dominant. However, it was observed that the most common groups in both samples are similar, which differed only in the cell density, leading to believe that probably there is a selection of the plant for certain microbial groups. Furthermore, the large presence of algae inside the utricles may be related to the availability of nutrients and increase the Carbon and nitrogen level inside the traps, allowing the growth of the plant and also the microbial community in this structures.

Keywords: Bacterial diversity. Plant-bacteria association. *Utricularia*. Pyrosequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Locais de coleta.....	27
Figura 2 - Utrículo de <i>U. foliosa</i>	28
Figura 3 - Gel de eletroforese	28
Figura 4 - Histograma gerado pelo RDP	29
Figura 5 - Histograma de tamanho de fragmentos	30
Figura 6 - <i>Cluster</i>	31
Figura 7 - Curvas de rarefação.....	32
Figura 8 - Curvas de rarefação.....	33
Figura 9 - Diagramas de Venn.....	35
Figura 10 - <i>Heatmap</i>	36
Figura 11 - Distribuição das sequências das bibliotecas de <i>U. foliosa</i> dos pontos 1 e 2 nos diferentes Domínios	39
Figura 12 - Árvore filogenética indicando os filos e suas classes encontradas na biblioteca do ponto 1.....	40
Figura 13 - Árvore filogenética indicando os filos e suas classes encontradas na biblioteca do ponto 2.....	41
Figura 14 - Porcentagem dos diferentes filos presentes nas bibliotecas de <i>U. foliosa</i>	42
Figura 15 - Divisão de classes dentro do Filo Proteobacteria das bibliotecas de <i>U. foliosa</i> do ponto 1 e do ponto 2.....	43
Figura 16 - Árvore filogenética indicando as espécies de Alphaproteobacteria encontradas na biblioteca do ponto 1.....	44
Figura 17 - Árvore filogenética indicando as espécies de Betaproteobacteria encontradas na biblioteca do ponto 1.....	45
Figura 18 - Árvore filogenética indicando as espécies de Alphaproteobacteria encontradas na biblioteca do ponto 2.....	46
Figura 19 - Árvore filogenética indicando as espécies de Betaproteobacteria encontradas na biblioteca do ponto 2.....	47
Figura 20 - Divisão de classes dentro do Filo Firmicutes das bibliotecas de <i>U. foliosa</i> do ponto 1 e do ponto 2.....	48

Figura 21 - Divisão de classes dentro do Filo Acidobacteria das bibliotecas de <i>U. foliosa</i> do ponto 1 e do ponto 2.....	48
Figura 22 - Divisão de classes dentro do Filo Verrucomicrobia das bibliotecas de <i>U. foliosa</i> do ponto 1 e do ponto 2.....	49
Figura 23 - Divisão de filos dentro do Domínio Eukaryota das bibliotecas de <i>U. foliosa</i> do ponto 1 e do ponto 2.....	50
Figura 24 - Divisão de classes dentro do Filo Streptophyta das bibliotecas de <i>U. foliosa</i> do ponto 1 e do ponto 2.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de OTUs de acordo com Nível Taxonômico e Biblioteca. Biblioteca do Ponto 1 apresentou um total de 13.251 sequências, enquanto a biblioteca do Ponto 2 apresentou um total de 10.926 sequências	34
Tabela 2 - Valor estimado de riqueza calculado pelos índices de Ace e Chao-1, calculados pelo programa MOTHUR.	37
Tabela 3 - Valor estimado de diversidade calculado pelos índices de Shannon-Winner e Simpson calculados pelo programa MOTHUR.	38
Tabela 4 - Percentual dos principais grupos encontrados no interior de <i>U. Foliosa</i> do ponto 1 e 2, mostrando a diferença entre estudos realizados com plantas carnívoras terrestres e estudo realizado com <i>U. Gibba</i> e a água dos locais de coleta das plantas.	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APG	Angiosperm Phylogeny Group
PCR	Polymerase Chain Reaction
RDP	Ribosomal Database Project
OTU	Unidade Taxonômica Operacional
MG-RAST	Metagenomics RAST

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	AS PLANTAS CARNÍVORAS E ENZIMOLOGIA.....	15
2.2	DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE UTRICULARIA (LENTIBULARIACEAE).....	16
2.3	DIVERSIDADE MICROBIANA.....	17
2.4	ANÁLISE DE BIBLIOTECA DE CLONES	19
2.5	ANÁLISE DE DADOS	21
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1	ÁREAS DE COLETA DO MATERIAL DE VEGETAL	24
4.2	EXTRAÇÃO DE DNA DO HOSPEDEIRO E MICROBIOTA	24
4.3	AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rRNA (rDNA) DAS BACTÉRIAS.....	24
4.4	PURIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E PIROSEQUENCIAMENTO DO 16S rRNA	25
4.5	ANÁLISE E PROCESSAMENTO DE DADOS	25
5	RESULTADOS.....	27
5.1	ÁREAS DE COLETA DO MATERIAL VEGETAL	27
5.2	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO.....	28
5.3	ANÁLISE E PROCESSAMENTO DOS DADOS.....	29
6	DISCUSSÃO.....	52
7	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS*	60

1 INTRODUÇÃO

A descoberta da dimensão da diversidade bacteriana em ambientes complexos como o solo, água, rizosfera, interior (endófitos) e superfícies (epífitas) de plantas, junto com as técnicas que utilizam a recuperação de DNA e RNA bacterianos diretamente do ambiente tem aumentado o interesse no estudo de comunidades microbianas de ambientes pouco avaliados. Essas técnicas podem ter várias aplicações, entre elas a identificação de novas espécies bacterianas, descoberta de agentes para biorremediação, determinação da qualidade do solo por meio de populações indicadoras e o estudo de impactos sobre comunidades bacterianas, como por exemplo, os diferentes tipos de manejo, a presença de poluentes e o cultivo de diferentes genótipos de plantas. Além disso, durante a interação com a planta, algumas espécies bacterianas podem produzir compostos com grande potencial biotecnológico, como fármacos e enzimas.

As plantas carnívoras apresentam relação ainda pouco conhecida com microrganismos como algas, fungos, protozoários e bactérias. Para alguns grupos taxonômicos, sabe-se que a presença de bactérias é de fundamental importância para as atividades de digestão das presas capturadas. A família Lentibulariaceae, composta por espécies de plantas carnívoras, é formada pelos gêneros *Utricularia*, *Genlisea* e *Pinguicula*. As espécies de *Utricularia* apresentam uma intrigante modificação em sua porção vegetativa, resultando em uma das mais complexas estruturas foliares existentes no Reino Plantae, conhecida como utrículo. Essa armadilha possui forma ovalada, diferentes tipos de tricomas (tectores e glandulares) além da presença de apêndices próximos à entrada do utrículo. Adaptados para a absorção de nutrientes, os utrículos se apresentam como órgãos de sucção, absorvendo pequenos organismos e os digerindo tanto com suas próprias enzimas como também por comunidades de microrganismos viventes em seu interior. Dessa forma, é de grande interesse avaliar a diversidade da comunidade bacteriana associada a essas plantas e o entendimento do papel destas bactérias para o desenvolvimento da planta hospedeira. Entretanto, para isso se faz necessário o conhecimento da diversidade bacteriana do ambiente onde estas plantas se desenvolvem, permitindo assim estudar de que forma estas plantas selecionam a comunidade bacteriana no interior dos utrículos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AS PLANTAS CARNÍVORAS E ENZIMOLOGIA

De um total estimado de 300 mil espécies de angiospermas, as plantas carnívoras são representadas por aproximadamente 600 espécies, segregadas em diversos grupos taxonômicos, muitos com distribuição ampla. As plantas carnívoras apresentam a capacidade de capturar, digerir e absorver os produtos resultantes de suas presas (JUNIPER et al., 1989). Diversos e intrincados padrões morfológicos estão relacionados ao hábito carnívoro (revistos por JUNIPER et al., 1989 e LLOYD, 1942). As armadilhas que capturam as presas são normalmente folhas modificadas, adaptadas provavelmente selecionadas em ambientes ácidos e pobres em determinados nutrientes (ADAMEC, 1997; JUNIPER et al., 1989). As presas podem ser uma fonte suplementar importante de N, P, S, K e Mg, em alguns casos representando entre 50% e 80% do total de nitrogênio da massa da planta (ADAMEC, 1997; ELLISON; GOTELLI, 2001).

As enzimas associadas às atividades metabólicas de digestão das presas capturadas pelas plantas carnívoras são de origem ainda incerta. Por muitos anos foi discutido se a origem das enzimas seria intrínseca ou extrínseca (LLOYD, 1942; ROBINS; JUNIPER, 1980). Porém, apesar dos estudos recentes, muitos aspectos relacionados ao tema são controvertidos. Após o sistema digestivo ter sido iniciado, para diversas plantas como *Nepenthes* (Nepenthaceae), *Sarracenia* e *Heliamphora* (Sarraceniaceae) e *Cephalotus* (Cephalotaceae), a presença de uma comunidade bacteriana pode contribuir substancialmente para a otimização do processo de degradação (JUNIPER et al., 1989). Para *Byblis* (Byblidaceae), *Heliamphora* e determinadas espécies de *Sarracenia* (Sarraceniaceae), a atuação bacteriana é essencial dada à ausência de secreção de enzimas pela planta. Porém, para os demais grupos de plantas carnívoras, a atividade microbiana parece ter importância menor (JUNIPER et al., 1989).

Nos últimos anos, estudos relacionados às plantas do gênero *Utricularia* foram realizados apresentando diferentes objetivos, como por exemplo determinar se as presas capturadas e a abundância das mesmas em *Utricularia foliosa* da Amazônia colombiana relacionam-se com a abundância e composição de comunidades perifíticas associadas aos utrículos (DÍAZ-OLARTE et al., 2007); esclarecer a estrutura e a função da comunidade microbiana presente em armadilhas de *Utricularia* de diferentes espécies e

idades (SIROVÁ et al., 2009) e; determinar o conteúdo das presas presentes em utrículos de *Utricularia inflata* e *Utricularia gibba* e caracterizar o ambiente físico em que essas plantas crescem (GORDON; PACHECO, 2007).

2.2 DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE UTRICULARIA (LENTIBULARIACEAE)

O gênero *Utricularia* possui a maior riqueza de espécies carnívoras quando comparado aos demais táxons que apresentam o mesmo hábito. É representado por aproximadamente 150 espécies, das quais em torno de 60 ocorrem no Brasil. O gênero representa a maior parte de espécies existentes na família Lentibulariaceae L.C. Richard (Lamiales, Euasterídeas) (APG II, 2003) na qual se encontram também os gêneros *Pinguicula* e *Genlisea*, todos com distribuição cosmopolita, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo ausentes apenas em regiões áridas e algumas ilhas oceânicas (JUDD et al., 1999; TAYLOR, 1989).

