

UFRRJ

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

TESE

**Estudo da Microbiota Bacteriana Endofítica de
Cana-de-açúcar por Métodos Independentes de Cultivo:
Diversidade, Perfil Taxonômico e Predição de Funções de
Interesse Biotecnológico**

Carlos Magno dos Santos

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E
INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

**ESTUDO DA MICROBIOTA BACTERIANA ENDOFÍTICA DE CANA-
DE-AÇÚCAR POR MÉTODOS INDEPENDENTES DE CULTIVO:
DIVERSIDADE, PERFIL TAXONÔMICO E PREDIÇÃO DE FUNÇÕES
DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO**

CARLOS MAGNO DOS SANTOS

Sob a Orientação do Pesquisador

Stefan Schwab

e Coorientação do Pesquisador

José Ivo Baldani

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Área de Concentração em Agrobiologia

Seropédica, RJ
Fevereiro, 2018

S237e Santos, Carlos Magno dos, 1990-
Estudo da microbiota bacteriana endofítica de cana de-açúcar por métodos independentes de cultivo: diversidade, perfil taxonômico e predição de funções de interesse biotecnológico / Carlos Magno dos Santos Santos. - 2018.
131 f.: il.

Orientador: Stefan Schwab.
Coorientador: José Ivo Baldani.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, 2018.

1. Enriquecimento celular. 2. Independente de cultivo. 3. Líquido do apoplasto. 4. Colmo. 5. Sphingomonas. I. Schwab, Stefan, 1975-, orient. II. Baldani, José Ivo, 1953-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária. IV. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
EM AGROPECUÁRIA**

CARLOS MAGNO DOS SANTOS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor** no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, área de Concentração em Agrobiologia

TESE APROVADA EM 28/2/2018

Stefan Schwab. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

Irene da Silva Coelho. Dr^a. UFRRJ

Luc Felicianus Marie Rouws. Dr. Embrapa Agrobiologia

Marcelo de Freitas Lima. Dr. UFRRJ

Sandy Sampaio Videira. Dr^a. UNIFOA

*Dedico esse trabalho à minha eterna companheira Dani,
Sábia e paciente,
que esteve ao meu lado durante todo esse percurso.
Haja paciência!!*

*Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar
para atravessar o rio da vida - ninguém, exceto tu, só tu.
Existem, por certo, atalhos sem números,
e pontes, e semideuses que se oferecerão para levar-te além do rio;
mas isso te custaria a tua própria pessoa; tu te hipotecarias e te perderias.
Existe no mundo um único caminho por onde só tu podes passar.
Onde leva? Não perguntes, segue-o!*

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

A minha família, por entender a minha ausência nesses últimos anos e por todo apoio. Vocês são o início disso que vos apresento!

A família Villarinho Pessoa, obrigado por me receberem e ‘adotar’ como um filho. Este trabalho também é vosso mérito!

A minha noiva Daniella, por todo apoio, paciência e colaboração direcionada a este trabalho e por estar ao meu lado em todos os períodos bons e ruins. Sem você não teria chegado tão longe!

Ao meu orientador Stefan Schwab e coorientadores José Ivo Baldani e Marcia S. Vidal, por toda atenção e dedicação para que este trabalho tivesse êxito, e todos os ensinamentos.

A UFRRJ e em especial ao meu programa de pós-graduação, agradeço por serem pacientes aos meus questionamentos! Vocês são sensacionais!

A equipe de pesquisadores, analistas e alunos do Laboratório de Genética e Bioquímica. Muito obrigado por toda colaboração direta e indiretamente dedicada por todos para a concretização desta Tese.

A Fernanda (Embrapa Agrobiologia) pelo apoio no sequenciamento Sanger.

Aos colaboradores pelo apoio no sequenciamento da UFPR.

A CAPES, pelas bolsas concedidas durante a minha Tese. A prof^a. Veronica Reis, coordenadora do projeto na qual foi inserido a minha bolsa.

A Embrapa por todo o recurso e a infraestrutura proporcionada neste período.

Aos membros da banca, na qual expressei minha admiração e respeito.

E a todos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Carlos Magno dos Santos nasceu aos 09 dias do mês de março de 1990, no município do Rio de Janeiro, no estado do Rio de Janeiro, bairro Santa Cruz. Filho de José Carlos dos Santos e Marlene Cassiano dos Santos. Em 2007, concluiu o ensino médio concomitante com o curso de Técnico em Informática no Colégio Apollo 12 (Filial). Em 2010, ingressou no curso de Tecnologia em Biotecnologia no Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO). No ano de 2011 trabalho como professor de Química e Biologia no Curso preparatório Verônica (CRV). Em 2012 foi bolsista de iniciação científica da FAPERJ na Embrapa Agrobiologia (CNPAB), no Laboratório de Genética e Bioquímica, sob a orientação do Dr. Stefan Schwab. Em 2013, obteve a titulação de Tecnólogo em Biotecnologia (UEZO). Em março de 2014, iniciou o curso de Doutorado na UFRRJ, junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária, área de concentração em Agrobiologia, desenvolvendo sua tese na Embrapa Agrobiologia (CNPAB), sob orientação do Dr. Stefan Schwab.

RESUMO GERAL

DOS-SANTOS, Carlos Magno. **Estudo da microbiota bacteriana endofítica de cana-de-açúcar por métodos independentes de cultivo: diversidade, perfil taxonômico e predição de funções de interesse biotecnológico**. 2018. 131f. Tese (Doutorando em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária). Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