As espécies apresentam hábitos diversos, ocupando ambientes aquáticos ou terrestres, adaptadas nas formas rupícolas, reofíticas ou mesmo epífitas (TAYLOR, 1989). *Utricularia reniformis* A. St.-Hil. e *Utricularia subulata* L. são espécies tipicamente terrestres, encontradas principalmente em ambientes úmidos e turfosos. *Utricularia gibba* L. e *Utricularia neottioides* A. St.-Hil. & Girard são espécies aquáticas, ambas encontradas em corpos d'água (riachos e lagos) na forma submersa, porém a primeira sendo livre-flutuante enquanto que a segunda ocorre adpressa às rochas (hábito reofítico). *Utricularia gibba* e *U. subulata* apresentam distribuição pantropical e ampla no Brasil, enquanto que *U. neottioides* ocorre do norte à região sudeste brasileira e *U. reniformes* apresenta distribuição restrita ao sul e sudeste (CORRÊA ; MAMEDE, 2002; TAYLOR, 1989).

De acordo com Sirová et al. (2009), a análise do conteúdo presente em armadilhas de *Utricularia* é de difícil análise quando comparado com outro gênero, como *Sarracenia*. A dificuldade ocorre pelo fato de a armadilha ser um utrículo oco, geralmente apresentando 1-4 mm de comprimento, tendo em sua maior parte duas células de espessura e ser cheio de água. O utrículo é uma das estruturas mais complexas no Reino Plantae.

2.3 DIVERSIDADE MICROBIANA

Os organismos procariotos (bactérias e arqueias) são os maiores constituintes da biota terrestre e ainda os menos conhecidos, portanto, necessitando de muitos estudos. Estima-se que possam apresentar milhões de espécies, visto que a sua diversidade é produto de mais de 3,8 bilhões de anos de evolução e provavelmente, seja esta a razão de sua grande adaptação e distribuição em uma grande variedade de ambientes. Possuem papel crucial para a biosfera porque catalisam todos os processos biogeoquímicos responsáveis pela manutenção da vida na terra (TORSVIK et al., 2002).

Estudos recentes, baseados na utilização de técnicas de biologia molecular, têm revelado a grande diversidade microbiana em muitos ecossistemas. Segundo Torsvik et al. (1990), em um grama de solo é possível encontrar até 10^{10} células, representando em torno de 4000-7000 genomas ou populações diferentes, podendo formar comunidades que ocupam diferentes micro ou macro habitats. Curtis e colaboradores estimaram que toda a diversidade bacteriana do mar não ultrapassa 2×10^6 espécies.

Além disso, estes microrganismos podem também viver em associação com plantas, colonizando a superfície (epifíticos) e/ou o interior da planta (endofíticos) ou, dependendo das condições ambientais um microrganismo classificado como endófito pode comportar-se como um epifítico ou um patógeno latente (ANDREWS; HARRIS, 2000; AZEVEDO, 1998). Misaghi & Donndelinger (1990) relatam que bactérias endofíticas, possivelmente, influenciam na fisiologia da planta hospedeira por processos ainda não esclarecidos. Esta influência deve-se a íntima relação, entre os diferentes organismos, desenvolvida durante a co-evolução das espécies. Nesta interação, bactérias desempenham, no interior de seus hospedeiros, diversas propriedades de interesse, protegendo-os do ataque de insetos, patógenos, herbívoros; produção de compostos de crescimento vegetal, maior disponibilização de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio (AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO et al., 2003; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Segundo Sturz & Nowak (2000), microrganismos endofíticos são mais estáveis por não estarem expostos às condições ambientais externas aos órgãos vegetais, havendo pouca ou nenhuma competição microbiana.

A distribuição dos microrganismos no ambiente tem sido estudada por métodos dependentes e independentes de cultivo. Os resultados, principalmente pelas técnicas baseadas na recuperação do DNA e RNA de bactérias do ambiente, sem necessidade de

cultivo indicam que algumas divisões de bactérias apresentam-se como cosmopolitas, sendo encontradas em vários ambientes enquanto que outras parecem ser restritas a uma determinada condição e ambiente (HUGENHOLTZ et al., 1998). Estudos das seqüências do gene 16S rRNA, têm sido conduzidos para esclarecer as afinidades taxonômicas entre uma grande variedade de espécies e utilizados como uma poderosa ferramenta para acessar a diversidade genética de amostras ambientais, principalmente de microrganismos que ainda não são cultiváveis. Estas ferramentas têm também contribuído para o entendimento das estruturas das comunidades, principalmente para ambientes, os quais a reprodução em laboratório é difícil (BAKER et al., 2003).

Dessa forma, existe um número cada vez maior de seqüências de rRNA 16S depositadas em bancos de dados disponíveis. O “Ribosomal Database Project (RDP)” contém hoje mais de 226 mil seqüências de rRNA 16S bacterianas anotadas e alinhadas. Esse número crescente de informação é importante, pois permite comparar seqüências encontradas no mundo todo, facilitando assim o entendimento da relação estrutura/função das interações microrganismo e ambiente (DAHLLOF, 2002).

O uso recente destas técnicas para o estudo da diversidade microbiana tem levado a uma série de aplicações na microbiologia ambiental, tais como: i) identificação de novas espécies bacterianas em diversos ambientes, ii) acesso a possíveis agentes para biorremediação, iii) avaliação da qualidade do solo por meio da descoberta de populações ou comunidades indicadoras (SANGUIN et al., 2006) e iv) efeito de poluentes e plantas transgênicas sobre as comunidades microbianas.

A diversidade microbiana em dois solos oligotróficos foi avaliada por meio do seqüenciamento da subunidade 16S rRNA (SSU rDNA). Utilizando o seqüenciamento de um grande número de clones, maior do que o convencionalmente utilizado, foi observada grande diversidade presente, e foi estabelecida uma relação entre alguns grupos de microrganismos e determinadas funções nesses solos além da descoberta de uma grande quantidade de possíveis novos gêneros, famílias e espécies bacterianas. Alguns representantes, inclusive, não mostraram associações específicas a nenhuma das divisões até então descritas por Hugenholtz et al. (1998), propondo-se a criação de 3 possíveis novas divisões.

Analisando a relação da diversidade microbiana com o estado nutricional do solo, Smit et al. (2001) verificaram que em solos com grande disponibilidade de nutrientes houve a seleção de α - e γ -*Proteobacteria*. Em solos com poucos nutrientes e alta

concentração de compostos recalcitrantes, há um aumento na proporção de *Acidobacterium*. Deste modo, a razão entre a proporção destes grupos poderia servir como um indicador do estado trófico do solo ou ambiente.

Em trabalho recente, Lambais et al. (2006) analisaram a comunidade bacteriana de três espécies arbóreas da Mata Atlântica, e mostraram que 97% dos isolados bacterianos amostrado foi composto por espécies ainda não descritas e que somente 5% das espécies foi compartilhada pela três plantas hospedeiras, mostrando que pode ocorrer especificidade ao nicho ocupado e ao genótipo da planta hospedeira. Este trabalho mostra que a diversidade bacteriana pode ser muito maior que aquela já estudada visto que pequenas variações no genoma e no local amostrado levam a uma mudança na composição da comunidade associada.

A habilidade de digerir insetos, das plantas carnívoras, é facilitada por associações microbianas. Porém, a interação entre plantas carnívoras e comunidades bacterianas é pouco conhecida em função da limitação na capacidade de caracterizar a diversidade bacteriana nesse sistema (KOOPMAN et al., 2010). Além disso, a associação entre plantas e bactérias tem efeitos importantes sobre a ecologia, evolução e adequação de ambas, visto que os microrganismos interferem na quantidade, qualidade e acessibilidade dos nutrientes para as plantas (KOOPMAN et al., 2010). Dessa forma, o conhecimento da diversidade bacteriana associada às plantas carnívoras pode mostrar uma diversidade bacteriana ainda não descrita, bem como um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na interação entre plantas e bactérias.

2.4 ANÁLISE DE BIBLIOTECA DE CLONES

Análise de biblioteca de clones é o nome dado à análise de organismos independentes de cultivo que permitem a análise funcional ou de diversidade a partir de DNA extraído diretamente da amostra ambiental (SILVA-MACENA et al., 2007). Estima-se que o número total de células de procariotos na Terra seja em torno de $4-6 \times 10^{30}$ (WHITMAN., 1998), sendo que em um grama de solo, encontram-se 10 bilhões de espécies de procariotos (AMANN et al., 1995; ROSSELÓ-MORA; AMANN, 2001). Durante as últimas décadas estudos mostraram mudanças em relação à diversidade microbiana existente no ambiente. Segundo Carl Woese (1987), o domínio Bacteria continha 11 filos compostos por indivíduos cultivados e caracterizados. Segundo Oliveira et al. (2006),

apenas uma parcela dos microrganismos (<10% em solos e 1% em ambientes aquáticos) é recuperada em estudos baseados em isolamento e cultivo. Sendo assim, aumentou-se para 53 o número de divisões dentro do Domínio Bacteria, onde aproximadamente 50% das espécies não possuem representantes cultivados (RAPPE; GIOVANNONI, 2003). Dessa forma, a construção de bibliotecas de clones pode auxiliar a exploração desta diversidade microbiana do solo, visto que fornece acesso a informações de microrganismos ainda não cultivados. Essas bibliotecas permitem a exploração biotecnológica dessas microbiotas e podem servir como base para estudos de filogenia dos ambientes (RONDON et al., 1999). A análise de seqüências obtidas de amostras ambientais pode levar à identificação dos principais organismos na amostra, porém não é possível fazer uma ligação entre filogenia e função dos microrganismos no ambiente analisado (BORNEMAN, 1999). Por meio de análises genômicas comparativas e tecnologias de microarranjos pode-se determinar padrões de expressão gênica e se detectar novas vias metabólicas (TORSVIK et al., 2002). Outro modo de se associar um microrganismo à sua função é a comparação com espécies filogeneticamente associadas e já estudadas (PACE, 1997).

A metagenômica vem sendo aplicada em diversos trabalhos, como por exemplo para caracterizar geneticamente comunidades microbianas presentes nas superfícies das estruturas de pedras (BERDOULAY; SALVADO, 2009), na diversidade funcional de comunidades microbianas em lagos mesotróficos (DEBROAS et al., 2005), na análise da diversidade bacteriana de solos do cerrado (TAGLIAFERRO, 2005) e solo da Floresta Atlântica Paraense (IORIS, 2008). Os genomas de organismos ainda não cultiváveis podem ser acessados por meio da clonagem em vetores de expressão, utilizando a digestão e clonagem do DNA em um plasmídeo de expressão multi-cópias (RONDON et al., 1999). As seqüências obtidas são comparadas às seqüências já depositadas em banco de dados ou através de análise por identificação dos clones que expressam uma função procurada (SCHLOSS et al., 2003).