A comunidade bacteriana endofítica é descrita como aquela capaz de colonizar os tecidos internos das plantas sem causar aparente prejuízo, proporcionando a seus hospedeiros benefícios para o seu desenvolvimento e proteção contra patógenos. Alguns desses mecanismos permanecem pouco compreendidos, principalmente devido ao baixo número de células bacterianas endofíticas em comparação com a planta e dificuldades em acessar o conteúdo genético dessa comunidade. Na cana-de-açúcar os estudos sobre esta comunidade foram focados principalmente na identificação de microrganismos diazotróficos. De uma forma geral, trabalhos que visaram descrever esta comunidade foram baseados em metodologias que utilizavam o isolamento dos microrganismos por cultivo. Hoje é sabido que, devido à baixa profundidade e cobertura desta metodologia, pode limitar o acesso a estes microrganismos. A introdução de abordagens independentes de cultivos tem permitido uma análise mais ampla desta comunidade e contribuindo para a compreensão do papel ecológico destes microrganismos na endosfera de seus hospedeiros. O presente trabalho utilizou duas abordagens independentes de cultivo para acessar a comunidade bacteriana na cana-de-açúcar. A primeira foi desenvolvida uma metodologia de enriquecimento das células bacterianas endofíticas a partir dos tecidos de colmo de cana-de-açúcar. Esta abordagem foi baseada em um método de enriquecimento físico e não direcionado, que ajudou a contornar o alto nível de interferentes, como polissacarídeos, compostos fenólicos, nucleases e fibras. A segunda abordagem envolveu o uso do líquido do apoplasto de colmo da cana-de-açúcar. Este nicho tem sido descrito como o principal sítio de colonização pelos endófitos. A comunidade encontrada é rica e diversa, sendo formada por gêneros pertencentes ao grupo das Proteobactérias. Uma das principais Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) observadas nas análises foram classificadas como sendo do gênero *Sphingomonas*. A diversidade deste gênero em cana-de-açúcar também foi avaliada neste estudo, e possivelmente há a presença de novas espécies. Foi possível detectar também a presença de bactérias promotoras de crescimento vegetal, diazotróficas e patógenos-antagonistas. Por meio de uma análise preditiva dos possíveis genes relacionados as principais OTUs detectadas foi possível encontrar genes de interesse biotecnológico, aplicáveis em diversas áreas, sendo os principais envolvidos à biorremediação e o melhoramento do cultivo vegetal. Dessa forma, o presente estudo traz informações relevantes ao entendimento da comunidade bacteriana endofítica de cana-de-açúcar e suas funções.

Palavras-chaves: Enriquecimento celular. Independente de cultivo. Líquido do apoplasto. Colmo. *Sphingomonas*.

GENERAL ABSTRACT

DOS-SANTOS, Carlos Magno. **Study of endophytic bacterial microbiota of sugarcane by cultivation-independent methods: diversity, taxonomic profile and prediction of biotechnological interest functions.** 2018. 131p. Thesis (Doctorate in Science, Technology and Innovation in Agriculture). Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

The endophytic bacterial community is described as the one able to colonize the internal tissues of the plants without causing apparent prejudice, providing for their hosts development benefits and protection against pathogens. Some of these mechanisms remain little understood, mainly due to the low number of endophytic bacterial cells compared to the plant, and difficulties in accessing the genetic content of that community. On sugarcane, studies about this community were focused mainly on the identification of diazotrophs microorganisms. Generally, works that sought to describe this community were based on methodologies that used the isolation of microorganisms for cultivation. Today it is known that, due to the low depth and coverage of this methodology, can limit the access to these microorganisms. The introduction of culture-independent approaches has allowed a broader analysis of this community and contributing to the understanding of the ecological role of these microorganisms in endosphere of their hosts. The present study used two culture-independent approaches to access the bacterial community on sugarcane. The first was developed a methodology for enrichment of endophytic bacterial cells from the stem tissue of sugarcane. This approach was based on a method of physical enrichment and not biased, that helped surpassing the high level of interfering, as polysaccharides, phenolic compounds, nucleases and fibres. The second approach involved the use of apoplast sap from sugarcane stems. This niche has been described as the main site of colonization by endophytes. The found community is rich and diverse, formed by genera belonging to the Proteobacterias group. One of the main Operational Taxonomic Units (OTUs) observed in the analyses were classified as being of the *Sphingomonas* genus. The diversity of this genus in sugarcane was also evaluated in this study, and possibly, there are new species present. It was also possible to detect the presence of plant growth promoting bacteria, diazotrophic and pathogens-antagonists. Through predictive analysis of possible genes related to the main OTUs detected, was possible find genes of biotechnological interest, applicable in various areas, the main ones being involved to bioremediation and the improvement of plant cultivation. Thus, this study provides information relevant for understanding the endophytic bacterial community of sugarcane and its functions.

Keywords: Cell Enrichment. Culture-independent. Stem apoplast sap. *Sphingomonas*.

RESUMEN AMPLIADO

DOS-SANTOS, Carlos Magno. **Estudio de la microbiota bacteriana endofítica de caña de azúcar por métodos independientes de cultivo: diversidad, perfil taxonómico y predicción de funciones de interés biotecnológico**. 2018. 131f. Tesis (Doctorado en Ciencia, Tecnología e Innovación en Agropecuaria). Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

1. Introducción

La cultura de caña de azúcar actualmente es una de las más importantes en términos de productividad en Brasil, y se estima una producción de 646,4 millones de toneladas caña de azúcar para la cosecha 2017/18 (CONAB, 2017), con un valor bruto de producción de 74 mil millones de reales para el año 2017 (MAPA, 2017). Los datos estadísticos de FAOSTAT (2013) indican que en la media de la producción de las cinco mayores cultivos en el período de 1961 a 2012, esta cultura es la más producida en Brasil (unos 270 millones de toneladas), haciendo de Brasil el mayor productor mundial.

Las plantas representan un excelente ecosistema para microorganismos, y ésta puede interactuar con diferentes comunidades microbianas como bacterias, archaea, hongos y protistas (HARDOIM et al., 2015, MONTESINOS et al., 2002). Las interacciones planta-microorganismos pueden ser clasificadas informalmente como interacciones compatibles (microorganismos benéficos) e incompatibles (patógenos) (LI et al., 2013). En este microorganismo benéfico o patogénico, dilucidar la especificidad de esta interacción puede traer informaciones importantes para la biotecnología, como por ejemplo el desarrollo de biopesticidas a partir de la estimulación de mecanismos de defensa de la planta con la inoculación de bacterias y biofertilizantes a través de la promoción del crecimiento vegetal (XIAO, 2012, MONTESINOS et al., 2002).

Las bacterias endofíticas pueden definirse como bacterias que son capaces de colonizar los tejidos internos de las plantas no demostrando una señal externa de infección o de efecto negativo en estos tejidos (SCHULZ; BOYLE, 2006; HOLLIDAY, 1989). Según STROBEL et al. (2004), entre las 300.000 especies de plantas, cada una es anfitriona de uno o más endófitos, pero sólo algunas de esas plantas han sido completamente estudiadas su relativa microbiota endofítica (RYAN et al., 2008). BERG y colaboradores en 2005 definieron que las bacterias endofíticas representan un nicho ecológico similar al del fitopatógenos, lo que las hace susceptibles a los agentes de biocontrol. Los estudios con microorganismos asociados a las plantas se basan tradicionalmente en aislamiento por cultivo. Sin embargo, las técnicas de cultivo consumen mucho tiempo, labor y la gran mayoría de bacterias no puede ser obtenida como cultivo puro; y que la diversidad de organismos cultivables no es bien evaluada, ya que un gran número de medios y condiciones de cultivo debe ser utilizado para evaluar la diversidad de un determinado nicho (MAGNANI, 2005). Otra limitación es el hecho de que aún existen microorganismos que no son cultivables (REINHOLD-HUREK, HUREK, 2011).

Con base en este contexto, hipótesis de mi trabajo es que la microbiota endofítica "no cultivable" asociada a la caña de azúcar presenta potencial como fuente de recursos genéticos, con aplicaciones en nutrición vegetal, fitosanidad y biotecnología.

De modo, el objetivo general de este presente estudio fue investigar las funciones útiles relacionadas con la interacción bacteriana-caña de azúcar a través del estudio metagenómico de la microbiota endofítica.

La metodología general fue de iniciador elaborar un protocolo de enriquecimiento de las bacterias endofíticas, permitiendo la disminución del material genético de la planta hospedadora sin que hubiera una pérdida significativa del contenido genético bacteriano. Por lo tanto, a través del material metagenómico obtenido con este protocolo, se obtuvo un perfil taxonómico de la comunidad bacteriana presente en las muestras de colmo, comparando con los datos de la literatura para la validación de este protocolo.

De acuerdo con el perfil obtenido, se realizó un análisis *in silico* predictivo, buscando identificar posibles funciones útiles en el mejoramiento del cultivo de la caña de azúcar presentes en la comunidad bacteriana identificada. Se identificó una fuerte presencia de OTUs relacionadas con el género *Sphingomonas*, indicando que este género podría estar ejerciendo en la caña de azúcar un importante papel para en su desarrollo. De este modo, se realizó la identificación de especies de este género por medio de metodología dependiente de cultivo, con la finalidad de explorar las posibles funciones de los aislados en ensayos *in vitro*.

Para una mejor comprensión de los datos obtenidos, la tesis se dividió en capítulos, que se contextualizan con una breve introducción, abordando los principales temas relacionados con cada análisis.

2. Material y Métodos

El Capítulo I consistió en elaborar un enfoque de enriquecimiento celular bacteriano endofítico a partir de muestras de colmo de caña de azúcar de la variedad RB867515, basándose en otras metodologías ya descritas (SESSITSCH et al., 2012, IKEDA et al. Y en el caso de las mujeres. Evaluar este enriquecimiento por ARDRA (SCHWAB et al., 2014) y PCR (SUN et al., 2007); secuenciación de los genes 16S rRNA y análisis taxonómico utilizando el software Mothur.

El Capítulo II buscó analizar el perfil taxonómico de bacterias presentes en el líquido del apoplasto de caña de azúcar. Se utilizaron las variedades RB867515 y RB92579. El líquido del apoplasto fue extraído utilizando protocolo propuesto por DONG et al., 1994. Los genes 16S rRNA fueron secuenciados utilizando la misma metodología del Capítulo I y analizado utilizando el software Mothur.

En el Capítulo III se realizó el análisis predictivo de los posibles genes presentes en las muestras de colmo de caña de azúcar estudiadas en este trabajo. Para ello se seleccionaron las 20 principales OTU de cada Capítulo, reclasificadas en el QIIME y las predicciones en el Tax4Fun.

En el Capítulo IV ocurrió la evaluación de la diversidad del género *Sphingomonas* presente en el líquido del apoplasto de caña de azúcar. Para ello se utilizaron las variedades RB867515 e IACSP5000. El líquido del apoplasto fue extraído según lo descrito por DONG et al. Y se sembró en los medios DYGS, JMV y L9, suplementados con los antibióticos: cicloheximida, piperacilina y estreptomina. Se seleccionaron las colonias con coloración amarillo / naranja y secuenciados sus genes 16S rRNA para el análisis taxonómico.

3. Resultados y Discusión

El procedimiento de enriquecimiento demostró baja presencia de DNA vegetal en las muestras conforme a los resultados de ARDRA y PCR, permitiendo que fuera posible detectar un alto número de secuencia de DNA bacteriano en los demás análisis de la microbiota. En este trabajo se detectó la prevalencia de Proteobacterias en todas las muestras y, entre ellas, las bacterias que pueden contribuir a la fijación biológica del nitrógeno en la caña de azúcar, como se ha señalado anteriormente (FISCHER et al., 2012). Los datos del presente trabajo, junto con los de la literatura, permitieron la identificación de un grupo de géneros de bacterias

endofíticas más citado. En comparación con la composición de este grupo con las OTU detectadas en el presente trabajo, es posible observar que 23 OTU, pertenecientes a 12 géneros, están incluidos en el grupo de géneros más citados (correspondiendo a los 16% del número total de OTU detectados en este trabajo). Os 12 géneros han sido *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bosea*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Novosphingobium*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* e *Stenotrophomonas*. Es interesante notar que todos os géneros dese grupo también son encontrados na endosfera do colmo de otras plantas de *Poaceae*, como arroz (SUN et al., 2008; IKEDA et al., 2010), sorgo (MAREQUE et al., 2014; MAROPOLA; RAMOND; TRINDADE, 2015), maíz (CHELIUS; TRIPLETT, 2001; ROESCH et al., 2008) e trigo (CONN; FRANCO, 2004; ROBINSON et al., 2016). Estos resultados indican un posible patrón de la endosfera entre la familia Poaceae.