Novas tecnologias de seqüenciamento vêm surgindo, como por exemplo o pirosequenciamento (MARGULIES et al., 2005), o qual está apto para substituir o método de Sanger, o qual era o mais utilizado para análises metagenômicas (KUNIN et al., 2008). A redução do custo do seqüenciamento por base permitiu que as tecnologias de seqüenciamento em larga escala sejam utilizadas nestas análises.

2.5 ANÁLISE DE DADOS

O processamento dos dados de seqüências genômicas e seqüências metagenômicas possuem muitos traços em comum. O pré-processamento compreende a base do mapa que sai dos seqüenciadores, “peneiramento” do vetor para remover a seqüência do vetor de clonagem, qualidade do desempenho para remover bases de baixa qualidade e peneiramento de contaminantes para remover seqüências contaminantes verificáveis. Erros em cada um desses passos podem gerar maiores conseqüências em metagenomas do que em genomas (KUNIN et al., 2008).

Com o surgimento das novas tecnologias de seqüenciamento, as quais geram uma grande quantidade de dados, novas ferramentas surgiram para facilitar a análise dos dados obtidos. Dentre as ferramentas mais utilizadas para essas análises encontra-se o *Pyrosequencing Pipeline* (<http://pyro.cme.msu.edu>), o qual faz parte do *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu>). Essa ferramenta visa simplificar o processamento de grandes bibliotecas de seqüências 16S rRNA obtidas através de pirosequenciamento (COLE et al., 2008).

O seqüenciamento de genes rRNA obtidos através de amostras ambientais é um método padrão para determinar a composição da comunidade bacteriana. O *Pyrosequencing Pipeline* contém uma coleção de ferramentas que automatizam o processamento dos dados, simplificando a análise de grandes bibliotecas de seqüenciamento (COLE et al., 2008).

O processo inicial desse *Pipeline* conta com 4 filtros de qualidade: a edição máxima da distância permitida para o *primer forward*; a edição máxima da distância permitida para o *primer reverse*; o número de ambigüidade de códons e o comprimento mínimo da seqüência após a remoção dos *primers*. Sendo assim, as seqüências que obtiverem uma qualidade inferior são descartadas (COLE et al., 2008). Após esse processo inicial, as seqüências são submetidas ao alinhamento, cluster, análises de riqueza e diversidade, curvas de rarefação e classificação taxonômica.

Outra ferramenta que vem sendo utilizada é o *Metagenomics RAST*. O *MG-RAST* é um *pipeline* de alto rendimento e foi construído para fornecer computação de alto desempenho aos pesquisadores interessados em utilizar metagênômica. O *pipeline* compara as seqüências fornecidas a bancos de dados de nucleotídeos e proteínas. São gerados resumos filogenéticos e funcionais dos metagenomas, e ferramentas para

comparações metagenômicas são incorporadas às visões padrão (MEYER et al., 2008). O programa pode ser utilizado para construção de árvores filogenéticas, tabelas, *heatmap* e curvas de rarefação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista que esta dissertação está vinculada ao projeto “Diversidade genética de microrganismos associados às plantas carnívoras terrestres e aquáticas do gênero *Utricularia* (Lentibulariaceae)” (processo FAPESP 07/58277-7), o objetivo geral foi avaliar diversidade bacteriana presente em utrículos de *Utricularia foliosa* de duas áreas da região de Mogi das Cruzes, SP.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para se alcançar os objetivos gerais, o projeto apresentou objetivos específicos e interdependentes:

- i. Isolar o DNA total bacteriano de espécimes de *Utricularia foliosa* provenientes de 2 áreas no município de Mogi das Cruzes;
- ii. Identificar a comunidade bacteriana presente em utrículos de *U. foliosa* por meio de pirosequenciamento do gene 16S rRNA;
- iii. Avaliar o efeito das várzeas amostradas sobre a diversidade bacteriana presente nos utrículos de *U. foliosa*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREAS DE COLETA DO MATERIAL DE VEGETAL

Foram utilizados utrículos de plantas de *Utricularia foliosa* (Lentibulariaceae) provenientes de duas áreas diferentes em Mogi das Cruzes, Estado de São Paulo. Os pontos de coleta dos espécimes de *U. foliosa* foram os trechos Mogi-Salesópolis SP (23°33'28.85"S, 46° 8'12.65"O) e APA da várzea do Alto Tietê localizada no bairro de César de Souza, Mogi das Cruzes, SP (23°32'4.97"S, 46° 8'42.47"O).

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA DO HOSPEDEIRO E MICROBIOTA

Para extração do DNA total de utrículo foram utilizados alíquotas de 0,5 g de tecido vegetal previamente homogeneizados, utilizando o kit "*UltraClean Soil DNA Isolation Kit*" (MoBio Labs, Inc.Solana Beach, USA) seguindo as recomendações do fabricante.

4.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rRNA (rDNA) DAS BACTÉRIAS

Para verificação da qualidade do DNA extraído, o gene 16S DNAr de bactérias foi amplificado por PCR utilizando os *primers* R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3') e P027F (5'-GAGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') que são universais para o domínio Bactéria. As condições de amplificação para um volume final de 25 µL foram: desnaturação inicial de 94 °C por 7 minutos, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Após verificar a qualidade do DNA extraído, foi realizada uma amplificação por PCR do gene 16S rRNA com *primers* específicos que compreendem a região 968-1401 do gene e possuem sequências barcode, as quais são necessárias para o preparo das amostras para pirosequenciamento. O *primer* reverse BAC5rB foi utilizado para todas as amostras, enquanto o *primer* forward BAC4A MID 10 foi utilizado na amostra de *U. foliosa* do ponto 1 e o *primer* BAC4A MID 11 utilizado na amostra de *U. foliosa* do ponto 2. A PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo tampão da enzima 1 X, 5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTPs, 0,1 µM de cada *primer*, 0,1U/µL de Taq DNA Polimerase. A

reação da amplificação foi realizada em termociclador, programado para realizar uma desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 62,5 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguida de extensão final a 72 °C por 10 minutos. Após a amplificação, a reação de PCR foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1%).

4.4 PURIFICAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E PIROSEQUENCIAMENTO DO 16S rRNA

Após a amplificação, o produto da PCR foi purificado utilizando o kit *QIAquick PCR purification* (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. A pureza e quantidade dos *amplicons* foi verificada em gel de agarose (1,5%) e espectrofotometria (NanoDrop®). Os produtos das reações foram proporcionalmente misturados de acordo com a quantificação e enviados para sequenciamento (Sequencing Center - Roche Applied Science -454 Life Sciences Corporation - 1 Commercial St. - Branford, CT, USA).

4.5 ANÁLISE E PROCESSAMENTO DE DADOS

Toda a análise de dados foi realizada através do *Pipeline Pyrosequencing*, encontrado no site Ribosomal Database Project (<http://pyro.cme.msu.edu>). A qualidade das seqüências foi analisada por meio da ferramenta “*Pipeline Initial Process*”, a qual possui 4 filtros de qualidade. Após esse processamento, as seqüências que não foram descartadas foram submetidas ao alinhamento, através da ferramenta “*Aligner*”. Após o alinhamento foram gerados *clusters*, com auxílio da ferramenta “*Complete Linkage Clustering*”. Para estimar o tamanho e cobertura das bibliotecas foram geradas curvas de rarefação através do programa MOTHUR, o qual utiliza as seqüências fornecidas pelo RDP. As seqüências foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) com similaridade de 91%, 95%, 97% e 100% (únicas) expressas graficamente. Foram estimados os índices de riqueza por meio dos índices de ACE e CHAO-1 e de diversidade pelos índices de Shannon-Winner e Simpson.

A classificação taxonômica das seqüências foi realizada pelo programa Metagenomics RAST, o qual possui um banco de dados de cloroplasto, tornando possível

a identificação de sequências de cloroplastos e também alinha as sequências com o banco de dados do RDP (Ribosomal Database Project), onde existem apenas sequências do gene rRNA 16S. O *heatmap* também foi gerado pelo MG-RAST.

5 RESULTADOS

5.1 ÁREAS DE COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As plantas foram coletadas em dois pontos diferentes (Figura 1) da região de Mogi das Cruzes, SP. Na época, a área de coleta estava alagada, mas apresentava clima ameno (aproximadamente 25 °C) com sol. Os utrículos de *U. foliosa* (Figura 2) foram fotografados em Microscópio Estereoscópico, sendo possível observar que a maior parte dos utrículos eram jovens, com poucos resíduos das presas em seu interior.

Figura 1 - Locais de coleta. Em A, balão verde indicando no mapa o Estado de São Paulo e o balão roxo com a letra A indicando a localização do município de Mogi das Cruzes; Em B, mapa do município de Mogi das Cruzes, onde localizam-se os pontos de coleta. O balão azul indica a localização do trecho Mogi-Salesópolis (23°33'28.85"S , 46° 8'12.65"O) e o balão vermelho indica a APA da várzea do Alto Tietê (23°32'4.97"S, 46° 8'42.47"O); Em C, várzea do trecho Mogi-Salesópolis; em D, várzea da APA do Rio Tietê

Figura 2 - Utrículo de *U. foliosa*. Em A, foto dos utrículos após a coleta; Em B utrículo em um aumento de 15x.

5.2 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO

O DNA total de 0,5g utrículos foi extraído, resultando em uma concentração de aproximadamente 1mg de DNA por μL o qual foi enviado para sequenciamento (Figura 3).

Figura 3 - Gel de eletroforese. Gel de eletroforese em agarose 1,5% contendo aproximadamente 1mg/ μL do produto de PCR do DNA extraído das amostras enviadas para sequenciamento. Na foto, marcadores moleculares 1kb e λ .

5.3 ANÁLISE E PROCESSAMENTO DOS DADOS

Para análise da qualidade das seqüências foi utilizada a ferramenta “*Pipeline Initial Process*”, encontrada no *Pyrosequencing Pipeline* do RDP (<http://pyro.cme.msu.edu/>). Após análise pelos quatro filtros de qualidade foram descartadas seqüências que apresentaram baixa qualidade das bases, fragmentos que não atingiram o número de bases necessário para a análise e seqüências que apresentaram bases não identificadas. Portanto, foram selecionadas somente seqüências com pontuação superior a 20, o que significa que seqüências com probabilidade de erro superior a 1% foram descartadas (KUNIN *et al*, 2008). Seqüências com tolerância maior do que 20% de distância máxima permitida dos *primers forward* e *reverse* também foram descartadas.