La diversidad de las bacterias endofíticas que habitan el apoplasto de caña de azúcar todavía es recalcitrante porque son pocos trabajos disponibles y estos se han enfocado principalmente en la detección de diazotrofos en este sitio y utilizando enfoques dependientes de cultivo. La densidad de las células diazotróficas presentes en las muestras de líquido del apoplasto de caña de azúcar se describió en el orden de 10^2 a 10^8 células mL⁻¹ (ASIS JÚNIOR et al., 2003). En comparación con el número de *reads* bacterianos obtenidos en el secuenciamiento de los genes 16S rRNA en este presente trabajo, considerando que cada read representó una célula y se utilizaron 50 mL de líquido del apoplasto para cada extracción de ADN, después de la remoción de secuencias de cloroplasto, mitocondria y mitocondria normalización para cada muestra resultó en ~ 24.900 *reads*, lo que resultaría en 102 células mL⁻¹. En el caso de las células vegetales (como los protoplastos / cloroplastos o mitocondrias), no se consideró la presencia de células vegetales (como protoplastos / cloroplastos o mitocondrias), lo que llevaría a sobreestimar este número de células por ml de líquido de apoyo. VELÁZQUEZ et al., (2008) después del análisis taxonómico reveló la presencia de los géneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Rhizobium*, *Kocuria*, *Staphylococcus* y *Xanthomonas*. En comparación con las muestras utilizadas en este trabajo, se detectaron: 155 OTU de *Acinetobacter* en total (~ 3,0% del número total de OTU detectados); *Bacillus* fueron 7 OTUs (0,1% del total); *Comamonas* 2 OTUs; *Gluconacetobacter* 4 OTUs; *Microbacterium* 2 OTUs; *Micrococcus* 1 OTU; *Rhizobium* 10 OTU (0,2%); *Kocuria* 1 OTU; *Staphylococcus* 7 OTUs y *Xanthomonas* 42 OTUs (0,8%).

En el presente trabajo se utilizó este enfoque para la selección de especies de *Sphingomonas*, siguiendo características de morfología de colonia y utilizando medios (rico y mínimos) suplementado con antibióticos en los que el género es resistente. Este enfoque se utilizó principalmente en muestras ambientales, en la que los autores lograron reducir el número de células no objetivo en sus aislamientos (VANBROEKHOVEN et al., 2004; YIM et al., 2010). Para el género *Sphingomonas* se ha descrito como principal fuente de carbono la glucosa y pH óptimo de crecimiento de 7,0 (GLAESER, KÄMPFER, 2014), entre los aislados obtenidos en este presente estudio, demostraron la capacidad de asimilar el manitol como fuente de carbono (medio JMV) y tolerantes a pH <7,0 (5,4 en el medio JMV y 6,0 en el DYGS), indicando nuevamente que estos aislados sobrevivirían las condiciones del apoplón, en la cual posee pH de ~ 5,5 (SATTELMACHER, 2001). Los aislados tuvieron similitud, principalmente, con las estratificaciones *S. polyaromaticivorans* B2-7, *S. paucimobilis* NBRC 13935 y *S. abaci* C42. También se verificó la presencia de potenciales nuevas especies.

4. Conclusiones

- ✓ Los resultados obtenidos representan avance en la comprensión de la comunidad bacteriana endófitos de caña de azúcar, gracias a la utilización de técnicas independientes del cultivo y secuenciación de nueva generación.
- ✓ Los resultados obtenidos en la secuenciación utilizando el enfoque de enriquecimiento bacteriano demostraron una comunidad rica y diversa, que contiene géneros ya registrados en otros trabajos con caña de azúcar y hasta géneros nunca antes descrito, lo que indica que la enriquecimiento no interfirió significativamente en la composición de la comunidad.
- ✓ Secuenciación de bacterias presentes en el líquido del apoplasto demostró una comunidad diversa, siendo posible detectar la presencia de géneros ya registrados en caña de azúcar, no antes de géneros reportados y hasta que no se puede clasificar con el metodología de clasificación utilizada.
- ✓ La predicción de los genes de las comunidades estudiadas en este trabajo reveló la presencia de funciones de interés agropecuario y biorremediación, entre estos se encuentran genes relacionados con el ciclo del nitrógeno (como FBN y desnitrificación) y la síntesis de flavonoides (como por ejemplo, Naringenina).
- ✓ La diversidad de las bacterias de *Sphingomonas* género (uno de los más frecuentes en ambos el análisis taxonómico de este presente estudio OTUs) evaluados en este estudio, indica la presencia de posibles nuevas especies, en la que se evaluará en el futuro a su exploración en la aplicación de nuevas entradas en el cultivo de caña de azúcar.
- ✓ Así, el presente trabajo trajo información relevante y las innovaciones que se pueden aplicar en la agricultura a través de futuros estudios basados en las funciones descritas, poniendo avances en técnicas para el cultivo de caña de azúcar e incluso otras plantas.