O histograma gerado pela ferramenta do RDP (Figura 4) mostrou que do produto da extração de DNA das amostras de *Utricularia foliosa* do ponto 1 (Figura 4A), foram obtidas 22.239 seqüências, dentre as quais 13.251 passaram pelo filtro. As seqüências obtidas dessas amostras apresentaram fragmentos com uma média de 431 bases. Foram obtidas 18.130 seqüências do produto de extração das amostras de *Utricularia foliosa* do ponto 2 (Figura 4B), sendo que 10.926 seqüências passaram pelos filtros. Essas seqüências apresentaram, em média, um tamanho de 432 bases.

Figura 4 - Histograma gerado pelo RDP. Em A, histograma das amostras de *U. foliosa* do ponto 1; em B, histograma das amostras de *U. foliosa* do ponto 2.

Após a passagem pelo filtro, as seqüências foram submetidas ao alinhamento pela ferramenta do RDP. Tal alinhamento utiliza a seqüência de *Escherichia coli* J01695 como

referência. Nas duas amostras analisadas o início das sequências ocorreu na base de número 968, posição de anelamento do *primer* utilizado. Em relação à posição final dos fragmentos, na maioria das sequências das amostras o final deu-se na base de número 1.401, variando apenas a porcentagem do número de sequências. Na amostra de *U. foliosa* do ponto 1 73,5% das sequências tiveram sua posição final em 1.401(Figura 5A), enquanto na amostra de *U. foliosa* do ponto 2 a porcentagem foi de 72,3%(Figura 5B). Sendo assim, o comprimento médio das sequências analisadas foi de 433 bases.

Figura 5 - Histograma de tamanho de fragmentos. Histograma obtido pelo RDP indicando as posições das bases de início e fim do alinhamento. Em A, histograma do alinhamento de *U. foliosa* ponto 1; em B do alinhamento de *U. foliosa* do ponto 2.

Com a realização do alinhamento foi possível a construção de *Clusters* por meio da ferramenta “*Complete Linkage Clustering*” do RDP. Foi construído um *cluster*, para o qual foram utilizados os alinhamentos de *U. foliosa* do ponto 1 e *U. foliosa* do ponto 2 (Figura 6). Foram obtidos 6.655 grupos com 0% de dissimilaridade; 2.265 com dissimilaridade de 1% e 180 grupos com 15% de dissimilaridade.

Figura 6 – Cluster. Cluster indicando o número de grupos de acordo com a dissimilaridade gerado a partir do alinhamento de *U. foliosa* do ponto 1 e *U. foliosa* do ponto 2.

Por meio da construção dos *clusters* foi possível criar curvas de rarefação para analisar a riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) nas comunidades bacterianas presentes nas amostras. As curvas de rarefação foram construídas com os dados obtidos no programa MOTHUR. Tanto a curva de rarefação da amostra de *U. foliosa* do ponto 1 (Figura 7A) quanto a curva de rarefação da amostra do ponto 2 (Figura 7B) não demonstraram estabilização das sequências com 100% de similaridade, o que indica que há uma grande diversidade de linhagens bacterianas em ambos os pontos. Porém, esse resultado não foi observado dessa forma para os tratamentos ao nível de similaridade de 97% (espécie), 95% (gênero) e 91% (ordem) onde as curvas começaram a mostrar uma tendência de estabilidade, embora mesmo ao nível de 91% de similaridade as curvas não alcançaram a estabilização, indicando que o número de sequências amostradas ainda não foi suficiente para descrever toda a diversidade bacteriana presente nos utrículos de *U. foliosa* coletados de dois pontos.

Figura 7 - Curvas de rarefação. Curvas de rarefação construídas a partir de dados obtidos pelo programa MOTHUR mostrando os níveis de similaridade. Em A, *U. foliosa* do ponto 1; em B *U. foliosa* do ponto 2. Os níveis de similaridade de 100%, 97%, 95% e 91% correspondem aos níveis taxonômicos de linhagem, espécie, gênero e ordem respectivamente.

A comparação das curvas de rarefação entre as amostras de *U. foliosa* do ponto 1 e do ponto 2 (Figura 8), permitiu verificar que as amostras do Ponto 1 apresentam uma maior riqueza em relação ao Ponto 2 em todos os níveis. Nos níveis de 100% (único) e 97% as curvas do ponto 1 são mais acentuadas do que as do ponto 2 (Figura 8A). É possível observar também que a curva que corresponde ao nível de ordem (91%) da amostra do ponto 1 é mais acentuada do que a curva correspondente à gênero (95%) do ponto 2 (Figura 8B), indicando novamente uma maior riqueza no Ponto 1.

Figura 8 - Curvas de rarefação. Comparação entre as amostras de *U. foliosa* do Ponto 1 e do Ponto 2. Em A, comparação entre os níveis de similaridade de 100% (único) e 97%; em B, comparação entre os níveis de similaridade de 95% e 91%.

A análise de distribuição das 13.251 seqüências do Ponto 1 obtidas após a filtragem gerou 11.336 OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) com 100% de similaridade, enquanto das 10.926 seqüências do Ponto 2 foram observadas 8.425 OTUs no mesmo nível de similaridade. Nos outros níveis de similaridade observados (97%, 95% e 91%), o número de OTUs do Ponto 1 também foi maior que aquele observado para o Ponto 2 (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição de OTUs de acordo com Nível Taxonômico e Biblioteca. Biblioteca do Ponto 1 apresentou um total de 13.251 sequências, enquanto a biblioteca do Ponto 2 apresentou um total de 10.926 sequências

Biblioteca	Similaridade	Nível Taxonômico	OTUs
P1	100%	linhagem	11336
	97%	espécie	5455
	95%	gênero	4632
	92%	família	3748
	91%	ordem	3500
P2	100%	linhagem	8425
	97%	espécie	3338
	95%	gênero	2864
	92%	família	2325
	91%	ordem	2194

A construção de Diagramas de Venn revelou que no nível de similaridade 100% (único) apenas 0,02% das OTUs são compartilhadas entre o Ponto 1 e o Ponto 2 (Figura 9). As sequências agrupadas com 97%, 95% e 91% de similaridade apresentaram respectivamente 10,5%, 13,4% e 17,9% de OTUs compartilhadas. Em todos os níveis de similaridade o Ponto 1 apresentou um maior número de OTUs quando comparado ao Ponto 2, corroborando o resultado obtido com a construção das curvas de rarefação.

Figura 9 - Diagramas de Venn. Diagramas de Venn mostrando o número de OTUs com diferentes níveis de similaridade compartilhado pelos utrículos de *U. foliosa* provenientes de 2 pontos de coleta.

A análise por *Heatmap* foi utilizada para organizar as sequências obtidas baseadas nas semelhanças taxonômicas. As linhas vermelhas representam baixa abundância de determinado grupo nas bibliotecas enquanto as linhas verdes representam alta abundância.

O *Heatmap* foi construído no site do MG-RAST (metagenomics.anl.gov) e agrupou as sequências de acordo com os filos. A análise mostrou que tanto na biblioteca do ponto 1 quanto na biblioteca do ponto 2 houve grande abundância de sequências ainda não conhecidas. Os grupos com maior abundância na biblioteca do ponto 1 foram Proteobacteria, Cyanobacteria, Firmicutes, Acidobacteria, Verrucomicrobia e Chlamydiae, enquanto na biblioteca do ponto 2 os principais grupos encontrados foram Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes, Acidobacteria e Verrucomicrobia (Figura 10).

Figura 10 – Heatmap. Heatmap mostrando o agrupamento dos filotaxas baseado nas semelhanças taxonômicas das sequências. Linhas vermelhas representam baixa abundância do filo e linhas verdes representam alta abundância do filo.

Para estimar a riqueza foram utilizados os índices de ACE e CHAO-1 (Tabela 2) e para estimar a diversidade foram utilizados os índices de Shannon-Winner e Simpson (Tabela 3). O ponto 1 apresentou maior índice de riqueza quando comparado ao ponto 2 em todos os níveis de similaridade. No nível de similaridade de 100% ambos os pontos apresentaram os valores máximos de riqueza. A riqueza no ponto 1 pelo índice de Chao-1 foi de 180783,14, enquanto para o ponto 2 foi de 109389,17. Já por meio do índice Ace, a riqueza do ponto 1 foi de 472749,15 e do ponto 2 de 310441,70. O valor mínimo

estimado por Chao-1 foi encontrado no nível de similaridade de 91%, sendo 8712.41 e 5721.36 para os pontos 1 e 2, respectivamente. Os menores valores em Ace também foram encontrados no nível de similaridade de 91%, sendo 15116.0 para o ponto 1 e 9680.46 para o ponto 2.

Tabela 2 - Valor estimado de riqueza calculado pelos índices de Ace e Chao-1, calculados pelo programa MOTHUR.

Biblioteca	Similaridade	Nível Taxonômico	Sequências	OTUs	Chao-1	Ace
P1	100%	linhagem	13251	11336	180783.14 (162795.01-200907.64)	472749.15 (454929.91-491284.21)
	97%	espécie	13251	5455	19003.56 (17700.93-20444.75)	38036.22 (37249.84-38842.04)
	95%	gênero	13251	4632	13533.70 (12629.79-14539.76)	24473.69 (23941.15-25020.92)
	92%	família	13251	3748	9673.05 (9009.05-10420.86)	16910.68 (16531.19-17301.43)
	91%	ordem	13251	3500	8712.41 (8108.72-9395.16)	15116.00 (14773.70-15468.70)
P2	100%	linhagem	10926	8425	109389.17 (97959.03-122278.50)	310441.70 (300041.82-321212.47)
	97%	espécie	10926	3338	11185.75 (10247.82-12250.99)	22475.52 (21854.55-23117.31)
	95%	gênero	10926	2864	8283.71 (7595.68-9071.77)	15402.95 (14977.03-15843.86)
	92%	família	10926	2325	6116.87 (5583.95-6736.94)	10319.62 (10020.64-10630.21)
	91%	ordem	10926	2194	5721.36 (5210.08_6319.32)	9680.46 (9401.51-9969.12)

Assim como os valores estimados de riqueza, os índices de diversidade da biblioteca do ponto 1 também apresentaram valores maiores quando comparada à biblioteca do ponto 2 em todos os níveis de similaridade. O valor máximo atingido no índice de Shannon-Winner foi de 9.059 no ponto 1, enquanto no ponto 2 foi de 8.534, ambos no nível de similaridade 100%. O valor mínimo observado foi de 6.523 no ponto 1 e 5.263 no ponto 2, no nível de similaridade 91%. Todos os índices apresentaram desvios significativos de acordo com a faixa de similaridade adotada, além de apresentarem intervalos sem sobreposição.