Palabras clave: Enriquecimiento celular. Independiente del cultivo. Líquido del apoplasto. *Sphingomonas*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição das amostras de DNA metagenômico de bactérias endofíticas obtidas neste trabalho.....	23
Tabela 2: Análise quantitativa por espectrofotometria e fluorimetria das amostras de DNA metagenômico	31
Tabela 3: Similaridade das sequencias de 16S rRNA de mitocôndria ao banco de dados “nr” do NCBI.	33
Tabela 4: Índices estimados de riqueza e diversidade para cada amostra metagenômica.....	33
Tabela 5: Porcentagem de sequencias após a normalização.	34
Tabela 6: Análise quantitativa por espectrofotometria e fluorimetria das amostras de DNA total do líquido do apoplasto	47
Tabela 7: Índices estimados de riqueza e diversidade para cada amostra das variedades estudadas	50
Tabela 8: Organização distribuição das amostras utilizadas para a predição de funções gênicas.....	59
Tabela 9: Relação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de cada variedade de cana-de-açúcar dos meios utilizados no trabalho	77
Tabela 10: Distribuição dos isolados de cada variedade nos grupos formados na BOX-PCR.	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Teste de verificação da desinfestação superficial.	29
Figura 2: Número total de células de bactéria repórter durante os passos de enriquecimento. Etapas: ‘i’ homogeneização do tecido; ‘ii’ centrifugação a 1.000 x g; ‘iii’ filtrações; ‘iv’ lise das organelas/lavagens; ‘v’ remoção do DNA vegetal/tratamento com nucleases.....	30
Figura 3: Colônias obtidas com a semeadura do material enriquecido. ‘a’ Não diluída; ‘b’, ‘c’, ‘d’ diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . ‘a’ e ‘b’ são sem bactéria repórter, ‘c’ e ‘d’ com bactéria repórter.....	30
Figura 4: Micrografias do material enriquecido. ‘a’ e ‘b’ teste de Gram. ‘c’ e ‘d’ microscopia de contraste de fase. ‘a’ e ‘b’ representam a amostra enriquecida sem a bactéria repórter e ‘c’ e ‘d’ contém a presença da bactéria repórter. As setas indicam estruturas bacterianas. Barras de escalas: 10 μ m.	30
Figura 5: Perfis moleculares do material enriquecido. ‘a’ Perfil de ARDRA após a amplificação com os iniciadores 27f e Amp2 e digestão com <i>Nsi</i> I. ‘b’ Perfil de amplificação do gene 16S rRNA utilizando os iniciadores 799f e 1492r. Setas pontilhadas indica o perfil de bactérias e as tracejadas indicam o perfil de planta (mitocôndria e cloroplasto). 1, 2 e 3 correspondem ao DNA metagenômico de bactérias endofíticas enriquecidos da base de colmo de cana-de-açúcar (sem a bactéria repórter). 4 e 5 DNA total de cana-de-açúcar de amostras de folhas e colmo, utilizando o protocolo original de Virupakshi e Naik et al., 2007. 6-12 controles bacterianos (estirpe Ppe8 de <i>Burkholderia tropica</i> , DH10B de <i>Escherichia coli</i> , PAL5 de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> , HRC54 de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> , <i>Bacillus</i> spp., e <i>Nocardioides</i> spp). E ‘C’ branco da PCR. M marcador 1 kb Plus (Invitrogen).....	32
Figura 6: Curva de rarefação das amostras normalizadas calculada com 3 % de dissimilaridade. CI = Intervalo de confiança.....	34
Figura 7: Diversidade de filós dos OTUs detectados nas amostras A1, A2 e A3. ‘a’ Proteobacteria. ‘b’ Subdivisões de Proteobacteria. ‘c’ Outros Filós.....	35
Figura 8: Perfis moleculares dos produtos da amplificação com os iniciadores 799F-1492R para verificar a presença do DNA bacteriano nas amostras de DNA total. As setas pontilhadas indicam o perfil de bactérias e as tracejadas o de planta (mitocôndria). 47	
Figura 9: Comparação da diversidade de OTUs pertencentes ao grupo Proteobacteria com os outros detectados nas amostras, de acordo com a sua abundância relativa.....	48
Figura 10: Composição das sub-divisões do grupo Proteobacteria detectadas para cada variedade, de acordo com a sua abundância relativa.....	49
Figura 11: Diversidade de filós das OTUs detectadas nas amostras de cada variedade, exceto o grupo Proteobacteria, baseado em sua abundância relativa.	49
Figura 12: Curvas de rarefação calculada com 3 % de dissimilaridade.....	49
Figura 13: Análise de Componentes Principais (PCA) das amostras das variedades RB82579 e RB867515.....	50
Figura 14: Comparação do número de famílias taxonômicas das variedades RB92579 e RB867515 e suas respectivas famílias compartilhadas.....	51
Figura 15: Visão geral do arquivo gerado para uso no Tax4Fun. A primeira coluna indica o número da OTU, a segunda, terceira e quarta representam o número de <i>reads</i> de cada	

	amostra para cada OTU e a última coluna a sua respectiva classificação taxonômica.	59
Figura 16:	Heat-map representando os genes descritos na análise preditiva de cada amostra e a relação entre amostras e variedades. Foi utilizado o método de distância Euclidiana e Ward para a formação dos clusteres (agrupamentos).	62
Figura 17:	Unidades funcionais (módulos) baseadas em anotação do banco de dados KEGG e sua respectiva abundancia por amostra.	63
Figura 18:	Destaque das principais funções de interesse biotecnológico presentes nas amostras e suas respectivas abundâncias.	64
Figura 19:	Aspecto das colônias formadas nos meios suplementados com antibióticos. Ambas figuras são de inóculos não diluídos. 1 e 2 meios DYGS, 3 e 4 meios JMV, 5 e 6 meios L9. 1, 3 e 5 são inóculos da variedade RB867515. 2, 4 e 6 variedades IACSP5000. As setas vermelhas indicam colônias típicas de <i>Sphingomonas</i>	78
Figura 20:	Resultado da PCR do gene <i>spt</i> para seleção dos isolados <i>Sphingomonas</i> -tipo. <i>M</i> padrão de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen), <i>C1</i> controle de <i>Sphingomonas</i> sp., <i>C2</i> controle negativo (branco). Os amplicons com resultado esperado (~300 pb) estão indicados com o símbolo positivo (+).	78
Figura 21:	Perfis de BOX-PCR dos isolados <i>spt</i> -positivos. Os códigos de isolamento representam primeiro o meio de isolamento (DYGS = DY, JMV = JM, L9 = L9), o tecido / material original (Apoplasto = AP), a variedade de cana-de-açúcar (RB867515 = RB, IACSP5000 = IAC), a data do estoque (44 = 4 de abril) e o número de cada isolado. A linha vermelha tracejada indica similaridade de ≥ 70 % entre os perfis.	80
Figura 22:	Árvore filogenética construída das sequências dos isolados em comparação às estirpes tipo mais similares de acordo com a classificação taxonômica do EzBioCloud. Foi utilizado o programa MEGA7, método Neighbor-Joining, com distância evolutiva calculada com o método Tamura 3-parameter, modelagem Gama e teste de bootstrap com 1000 repetições. As porcentagens do teste bootstrap estão representadas ao lado dos ramos e foram ocultados valores < 50 %. Em vermelho estão destacados os grupos formados na BOX-PCR e os demais isolados com similaridade menor que 70 % na BOX-PCR.	82

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxilato, 7, 11, 120, 121
- ARDRA: Análises de restrição do DNA ribossomal amplificado, xi, 26, 27, 31, 32, 33, 37
- ATP: Adenosina trifosfato, 15
- BIOM: Biological observation matrix, 59
- BLAST: Basic local alignment search tool, 59, 113
- BLASTn: Basic local alignment search tool nucleotide, 26, 27, 32, 33
- BSA: Albumina do soro bovino, 23
- COG: Clusters of orthologous groups, 60
- CTAB: Brometo de cetiltrimetilamônio, 25, 26
- DEPC: Dicarbonato de dietila, 24
- DMHF: 2,5-dimetil-4-hidroxi-2H-furan-3-one, 5
- DNA: Deoxyribonucleic acid, xi, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 40, 44, 45, 46, 47, 52, 65, 71, 74, 75
- dNTP: Desoxirribonucleotídeo Fosfatado, 15, 26, 74, 75
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético, 23, 24, 25, 45
- FBN: Fixação biológica de nitrogênio, 5, 7, 13, 14, 66, 86, 117, 118, 119, 120
- GenBank: Genetic sequence database, 32, 113
- GFP: Proteína verde fluorescente, 24, 25
- GSLs: Glicosíngolípídeos, 71, 73
- IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida, 27
- KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes, 60, 61, 63, 66
- LPS: Lipopolisacarídeos, 71, 73
- LPSN: List of prokaryotic names with standing in nomenclature, 73
- MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis ver. 7.0, 82
- MG-RAST: Metagenomics rapid annotation using subsystem technology, 14
- NCBI: National center for biotechnology information, 13, 26, 28, 31, 32, 33, 35, 65, 66, 75
- NGS: Next generation sequencing, 14
- OTU: Unidade taxonomica operacional, xi, xii, 28, 52, 53, 59, 60, 65, 66
- PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos, 4
- PCA: Análise de componentes principais, 50, 66
- PCR: Reação em cadeia da polimerase, xi, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 26, 27, 28, 31, 32, 36, 37, 45, 46, 47, 71, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 85
- PGPB: Plant growth-promoting bacteria, 4
- PHA: polihidroxialcanoatos, 8
- PICRUSt: Phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states, 65, 66
- PVP: Polivinilpirolidona, 23, 24
- QIIME: Quantitative insights into microbial ecology, xi, 59, 66
- rRNA: Ácido ribonucleico ribossomal, xi, xii, 9, 10, 22, 27, 28, 31, 32, 33, 36, 37, 38, 42, 44, 45, 46, 47, 52, 53, 56, 57, 58, 65, 66, 71, 75, 81, 83, 84, 86, 131
- SDS: Dodecil sulfato de sódio, 25, 45
- SRA: Sequence read archive, 33
- Tax4Fun: Taxonomy for functions), xi, 58, 59, 60, 61, 65, 66
- TRIS-HCl: Hidrocloroeto tris(hidroximetil)aminometano, 23, 24
- UFC: Unidade formadora de colônia, 53, 77
- UV: Ultra violeta, 26, 27, 45, 46, 67, 75
- X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo, 27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	Cana-de-açúcar: Aspectos Biológicos e Importância Econômica	3
2.2	Avanços no Estudo da Interação Planta-Microrganismo	4
2.3	Endófitos.....	5
2.3.1	Bactérias endofíticas: definição e diversidade.....	6
2.3.2	Potencial metabólico e biotecnológico de bactérias endofíticas	7
2.4	Metodologias de Estudos de Microrganismos Associados às Plantas	9
2.4.1	Metagenômica	9
2.4.2	Perspectivas e aplicações de genes e funções identificados em estudos metagenômicos.....	12
2.5	Metodologias de Sequenciamentos de “Nova-geração” (Next-Generation Sequencing).....	14
2.5.1	Tecnologias de 2º geração	15
2.5.2	Tecnologias de 3º geração	16
2.5.3	Tecnologias de 4º geração	17
3	CAPITULO I DESENVOLVIMENTO DE UMA ESTRATÉGIA INDEPENDENTE DE CULTIVO PARA ENRIQUECER CÉLULAS BACTERIANAS ENDOFÍTICAS DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR APLICÁVEL A ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS	19
3.1	RESUMO.....	20
3.2	ABSTRACT	21
3.3	INTRODUÇÃO	22
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.4.1	Material de estudo	23
3.4.2	Coleta e preparo das amostras biológicas.....	23
3.4.3	Preparo e aplicação da bactéria repórter.....	24
3.4.4	Enriquecimento celular das bactérias endofíticas.....	24
3.4.5	Análises microscópicas.....	25
3.4.6	Extração e avaliação do DNA bacteriano.....	25
3.4.7	Quantificação do DNA total por espectrofluorimetria e análise por eletroforese em gel de agarose não-desnaturante.....	25
3.4.8	Avaliação do enriquecimento celular bacteriano endofítico	26
3.4.9	Sequenciamento, em larga escala, dos genes 16S rRNA e análise de diversidade e riqueza da microbiota endofítica.....	28
3.4.10	Compilação de dados para definir o grupo de gêneros bacterianos endofíticos mais citados em tecidos de cana-de-açúcar.....	28
3.5	RESULTADOS	29
3.5.1	Obtenção do DNA metagenômico enriquecido de bactérias endofíticas de tecidos de colmo de cana-de-açúcar.....	29
3.5.2	Perfil de ARDRA do DNA metagenômico endofítico	31
3.5.3	Perfil de PCR do DNA metagenômico endofítico.....	31
3.5.4	Perfil das sequências da biblioteca de genes 16S rRNA	32
3.5.5	Diversidade, riqueza e perfil taxonômico das amostras metagenômicas	33

3.6	DISCUSSÃO	36
3.7	CONCLUSÕES.....	40
4	CAPÍTULO II ANÁLISE TAXONÔMICA DA COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NO LÍQUIDO EXTRAÍDO DO APOPLASTO DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	41
4.1	RESUMO.....	42
4.2	ABSTRACT	43
4.3	INTRODUÇÃO	44
4.4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.4.1	Material de estudo	45
4.4.2	Preparo das amostras e coleta do líquido do apoplasto	45
4.4.3	Extração do DNA total, quantificação e avaliação por PCR.....	45
4.4.4	Sequenciamento em larga escala dos genes 16S rRNA	45
4.4.5	Análise taxonômica dos genes 16S rRNA.....	46
4.5	RESULTADOS	47
4.5.1	Avaliação do DNA total	47
4.5.2	Sequenciamento e composição taxonômica dos genes 16S rRNA do líquido do apoplasto	47
4.6	DISCUSSÃO	52
4.7	CONCLUSÕES.....	54
5	CAPÍTULO III ANÁLISE <i>IN SILICO</i> PREDITIVA DAS FUNÇÕES RELACIONADAS À MICROBIOTA BACTERIANA ENDOFÍTICA DO COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	55
5.1	RESUMO.....	56
5.2	ABSTRACT	57
5.3	INTRODUÇÃO	58
5.4	MATERIAL E MÉTODOS	59
5.4.1	Origem das amostras	59
5.4.2	Adaptação dos dados obtidos em análise no Mothur para aplicação no Tax4Fun 59	
5.4.3	Predição das funções no Tax4Fun	60
5.5	RESULTADOS	61
5.5.1	Grupos de genes previstos pelo Tax4Fun para os conjuntos de amostras de cana-de-açúcar avaliadas e sua distribuição.....	61
5.6	DISCUSSÃO	65
5.7	CONCLUSÕES.....	69
6	CAPÍTULO IV DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>SPHINGOMONAS</i> ASSOCIADAS AO LÍQUIDO DO APOPLASTO DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	70
6.1	RESUMO.....	71
6.2	ABSTRACT	72
6.3	INTRODUÇÃO	73
6.4	MATERIAS E MÉTODOS.....	74
6.4.1	Extração do líquido do apoplasto e semeadura em meios de cultivo	74
6.4.2	Seleção de colônias <i>Sphingomonas</i> -tipo e preparo de estoques	74
6.4.3	Extração do DNA genômico e quantificação	74