Tabela 3 - Valor estimado de diversidade calculado pelos índices de Shannon-Winner e Simpson calculados pelo programa MOTHUR.

Biblioteca	Similaridade	Nível Taxonômico	Sequências	OTUs	Shannon	Simpson
P1	100%	linhagem	13251	11336	9.059 (9.037-9.082)	0.000506 (0.00043-0.000581)
	97%	espécie	13251	5455	7.303 (7.264-7.342)	0.007775 (0.007211-0.008339)
	95%	gênero	13251	4632	7.035 (6.996-7.073)	0.008377 (0.0078-0.008954)
	92%	família	13251	3748	6.645 (6.606-6.684)	0.010995 (0.010309-0.011681)
	91%	ordem	13251	3500	6.523 (6.483-6.562)	0.011991 (0.011263-0.012719)
P2	100%	linhagem	10926	8425	8.534 (8.503-8.565)	0.00146 (0.001283-0.001637)
	97%	espécie	10926	3338	6.008 (5.955-6.061)	0.038787 (0.036169-0.041404)
	95%	gênero	10926	2864	5.775 (5.723-5.827)	0.043676 (0.040835-0.046517)
	92%	família	10926	2325	5.380 (5.328-5.432)	0.055363 (0.052022-0.058704)
	91%	ordem	10926	2194	5.263 (5.211-5.315)	0.059259 (0.055777-0.062742)

Através da análise das sequências pelo programa MG-RAST, o qual utiliza o banco de dados do RDP, foi possível perceber que, das 13.485 sequências obtidas da biblioteca de *U. foliosa* do Ponto 1, 53% (7.182) pertenciam ao Domínio Bacteria, 30% (3.970) ao Domínio Eukaryota (cloroplastos de protistas e algas) e 17% (2.333) são sequências não conhecidas, provenientes de possíveis grupos ainda não descritos. A biblioteca de *U. foliosa* do ponto 2 apresentou 51% (5.463) dos representantes sendo do Domínio Eukaryota, 35% (3.781) do Domínio Bacteria e 14% (1.456) não foram classificadas (Figura 11).

Figura 11 - Distribuição das sequências das bibliotecas de *U. foliosa* dos pontos 1 e 2 nos diferentes Domínios

Dentro do Domínio Bacteria, os grupos predominantes nas amostras de *U. foliosa* do ponto 1 foram: Proteobacteria com 4.128 sequências (58%), Cyanobacteria com 773 sequências (11%), Firmicutes com 766 sequências (11%), Acidobacteria com 509 sequências (7%), Verrucomicrobia com 337 sequências (5%) e Actinobacteria com 228 sequências (3%). Além desses, grupos como Chlamydiae, Gemmatimonadetes, Tenericutes, Chlorobi, Deinococcus-Thermus, Nitrospirae, Spirochaetes, Thermodesulfobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes, Synergistetes e Thermotogae também foram identificados. (Figura 12). A biblioteca de *U. foliosa* do ponto 2 apresentou como grupos predominantes os filos: Proteobacteria com 1965 sequências (52%), Spirochaetes com 545 sequências (14%), Actinobacteria com 452 sequências (12%), Acidobacteria com 211 sequências (6%), Verrucomicrobia com 180 sequências (5%), Cyanobacteria com 175 sequências (5%), Firmicutes com 106 sequências (3%) e Bacteroidetes com 83 sequências (2%). Além destes, grupos como Chlamydiae, Deinococcus-Thermus, Nitrospirae, Chloflexi, Planctomycetes, Tenericutes e Fusobacteria também foram encontrados. De acordo com o gráfico comparativo gerado, os grupos Acidobacteria, Cyanobacteria, Firmicutes e Proteobacteria estão mais presentes no local 1, enquanto os grupos Actinobacteria, Bacteroidetes e Spirochaetes estão mais presentes no local 2 (Figura 13).

Figura 12 - Árvore filogenética indicando os filos e suas classes encontradas na biblioteca do ponto 1. Agrupamento realizado pelo programa MG-RAST.

Figura 13 - Árvore filogenética indicando os filos e suas classes encontradas na biblioteca do ponto 2. Agrupamento realizado pelo programa MG-RAST.

De acordo com o gráfico comparativo gerado, os grupos Acidobacteria, Cyanobacteria, Firmicutes e Proteobacteria estão mais presentes no local 1, enquanto os grupos Actinobacteria, Bacteroidetes e Spirochaetes estão mais presentes no local 2 (Figura 14).

Figura 14 - Porcentagem dos diferentes filos presentes nas bibliotecas de *U. foliosa*.

A análise do grupo Proteobacteria, o qual foi dominante nos utrículos do Ponto 1 e do Ponto 2, demonstrou uma predominância da classe Alphaproteobacteria com 1851 sequências (45%), seguido por Betaproteobacteria com 938 sequências (23%), Deltaproteobacteria com 640 sequências (16%) e Gammaproteobacteria com 643 sequências (16%) no Ponto 1, enquanto no Ponto 2 39% das sequências pertence à classe Alphaproteobacteria (767 sequências), 38% à classe Gammaproteobacteria (741 sequências), 17% à classe Betaproteobacteria (336 sequências) e 6% à classe Deltaproteobacteria (115 sequências) (Figura 15).

Figura 15 - Divisão de classes dentro do Filo Proteobacteria das bibliotecas de *U. foliosa* do ponto 1 e do ponto 2.

No ponto 1, a espécie mais encontrada dentro da classe Alphaproteobacteria foi *Rhizobium leguminosarum*, com 622 sequências (4,7% do total de bactérias) (Figura 16), enquanto na classe Betaproteobacteria a espécie mais encontrada foi *Aquitalea* sp., com 68 sequências (0,5% do total de bactérias), seguido por *Chromobacterium* sp., com 65 sequências (0,49% do total de bactérias) (Figura 17).

Na biblioteca do ponto 2, a espécie predominante dentro do grupo Alphaproteobacteria foi *Gluconobacter cerinus*, com 109 sequências (0,9% do total de bactérias) (Figura 18), enquanto dentro do grupo Betaproteobacteria foi *Chromobacterium violacium*, com 102 sequências (0,93% do total de bactérias) (Figura 19).

Figura 16 - Árvore filogenética indicando as espécies de Alphaproteobacteria encontradas na biblioteca do ponto 1. Agrupamento realizado pelo programa MG-RAST.

Figura 17 - Árvore filogenética indicando as espécies de Betaproteobacteria encontradas na biblioteca do ponto 1. Agrupamento realizado pelo programa MG-RAST

Figura 18 - Árvore filogenética indicando as espécies de Alphaproteobacteria encontradas na biblioteca do ponto 2. Agrupamento realizado pelo programa MG-RAST.

Figura 19 - Árvore filogenética indicando as espécies de Betaproteobacteria encontradas na biblioteca do ponto 2. Agrupamento realizado pelo programa MG-RAST.

As sequências do grupo Cyanobacteria foram classificadas até filo somente. Nenhuma das sequências foi identificada ao nível de “classe”.

Na biblioteca do ponto 1, para o Filo Firmicutes, 79% (605 sequências) das sequências pertence à classe Clostridia, 20% (154 sequências) à Bacilli e somente 1% (7 sequências) à Negativicutes. Na biblioteca do ponto 2, 83% (88 sequências) das sequências pertencem à classe Bacilli, 16% (17 sequências) à Clostridia e apenas 1% (1 sequência) pertencem à classe Negativicutes (Figura 20).

Figura 20 - Divisão de classes dentro do Filo Firmicutes das bibliotecas de *U. foliosa* do ponto 1 e do ponto 2.

Já para o grupo Acidobacteria, 95% (483 sequências) das sequências da biblioteca do ponto 1 pertence à classe Acidobacteria, 4% (23 sequências) à classe Solibacteres e 1% (3 sequências) não foram classificadas. No ponto 2, foi observado que 88,5% (187 sequências) pertence à classe Acidobacteria, 4% (8 sequências) à Solibacteres e 7,5% (16 sequências) das sequências não foram classificadas (Figura 21).

Figura 21 - Divisão de classes dentro do Filo Acidobacteria das bibliotecas de *U. foliosa* do ponto 1 e do ponto 2.

No filo Verrucomicrobia, 82% (277 sequências) dos representantes da biblioteca do ponto 1 pertencem à classe Verrucomicrobiae, 15% (49 sequências) à classe Opitutae, 1% (5 sequências) à classe Spartobacteria e 2% (6 sequências) foram classificados somente até filo. Na biblioteca do ponto 2, 88% (160 sequências) dos representantes também pertencem à classe Verrucomicrobiae, 6,5% (12 sequências) à Opitutae, 2,5% (4 sequências) à classe Spartobacteria e 3% (5 sequências) das sequências não foram classificadas até classe (Figura 22).

Figura 22 - Divisão de classes dentro do Filo Verrucomicrobia das bibliotecas de *U. foliosa* do ponto 1 e do ponto 2.

Dentro do Domínio Eukaryota, a biblioteca de *U. foliosa* do Ponto 1 apresentou os grupos Bacillariophyta com 530 sequências (13%), Phaeophyceae com 8 sequências (0,2%), Chlorophyta com 98 sequências (3%), Eustigmatophyceae com 48 sequências (1%) e Streptophyta com 3.137 sequências (79%), sendo este último o mais prevalente. A biblioteca de *U. foliosa* do Ponto 2 apresentou como grupos dominantes os filos Bacillariophyta – diatomáceas- com 360 sequências (7%), Chlorophyta com 118 sequências (2%) e Streptophyta - Charophytes e plantas com 4.799 sequências (88%), sendo este, assim como na biblioteca do ponto 1, o grupo dominante (Figura 23).

Figura 23 - Divisão de arquivos dentro do Domínio Eukaryota das bibliotecas de *U. foliosa* do ponto 1 e do ponto 2.

Dentro do filo Streptophyta, o qual apresentou o maior número de sequências, as classes predominantes na biblioteca do ponto 1 foram Zygnemophyceae com 496 sequências (16%), Ophioglossopsida com 446 sequências (14%), Polytrichopsida com 273 sequências (9%), Klebsormidiophyceae com 195 sequências (6%) e Equisetopsida com 26 sequências (1%). Na biblioteca do ponto 2, as classes predominantes foram Ophioglossopsida com 1780 sequências (37%), Zygnemophyceae com 314 sequências (7%), Klebsormidiophyceae com 139 sequências (3%) e Mesostigmatophyceae com 63 sequências (1%). Além dessas, foram encontrados, porém em menor quantidade, representantes das classes Anthocerotopsida, Bryopsida, Chlorokybophyceae, Coleochaetophyceae, Cycadopsida, Ginkgoopsida, Isoetopsida, Liliopsida e Polypodiopsida (Figura 24).