6.4.4	Confirmação dos isolados por PCR com iniciadores específicos para o gênero <i>Sphingomonas</i>	74
6.4.5	Caracterização por BOX-PCR.....	75
6.4.6	Sequenciamento dos genes 16s rRNA e classificação taxonômica.....	75
6.5	RESULTADOS	77
6.5.1	Características gerais das colônias obtidas	77
6.5.2	Triagem dos filotipos.....	77
6.5.3	Caracterização filogenética dos isolados	81
6.6	DISCUSSÃO	83
6.7	CONCLUSÕES	85
7	CONCLUSÕES GERAIS	86
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
9	ANEXOS	113

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cana-de-açúcar (*Saccharum L.*) é uma *Poaceae* (gramínea) de grande importância para o agronegócio brasileiro. Produtos derivados desta cultura, como o açúcar e o etanol, despertam grande interesse na busca pelo aumento de produtividade desta planta, o que implica em muitos dos casos no uso de fertilizantes nitrogenados. Acredita-se que com os avanços biotecnológicos na agricultura, os impactos ambientais gerados pela busca do aumento da produtividade da cana-de-açúcar poderão ser amenizados por meio de soluções que diminuam o uso de fertilizantes e água na cultura. Dentre estas soluções, encontra-se o uso de inoculantes constituídos por bactérias promotoras do crescimento vegetal, que constituem, naturalmente, a microbiota da planta e são capazes de se multiplicar no interior dos tecidos como endófitos benéficos, modulando o crescimento e desenvolvimento da planta, com implicações que vão do aumento da produtividade agrícola à fitorremediação.

Bactérias endofíticas têm sido isoladas via metodologias que utilizam o cultivo, entretanto, é sabido que a maioria dessas bactérias ainda não são cultiváveis e permanecem inexploradas. Portanto, torna-se necessário utilizar estratégias independentes de cultivo para o estudo das mesmas. Neste sentido, a metagenômica é uma das principais estratégias no estudo das bactérias endofíticas, permitindo uma análise mais realista da população microbiana e identificando suas possíveis interações com o hospedeiro.

Com base neste contexto, a hipótese deste trabalho é que a microbiota bacteriana endofítica associada à cana-de-açúcar apresenta potencial como fonte de recursos genéticos, com aplicações em nutrição vegetal, fitossanidade e biotecnologia.

Desde modo, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar a diversidade bacteriana endofítica e investigar funções relacionadas à interação bactéria-cana-de-açúcar através da abordagem independente de cultivo.

O primeiro objetivo específico deste presente trabalho, foi de elaborar um protocolo de enriquecimento das bactérias endofíticas, permitindo a diminuição do material genético da planta hospedeira sem que houvesse uma perda significativa do conteúdo genético bacteriano. Sendo assim, através do material metagenômico obtido com este protocolo, foi obtido um perfil taxonômico da comunidade bacteriana presente nas amostras de colmo, comparando com os dados da literatura para a validação deste protocolo.

Em seguida, como segundo objetivo específico, foi avaliada a comunidade bacteriana presente em amostras do líquido do apoplasto de cana-de-açúcar, também baseado em uma abordagem independente de cultivo, o que até a presente data é um trabalho inédito.

O terceiro objetivo específico do trabalho visou prever funções, através de análises *in silico*, da comunidade bacteriana encontrada em cana-de-açúcar, objetivando contribuir para a compreensão dos processos benéficos à cana-de-açúcar.

O quarto e último objetivo específico, complementando os dados obtidos nos objetivos anteriores, foi baseado em observações dos dados obtidos neste trabalho, onde foi identificado uma forte presença de OTUs relacionadas ao gênero *Sphingomonas*, indicando que este gênero pode exercer um importante papel para o desenvolvimento da cana-de-açúcar. Deste modo, foi realizado um isolamento e identificação das espécies deste gênero presentes na cana-de-açúcar, com a finalidade explorar as possíveis funções dos isolados em ensaios *in vitro*.

Para melhor compreensão dos dados obtidos, a tese foi dividida em capítulos, que estão contextualizados com uma breve introdução, abordando os principais tópicos relacionados a cada análise.

Capítulo I: Desenvolvimento de uma estratégia independente de cultivo para enriquecer células bacterianas endofíticas de colmo de cana-de-açúcar aplicável a estudos de caracterização de comunidades microbianas.

Capítulo II: Análise taxonômica da comunidade bacteriana presente no líquido extraído do apoplasto de colmo de cana-de-açúcar.

Capítulo III: Análise *in silico* preditiva das funções relacionadas à microbiota bacteriana endofítica do colmo de cana-de-açúcar.

Capítulo IV: Diversidade de bactérias do gênero *Sphingomonas* associadas ao líquido do apoplasto de colmo de cana-de-açúcar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cana-de-açúcar: Aspectos Biológicos e Importância Econômica