Figura 24 - Divisão de classes dentro do Filo Streptophyta das bibliotecas de *U. foliosa* do ponto 1 e do ponto 2.

6 DISCUSSÃO

O procedimento utilizado neste trabalho para a análise da diversidade microbiana presente no interior de utrículos de *Utricularia foliosa* vem sendo utilizado em outros estudos devido ao fato da análise de biblioteca de 16S rRNA não apresentar a necessidade de obtenção de culturas puras para o sequenciamento, revelando também informações de microrganismos que ainda não podem ser obtidos a partir de isolamento. Além disso, sendo as amostras obtidas diretamente do meio ambiente, a análise independente de cultivo/metagenômica pode servir para estabelecer hipóteses sobre interações entre as comunidades microbianas. Sendo assim, a análise independente de cultivo é cada vez mais vista como uma tecnologia de linha de base para a compreensão da ecologia e evolução dos ecossistemas microbianos (KUNIN et al., 2008). Aliado a esse fato, as técnicas de seqüenciamento em larga escala, como o pirosequenciamento, vem sendo amplamente utilizadas devido ao fato de ter um custo menor por base sequenciada, além do grande número de dados gerados. Assim, devido ao grande número de dados, novas ferramentas de bioinformática foram desenvolvidas para facilitar a análise dessa informação. Programas utilizados neste trabalho, como por exemplo, o RDP, visam a otimização de tempo durante as análises. , visto que em virtude de os passos serem realizados em pequenos clusters, grande parte dos passos são relativamente rápidos (COLE, et al., 2008).

Em ambas as bibliotecas, as curvas de rarefação não demonstraram uma estabilização mesmo com a grande quantidade de seqüências obtidas, o que indica que existe uma grande diversidade de linhagens bacterianas no interior dos utrículos avaliados. De acordo com Torsvik et al. (1990), um grama de solo pode conter até 10^{10} células. Entretanto, o número de células bacterianas no interior dos utrículos não é conhecido, embora em estudos anteriores, foi observada por meio de isolamento em meio de cultura que utrículo de *U. breviscapa*, *U. foliosa*, *U. meyeri* e de *U. subulata* apresentam de 10 a 10^4 UFC por utrículos (SANTOS, 2011; LIMA, 2011). Tendo em vista a quantidade de matéria orgânica presente no interior dos utrículos, proveniente das presas digeridas, pode ser sugerido que deva estar presente uma grande diversidade e densidade bacteriana no interior destes utrículos. Esta hipótese pode ser corroborada pelo fato de que mesmo com mais de 10 mil seqüências avaliadas, não foi observada a

estabilização das curvas de rarefação, sendo sugerido que seria necessário uma amostra muito maior para representar toda a diversidade bacteriana presente no interior da planta. A construção de Diagramas de Venn mostrou também que há uma maior diversidade na biblioteca do Ponto 1 em relação à biblioteca do Ponto 2, corroborando com as curvas de rarefação de ambos os pontos, e que existe uma baixa sobreposição de genótipos nos utrículos de *U. foliosa* destes locais.

A análise das sequências revelou que há representantes do Domínio Bacteria e do Domínio Eukariota em ambas as bibliotecas. De acordo com Kunin et al., (2008), as comunidades microbianas compreendem combinações de bactéria, archaea e eucariotos microbianos e vírus, podendo todos os grupos estarem presentes em um único habitat. A presença de representantes do Domínio Eukaryota com a utilização de *primers* específicos para o 16S rRNA pode ser justificada pelo fato de que os cloroplastos destes grupos mantêm esse gene conservado, podendo portanto aparecerem em sequenciamentos com uso deste *primer*.

Com exceção do grupo Cyanobacteria, todos os outros representantes de ambas as bibliotecas pertencem aos nove principais filos frequentemente encontrados nos solos (Youssef et al., 2009). Sabe-se que Cyanobacteria podem ser uma preocupação em habitats aquáticos, pois costumam ocorrer em condição de eutrofização (LI et al., 2011), onde o nível de matéria orgânica é alto, como aquele observado no interior dos utrículos.

Segundo Pini et al. (2011), o filo Proteobacteria é o grupo mais numeroso reconhecido no domínio Bacteria, e o que apresenta uma grande diversidade, fato este que possibilita encontrar membros deste grupo nos mais variados ambientes. Assim, o fato deste ter sido o filo mais predominante em ambas as bibliotecas de *U. foliosa*. Na biblioteca do ponto 1, a classe mais predominante foi Alphaproteobacteria, a qual coloniza desde habitats como ambientes vulcânicos do fundo do oceano até o solo, podendo interagir de raízes de plantas a superfície das águas dos oceanos. A espécie *Rhizobium leguminosarum*, a qual foi a mais encontrada na biblioteca, é conhecida por habitar diversos nichos ecológicos e por serem capazes de formar estreitas associações com hospedeiros eucarióticos. Além disso, são capazes de estabelecer simbiose de fixação de nitrogênio com nódulos de leguminosas, podendo assim aumentar, no interior dos utrículos, os níveis de N₂ (BONOMI et al., 2012).

No ponto 2, apesar de o grupo Proteobacteria também ter sido o mais presente, as espécies predominantes foram *Microbacterium resistens* (Actinobacteria), *Brachyspira aalborgi* e *Leptospira interrogans* (Spirochaetes). As espécies do gênero *Aureobacterium* foram reclassificadas e acomodadas dentro do gênero *Microbacterium*, incluindo a espécie *Aureobacterium resistens*, a qual passou a ser descrita como *Microbacterium resistens*. As linhagens do gênero *Microbacterium* são comuns e podem ser encontradas e isoladas a partir de diferentes partes superiores das plantas (BEHRENDT et al., 2001). Estudos realizados detectaram linhagens de *Microbacterium* spp. bem como *Aureobacterium* spp. presentes em milho (*Zea mays*) e algodão (*Gossypium hirsutum*) (MCINROY; KLOPPER, 1995). Embora *Microbacterium resistens* exiba todas as características taxonômicas do gênero, a reclassificação de *A. resistens* como *Microbacterium resistens* ainda está pendente (BEHRENDT et al., 2001). A presença dessa espécie na biblioteca do ponto 1 deve se relacionar a grande quantidade de sequências de eucariotos, principalmente plantas superiores, encontradas nos utrículos de *U. foliosa*.

Segundo Nadal & Nadal (2011), a espécie *Brachyspira aalborgi* encontra-se em um grupo heterogêneo de bactérias que causam espiroquetose intestinal, definida como colonização da mucosa do cólon e da membrana apical do apêndice por bactérias da família Spirochaetaceae. Essas bactérias normalmente causam diarreias, principalmente em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, por serem um grupo de bactérias oportunistas. Esses microrganismos se espalham pela via fecal-oral e a colonização depende de saneamento, alimentação, comportamento e estado imunológico do paciente. De acordo com Nascimento et al. (2004), o gênero *Leptospira* compreende um grupo heterogêneo de espécies patogênicas e saprófitas também pertencentes à ordem Spirochaetales. A transmissão para humanos ocorre através de contato com animais selvagens os domésticos ou exposição a solo ou água contaminada. No ambiente urbano, o rato marrom (*Rattus norvegicus*) é o causador predominante da doença em seres humanos. A presença desses microrganismos na biblioteca de *U. foliosa* do ponto 2 pode estar relacionada ao fato de esse local ser mais próximo do centro urbano, sendo cercado por casas e, portanto, podendo ter grande quantidade de esgoto despejada na várzea. Entretanto, deve ser levado em consideração o fato de que estes grupos parecem se adaptar as condições no interior dos utrículos, onde devem interagir com diferentes espécies microbianas.

Estudos realizados com diferentes espécies de plantas carnívoras mostraram que os principais filos encontrados são semelhantes aos presentes neste estudo, porém com porcentagens divergentes. Koopman & Carsten (2010) analisaram plantas carnívoras terrestres da espécie *Sarracenia alata* e verificaram que o grupo predominante foram membros do filo Proteobacteria, apresentando também representantes dos grupos Bacteroidetes e Firmicutes. Já Krieger & Kourtev (2012) analisaram plantas carnívoras terrestres da espécie *Sarracenia purpurea* e também descreveram como predominante o grupo Proteobacteria, assim como em ambas as bibliotecas estudadas neste trabalho. Verificaram também a presença dos grupos Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes e Chlamidiae, todos eles também presentes nas duas bibliotecas de *U. foliosa* obtidas no presente trabalho. Apesar de os principais grupos presentes serem semelhantes, a frequência de cada grupo nas diferentes espécies avaliadas é divergente. Isso ocorre devido ao fato de que cada espécie de planta carnívora deve fazer uma seleção das espécies microbianas presentes, por meio dos diferentes nichos expostos em suas armadilhas. Sabe-se que em espécies terrestres como *Byblis*, *Heliamphora* e *Sarracenia* a atuação bacteriana é essencial dada à ausência de secreção de enzimas por essas plantas (JUNIPER et al. 1989).

Juntamente com as bibliotecas de *U. foliosa*, bibliotecas de amostras de água dos locais de coleta dessas plantas e também biblioteca de *U. gibba* foram analisadas por Ferreira (2011). Para a biblioteca de água coletada no Ponto 1, foi descrito que o grupo predominante foi Proteobacteria, seguido por Actinobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia e Firmicutes, enquanto para a biblioteca de *U. foliosa* do mesmo ponto o grupo predominante também foi Proteobacteria, apresentando a mesma porcentagem em ambas as bibliotecas, seguido por Cyanobacteria, Firmicutes, Acidobacteria e Actinobacteria respectivamente. Para a biblioteca de água coletada no Ponto2, também foi descrito como grupo predominante Proteobacteria, seguido por Actinobacteria, Firmicutes e Verrucomicrobia. Já para a biblioteca de *U. foliosa* do mesmo ponto, o grupo predominante também foi Proteobacteria, seguido por Spirochaetes, Actinobacteria, Acidobacteria, Cyanobacteria e Verrucomicrobia. Percebe-se que nos dois pontos amostrados, a porcentagem dos principais grupos presentes no interior dos utrículos é diferente quando comparadas à porcentagem das comunidades presentes na água do local de coleta. Ao comparar as comunidades presentes nas duas bibliotecas de *U. foliosa* com os resultados apresentados por Ferreira (2011) para a biblioteca de *U. gibba*, é

possível perceber que a comunidade bacteriana no interior dos utrículos é muito semelhante, independente da espécie (*U. foliosa* X *U. gibba*). Esses resultados sugerem que existe uma seleção da planta pelos grupos microbianos a partir da comunidade microbiana presente no ambiente, visto que estas diferem entre o local de coleta e a planta, mas se assemelham quando comparadas aos utrículos de outra espécie (*U. gibba*).

Tabela 4 - Percentual dos principais grupos encontrados no interior de *U. Foliosa* do ponto 1 e 2, mostrando a diferença entre estudos realizados com plantas carnívoras terrestres e estudo realizado com *U. Gibba* e a água dos locais de coleta das plantas.

FILO	SUBFILO	Koopman & Carsten 2010	Krieger & Kourtev, 2012	ÁGUAP 1	Ferreira, 2011 ÁGUA P2	<i>U. gibba</i>	<i>U. foliosa P1</i>	<i>U. foliosa P2</i>
		<i>Sarracenia alata</i>	<i>Sarracenia purpurea</i>					
Proteobacteria		64,3%	68,9%	58%	45%	57%	58%	52%
	<i>Alphaproteobacteria</i>			12%	48%	33%	45%	39%
	<i>Betaproteobacteria</i>			62%	41%	28%	23%	17%
	<i>Deltaproteobacteria</i>			10%	22%	15%	16%	6%
	<i>Gammaproteobacteria</i>			14%	30%	21%	16%	38%
Firmicutes		11,1%	6%	6%	4%	16%	11%	3%
	<i>Bacilli</i>			33%	39%	46%	20%	83%
	<i>Clostridia</i>			64%	59%	25%	79%	16%
	<i>Thermolithobacteria</i>			1,74%	1%	27%	0	0
	<i>Negativicutes</i>			0	0	0	1%	1%
Actinobacteria			0,2%	21%	39%	20%	3%	12%
Chlamydiae				3,19%	0,5%	0,6%	2%	1%
Acidobacteria				9%	1%	<1%	7%	6%
Cyanobacteria			7%	2%	1%	9%	11%	5%
Verrucomicrobia				6%	3%	3%	5%	5%
Spirochaetes				0%	0%	0%	0%	14%
Bacteroidetes		21,6%	17%	< 1%	1%	< 1%	1%	2%

Bactérias presentes nos utrículos podem consumir o material orgânico dissolvido, o qual não pode ser ingerido por organismos maiores (SIROVÁ; ADAMEC et al., 2009), facilitando o crescimento fotoautotrófico através da liberação de nutrientes após a absorção desse material orgânico dissolvido (COVERNEY; WETZEL, 1995). Por ser o utrículo uma armadilha completamente selada, é possível supor que uma

proporção significativa da atividade enzimática, assim como os nutrientes disponíveis no utrículo, são derivados das comunidades microbianas presentes (SIROVÁ; ADAMEC et al., 2009). Pode-se inferir também que foram coletados indivíduos, em sua maioria, adultos, já que a eficácia de captura dos utrículos diminui com a idade da planta. Segundo Sirová & Adamec et al. (2009) a idade das armadilhas é uma consideração vital em qualquer estudo da ecologia funcional de *Utricularia*, fator que deve ser levado em consideração quanto à diferença entre as comunidades presentes nos utrículos de *U. foliosa* do Ponto 1 e 2. Os utrículos não foram selecionados de acordo com a idade, estando presentes tanto utrículos jovens quanto utrículos velhos. Sendo assim, é possível que ocorra também uma seleção das plantas conforme o estágio da vida em que a mesma se encontra em cada local.

Algumas enzimas produzidas por essa comunidade microbiana do interior dos utrículos podem ser úteis durante um período da vida da planta e perdem esta importância em um outro momento. De acordo com Gordon (2007), em plantas carnívoras aquáticas o papel do carbono orgânico absorvido através das presas pode ser ecologicamente importante. Adamec (1996) descobriu que o crescimento de *Aldrovanda vesiculosa*, planta carnívora aquática que apresenta modo de vida e estratégia parecidos com os de *Utricularia* spp., foi maior em águas com elevada concentração de CO_2 e sugeriu que a carnivorismo pode ser uma forma de obter carbono adicional. Possivelmente essas plantas limitam os organismos vivos não só para absorver nitrogênio e fósforo, mas também o CO_2 produzido através da atividade respiratória das comunidades dentro dos utrículos. Isso explicaria também o fato dessas plantas viverem em ambientes onde os níveis de nitrogênio e o fósforo poderiam ser limitantes para o crescimento vegetal. Assim, a grande variedade de organismos presentes dentro dos utrículos, como algas, descritos nesse trabalho, poderiam por meio de uma cadeia metabólica gerar uma série de moléculas importantes para o metabolismo da planta hospedeira.

A quantidade de representantes do Domínio Eukaryota foi bastante elevada nas duas bibliotecas avaliadas. Estudos anteriores mostraram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho: Cohn (1875), Botta (1976), Darwin (1875), Hegner (1926) e Schumacher (1960) descreveram as comunidades presentes no interior das armadilhas e detectaram principalmente Cyanophyta, Bacillariophyta, Chrysophyta, Euglenophyta e Chlorophyta. Gordon (2007) ao analisar a composição das presas de *U.*

gibba e *U. inflata*, demonstrou que mais de 50% do conteúdo presente nos utrículos dessas plantas era composto por algas. Os principais grupos presentes no estudo foram Cyanophyta, Chlorophyta, Bacillariophyta e Euglenophyta. Através dessas observações, foi levantada a hipótese de que as algas vivem como simbiontes nas armadilhas de *Utricularia*, a qual poderia se beneficiar de carboidratos produzidos pelas algas (PEROUTKA et al., 2008).

Segundo Peroutka et al. (2008), a porcentagem de algas no interior dos utrículos depende fortemente da condutividade elétrica da água. Em águas pobres em íons, grande quantidade de algas era capturada, enquanto em águas mesotróficas a presença de algas no interior dos utrículos foi rara. Esse dado poderia explicar a menor presença de Eukaryota na biblioteca de *U. foliosa* do ponto 1 quando comparada à biblioteca de *U. foliosa* do ponto 2. Essa diferença pode-se dar devido à diferença de condutividade da água já que quanto maior a poluição do local, maior também é a condutividade da água. Além disso, Peroutka et al. (2008) notou diferenças na composição de algas entre diferentes regiões geográficas. Os grupos dominantes se diferenciavam de acordo com a região estudada. Esse resultado pode explicar o fato de o grupo Streptophyta ter se apresentado como principal no estudo de *U. foliosa* na região do Alto Tietê enquanto em outros estudos o grupo não foi descrito. Gordon e Pacheco (2007) demonstraram uma preferência por Bacillariophyta para *Utricularia* neotrópica, enquanto nos estudos de Peroutka et al. (2008) esse grupo se mostrou bastante raro. Diante desses resultados, uma vez que algas são presas dominantes em águas mais oligotróficas, pode-se esperar que nutrientes derivados de algas contribuam significativamente para a sobrevivência das plantas nestes locais (PEROUTKA et al., 2008).

Também foram encontrados sequências com similaridade a rRNA 16S de plantas superiores (Liliopsida, Cycadopsida, Ophioglossopsida e Ginkgoopsida) fato este que pode ser explicado pela entrada de células destas plantas no interior dos utrículos durante a captura das presas. Assim, pode ser sugerido que este acréscimo de matéria orgânica poderia ser um “suplemento” utilizado pelas bactérias para a geração de nutrientes para a planta hospedeira.

7 CONCLUSÃO

Os resultados permitiram concluir que:

- A comunidade no interior de utrículos de *U. foliosa* diferiu entre os pontos amostrados, sendo no ponto 1, composta principalmente pelo domínio Bacteria, enquanto que no ponto 2 a maior parte das sequências pertenciam ao domínio Eukaryota;
- Dentro do domínio Bacteria, o grupo Proteobacteria foi dominante nas duas bibliotecas de *Utricularia foliosa*, sendo a maioria das sequências dos dois pontos pertencentes à classe Alphaproteobacteria;
- Apesar de o grupo Proteobacteria possuir mais representantes na biblioteca do ponto 2, as espécies mais encontradas foram *Microbacterium resistens*, pertencente ao filo Actinobacteria e *Brachyspira aalborgi* e *Leptospira interrogans*, ambas pertencentes ao grupo Spirochaetes;
- Há uma seleção das plantas quanto aos grupos presentes no interior dos utrículos, visto que se diferem quando comparadas à água do ambiente, porém se assemelham quando comparadas as plantas de locais diferentes;
- Existe a hipótese de que a grande presença de algas pode estar relacionada à disponibilização de nutrientes, contribuindo significativamente para a sobrevivência das plantas em regiões oligotróficas.

REFERÊNCIAS*

- ADAMEC, L. (1996). Photosynthetic characteristic of the aquatic carnivorous plant *Aldrovanda vesiculosa*. **Aquat. Bot.** 59: 297-306.
- ADAMEC, L. (1997). Mineral nutrition of carnivorous plants. **The Botanical Review**, 63: 273-299.
- AMANN, R.I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, 59, 143-169.
- ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. (2000). The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**. 38: 145-180.
- AZEVEDO, J.L. (1998). Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (eds). **Ecologia Microbiana**, Embrapa-CNPMA, Jaguariúna, pp.117-137.
- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. (2007) Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Gangui, B.N.; Deshmukh, S.K. (eds). **Fungi: multifaceted microbes**. Anamaya Publishers New Delhi and CRC Press, Boca Raton, pp 189-207.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr, W.; ARAÚJO, W.L. (2003). Importância dos microrganismos endofíticos na Agricultura. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 11: 333-371.
- AZEVEDO, J.L., MACCHERONI Jr, W; PEREIRA, J.O.; LUIZ DE ARAÚJO, W. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, 3: 40-65
- BAKER, G.C; SMITH, J.J.; COWAN, D.A. (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**, 55: 541-555.
- BERDOULAY, M.; SALVADO, J.C. (2009). Genetic characterization of microbial communities living at the surface of building Stones. **Applied Microbiology** 49: 311-316.
- BEHRENDT, A.U.; SCHUMANN, P. (2001). Description of *Microbacterium foliorum* sp. nov. and *Microbacterium phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of grasses and the surface litter after mulching the sward, and reclassification of *Aureobacterium resistens* (Funke *et al.* 1998) as *Microbacterium resistens* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 51, 1267-1276.
- BONOMI, H.R.; POSADAS, D.M.; PARIS, G.; CARRICA, M.D.C.; FREDERICKSON, M.; PIETRASANTA, L.I.; BOGOMOLNI, R.A.; ZORREGUIETA, A.; GOLDBAUM, F.A. (2012).

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Lights regulates attachment, exopolysaccharide production, and nodulation in *Rhizobium leguminosarum* through a LOV-histidine kinase photoreceptor. **PNAS**, 109: 12135-12140

BORNEMAN, J. (1999). Culture-independent identification of microorganisms that respond to specified stimuli. **Appl. Environ. Microbiol.** 65:3398-3400.

BOTTA, S. M. (1976). Sobre las trampas y las víctimas o presas de algunas espécies argentinas del género *Utricularia*. **Darwiniana** 20:127-154.

COHN, F. (1875). Ueber die Function der Blasen von *Aldrovanda* und *Utricularia*. **Beitr Biol Pfl** 3: 71-92.

COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. (2008). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, 37

CORRÊA, M. A.; MAMEDE, M. C. H. (2002). **Lentibulariaceae**. São Paulo, Instituto de Botânica

COVENEY, M.F; WETZEL, R.G. (1995). Biomass, production and specific growth rate of bacterioplankton and coupling to phytoplankton in an oligotrophic lake. **Limnol. Oceanogr.** 40, 1187-1200.

CURTIS, T. P., SLOAN, W. T., SCANNELL, J. W. (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.** 99, 10494–10499

DAHLLOF, I. (2002). Molecular community analysis of microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology**, 13: 213-217.

DARWIN, C. (1875). **Insectivorous plants**. John Murray, Londres.

DEBROAS, D.; LEFRANC, M.; THÉNOT, A.; LEPÈRE, C. (2005). Genetic Diversity of Small Eukaryotes in Lakes Differing by Their Trophic Status. **Applied and Environmental Microbiology** 71: 5935-5942.

DÍAZ-OLARTE, J.; VALOYES-VALOIS, V.; GUISANDE, C.; TORRES, N.N.; GONZÁLEZ-BERMÚDEZ, A.; SANABRIA-ARANDA, L.; HERNÁNDEZ, A.M.M.; DUQUE, S.R.; MARCIALES, L.J.; NUÑEZ-AVELLANEDA, M. (2007). Periphyton and phytoplankton associated with the tropical carnivorous plant *Utricularia foliosa*. *Aquatic Botany*, 87: 285-291.

ELLISON, A. M.; GOTELLI, N.J. (2001). Evolutionary ecology of carnivorous plants. **Trends in Ecology and Evolution**, 16: 623-629

FERREIRA, A.J. (2011). **Diversidade e Estrutura da Comunidade Bacteriana Associada às Armadilhas da Planta Carnívora *Utricularia gibba* (LENTIBULARIACEAE) e ao Ambiente Aquático**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

GORDON, E.; PACHECO, S. (2007). Prey composition in the carnivorous plants *Utricularia inflata* and *U. gibba* (Lentibulariaceae) from Paria Peninsula, Venezuela. **Revista de Biologia Tropical**, 55 (3-4): 795-803.

HEGNER, R. W. (1926). The interrelations of protozoa and the utricles of *Utricularia*. **Bio Bull** 50: 239-270

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. (1998). Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, 180(18): 4765-4774

IORIS, R.M.(2008). **Construção e triagem de uma biblioteca metagenômica de solo da Floresta Atlântica Paranaense**. Dissertação de mestrado.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. (1999). **Plant Systematics. A Phylogenetic Approach**. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

JUNIPER, B.E.; ROBINS, R.J.; et al. (1989). **The Carnivorous Plants**. San Diego, Academic Press Limited.

KOOPMAN, M.M.; FUSELIER, D.M.; HIRD, S.; CARSTENS, B.C. (2010). The carnivorous Pale Pitcher Plant harbors diverse, distinct and temporally dependent bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, 76: 1851–1860.

KRIEGER, J.R.; KOURTEV, P.S. (2012). Bacterial diversity in three distinct sub-habitats within the pitchers of the northern pitcher plant, *Sarracenia purpurea*. **FEMS Microbiol. Ecol.**, 79: 555-567

KUNIN, V.; COPELAND, A.; LAPIDUS, A.; MAVROMATIS, K.; HUGENHOLTZ, P. (2008). A bioinformatician's guide to metagenomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 72: 557-578.

LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, E.E.; CURY, J.C.; BÜLL, R.C.; RODRIGUES, R.R. (2006). Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest. **Science**, 312: 1917.

LI, L.; JIA, R.; LIU, Y.; ZHANG, H. (2011). Detection of Microcystin-Producing Cyanobacteria in Reservoir by Whole Cell Quantitative PCR. **Environmental Sciences**. 10: 2272-2279

LIMA, F.R. Caracterização da diversidade bacteriana associada à planta carnívora *Utricularia breviscapa* (LENTIBULARIACEAE) (2011). XIV Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes. In: **Anais do Congresso**.

LLOYD, F. E. (1942). **The Carnivorou Plants**. New York, Ronald Press.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W.E. *et al.* (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, 437: 376–380.

METTE, N.; WILBERT, N.; BARTHLOTT, W. (2000) Food composition of aquatic bladderworts (*Utricularia*, Lentibulariaceae) in various habitats. **Beitr. Biol. Pfl.**, 72:1-13

MCINROY, J. A. & KLOEPPER, J. W. (1995). Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant Soil**. 173: 337-342

MEYER, F.; PAARMANN, D.; SOUZA, M.D.; OLSON, R.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R.A. (2008). The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, 9:386.

MISAGUI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. (1990) Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, 80: 808-811.

NADAL, L.R.M.; NADAL, S.R. (2011). Intestinal spirochetosis. **J. Coloproctol**. 31: 405-407

NASCIMENTO, A.L.T.O.; KO, A.I.; MARTINS, E.A.L.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; HO, P.L.; HAAKE, D.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, R.A.; HARTSKEERL, R.A.; MARQUES, M.V.; OLIVEIRA, M.C.; MENCK, C.F.M.; LEITE, L.C.C.; CARRER, H.; COUTINHO, L.L.; DEGRAVE, W.M.; DELLAGOSTIN, O.A.; EL-DORRY, H.; FERRO, E.S.; FERRO, M.I.T.; FURLAN, L.R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E.A.; GÓES-NETO, A.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H.S.; HARAKAVA, R.; JERÔNIMO, S.M.B.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M.; KIMURA, E.T.; KURAMAE, E.E.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; MARINO, C.L.; NUNES, L.R.; OLIVEIRA, R.C.; PEREIRA, G.G.; REIS, M.S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W.J.; SOMMER, P.; TSAI, S.M.; SIMPSON, J.G.; FERRO, J.A.; CAMARGO, L.E.A.; KITAJIMA, J.P.; SETUBAL, J.C.; VAN SLUYS, A. (2004). Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* Serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, 186: 2164-2172

OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. (2006). Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Multiciência**, 7: 1-18.

PACE, N.R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, 276: 734-40

PEROUTKA, M., ADLASSNIG, W., VOLGGER, M., LENDL, T., URL, W.G., LICHTSCHEIDL, I.K. (2008). *Utricularia*: a vegetarian carnivorous plant? **Plant Ecol**. 199:153-162

PINI, F.; GALARDINI, M.; BAZZICALUPO, M.; MENGONI, A. (2011). Plant-bacteria association and symbiosis: are there common genomic traits in *Alphaproteobacteria*?. **Genes**, 2: 1017-1032

RAPPE, M. S. & GIOVANNONI, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. **Annu. Microbiology Reviews**. 57:369-394.

ROBINS, R. J.; JUNIPER, B.E. (1980). The secretory cycle of *Dionaea muscipula*. IV. The enzymology of the secretion. **New Phytologist**, 86: 401-412.

RONDON, M. R., GOODMAN, R. M., HANDELSMAN, J. (1999) The Earth's bounty : assessing and accessing soil microbial diversity. **Trends Biotechnol** 17, 403-9.

ROSSELLÓ-MORA R., AMANN R. (2001). The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews** 25: 39-67.

SANGUIN, H.; HERRERA, A.; OGER-DESFEUX, C., DECHESNE, A.; SIMONET, P.; NAVARRO, E.; VOGEL, T.M.; MOENNE-LOCCOZ, Y.; NESME, X.; GRUNDMANN, G.L (2006). Development and validation of a prototype 16S rRNA-based taxonomic microarray for Alphaproteobacteria. **Environmental Microbiology**, 8 (2): 289-307

SANTOS, F.C.S. **Análise da diversidade genética de bactérias associadas as plantas carnívoras de *U. Foliosa*, *U. Subulata*, *U. Meyeri* (LENTIBULARIACEAE).** (2011). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Mogi das Cruzes.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. **Curr Opin Biotechnol** 14, 303-10.

SCHUMACHER, G.J. (1960). Further notes on the occurrence of desmids in *Utricularia bladders*. **Castanea** 25:62-65

SILVA-MACENA, T.N.; AMORIM, J.H.; LACERDA-JR, G.V.; DIAS, J.C.T.; REZENDE, R.P.; CASCARDO, J.C.M.(2007). Desenvolvimento de uma Metodologia de Extração de DNA de alto peso molecular de solos com altos teores de matéria orgânica. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil. 2007, Caxambu. **Anais do Congresso**.

SIROVÁ, D., BOROVEC, J., CERNÁ, B., REJMÁNKOVÁ, E., ADAMEC, L., VRBA, J. (2009) Microbial community development in the traps of aquatic *Utricularia* species. **Aquatic Botany** : 90, 129-136

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S.; VAN DEN BROEK, J.; WERNARS, K. (2001). Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**: 67:2284-2291.

STURZ, A.V.; NOWAK, J. (2000). Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil and Ecology**, 15: 183-190.

TAGLIAFERRO, A.C. (2005). **Análise Molecular da Diversidade bacteriana de solos do Cerrado utilizando bibliotecas de rDNA 16S- Uma perspectiva biotecnológica.** Dissertação de mestrado.

TAYLOR, P. (1989). **The genus *Utricularia*: a taxonomic monograph**. London, Royal Botanic Gardens, Kew.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T.F. (2002). Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, 296(5570):1064-1066.

TORSVIK, V.; SALTE, K.; SORHEIM, R.; GOKSOYR, J. (1990) Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. 56, 776-781

WHITMAN, W. B., COLEMAN, D. C. E WIEBE, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 95, 6578–6583.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. (1987). **Microbiology Reviews**, 51:221–271.

YOUSSEF, N., SHEIK, C.S.; KRUMHOLZ, L.R.; NAJAR, F.Z.; ROE, B.A.; ELSHAHED, M.S. (2009). Comparison os species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. **Appl. Environ. Microbiol.**, 75: 5227-5236.