A cana-de-açúcar pertence à classe Liliopsida; família Poaceae; tribo *Andropogoneae*, e gênero *Saccharum*. Segundo DILLON et al. (2007), atualmente as plantas cultivadas de cana-de-açúcar são principalmente híbridos derivados de cruzamentos de *Saccharum officinarum* e *Saccharum spontaneum*. As plantas oriundas desse cruzamento são gramíneas perenes que formam colmos de diferentes comprimentos com um líquido rico em sacarose em seu interior. Suas raízes são adventícias e permanentes, onde as adventícias emergem da zona de raiz do colmo e são responsáveis pelo transporte de água durante a brotação e o suporte da planta até o desenvolvimento das raízes permanentes. As permanentes são raízes fasciculadas até a base e são classificadas como raízes de suporte ou âncora e de maior rede de absorção (MONGELARD, 1969; MOORE; NUSS, 1987). Os colmos consistem de uma alternância de nó e entrenós. Em cada nó existe uma abertura onde dá origem a uma folha, broto axilar e uma banda circunferencial de raiz primária axilar (MARTIN, 1961). As folhas de cana-de-açúcar são alternadas e são ligadas ao colmo, com a frequência de uma folha a cada entrenó (MOORE, 1987). A inflorescência da cana-de-açúcar consiste em uma ramificada panícula conoidal com uma haste principal, chamado de raque, que é uma continuação do último colmo do entrenó. As raques possuem ramos secundários que dão origem a ramos terciários, e na base dos ramos secundários e no topo dos terciários encontram-se as espiguetas. Cada espiguetas possui uma flor disposta ao longo da inflorescência, que consistem de duas lodículas, o androceu e o gineceu. Os grãos de pólen são esféricos quando férteis e prismáticos quando estéreis. Os frutos de cana-de-açúcar, chamados de cariopses, são secos e com uma semente, e podem ser diferenciados de sua semente com auxílio da microscopia eletrônica (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). Os espaços intercelulares (o meio extracelular), entre a parede celular e o xilema, são aquosos e denominados de apoplasto (HASLAM et al., 2003). Este representa um compartimento altamente dinâmico que corresponde ao percurso interno e contínuo da raiz, caule e folhas, sendo este bastante importante no contexto da percepção e transdução de sinais do ambiente para o meio intracelular (simplasto) (PECHANOVA et al., 2010). Acredita-se que bactérias diazotróficas prefiram o apoplasto, pois o simplasto apresenta restrição a íons, açúcares e outros solutos, principalmente, devido ao processo natural de permeabilidade seletiva da membrana plasmática (DONG et al., 1994; STEUDLE; FRENSCH, 1997). Endófitos podem colonizar os espaços intercelulares do córtex, bem como o xilema, e ali realizar interações simbióticas com a planta hospedeira. Bactérias podem ainda chegar ao apoplasto através de colonização foliar nos estômatos ou ferimentos nas folhas (JAMES et al., 2001; MELOTTO et al., 2006).

Os primeiros relatos do plantio da cana-de-açúcar no Brasil foram registrados em 1522 na cidade de São Vicente, tendo sido provavelmente trazida da Ilha da Madeira por Martin Afonso de Souza e introduzida em Pernambuco por Duarte Coelho Pereira em 1533 (BASTOS, 1987). A princípio, no período colonial, a cultura foi somente destinada à produção de açúcar e, com a introdução do contexto de energia renovável, passou a ser utilizada como a principal fonte desta energia no Brasil, através da produção de etanol (SZMRECSÁNYI; MOREIRA, 1991). Com isso, o Brasil passou a ser referência mundial no uso e produção do etanol proveniente de cana-de-açúcar (CARVALHO, 2002). Hoje, o etanol é reconhecido mundialmente pelas suas vantagens ambientais, sociais e econômicas, e diversos países têm demonstrado interesse na tecnologia brasileira. Sua utilização é diversa,

porém concentra-se no uso como combustível alternativo aos de origem fóssil (ALBINO; CRESTE; FIGUEIRA, 2006).

A cana-de-açúcar pode ser cultivada em toda região de clima tropical e subtropical do mundo, o que inclui países como Índia, China, Tailândia, Paquistão, México, Colômbia, Austrália, Estados Unidos da América, Filipinas e Brasil (DILLEWIJN, 1952; GOMES; LIMA, 1964; CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011). No Brasil o cultivo desta planta está concentrado na região sudeste, a qual é responsável por aproximadamente 65 % da produção nacional de cana-de-açúcar. O centro-oeste do Brasil, onde a cultura expandiu rapidamente, é responsável por 21 % desta produção e as regiões nordeste, sul e norte, respectivamente representam, 7, 6 e 1 % da produção nacional de cana-de-açúcar (CONAB, 2017). Esta cultura, atualmente, é uma das mais importantes em termos econômicos para o Brasil, rendendo um valor bruto de produção de ~R\$ 74 bilhões para o ano de 2017 (MAPA, 2017), e estima-se uma produção de 646,4 milhões de toneladas cana-de-açúcar para a safra 2017/18 (CONAB, 2017). Dados estatísticos da FAOSTAT (2013) indicam que na média da produção das cinco maiores culturas no período de 1961 a 2012, a cana-de-açúcar é a mais produzida no Brasil (cerca de 270 milhões de toneladas), fazendo do Brasil o maior produtor mundial.

2.2 Avanços no Estudo da Interação Planta-Microrganismo

As plantas representam um excelente ecossistema para microrganismos, e podem interagir com diferentes comunidades microbianas incluindo bactéria, archaea, fungos e protistas (HARDOIM et al., 2015; MONTESINOS et al., 2002). As interações planta-microrganismos podem ser classificadas informalmente como interações compatíveis (microrganismos benéficos) e incompatíveis (patogênicos) (LI et al., 2013). Seja este microrganismo benéfico ou patogênico, elucidar a especificidade desta interação pode trazer informações importantes para biotecnologia, como por exemplo o desenvolvimento de biopesticidas a partir da estimulação de mecanismos de defesa da planta com a inoculação de bactérias e biofertilizantes por meio da promoção do crescimento vegetal (XIAO, 2012; MONTESINOS et al., 2002).

Neste contexto, os estudos sobre as interações incompatíveis, ou seja, planta-patógeno, têm sido amplamente exploradas com avanços valiosos nas últimas décadas (LI et al., 2013). As duas “barreiras” do sistema imune das plantas proporcionam proteção a um grande número de patógenos, devido ao reconhecimento de: 1) padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (sistema PTI) (DODDS; RATHJEN, 2010) e 2) proteínas efetoras (fatores de virulência) através de proteínas receptoras de resistência (R) (sistema ETI) (JONES; DANGL, 2006). Em interações planta-microrganismo, o sistema PTI fica altamente ativo até o estágio de “pré-invasão”, evitando assim que haja a invasão de patógenos para dentro das células hospedeiras. Em contraste, o sistema ETI atua no momento “pós-invasão”, restringindo assim a proliferação de organismos patogênicos que conseguem “burlar” o sistema PTI (DODDS; RATHJEN, 2010; JONES; DANGL, 2006). Novos conhecimentos sobre o funcionamento dos sistemas de defesas podem promover novas características de proteção por meio da biotecnologia. Lacombe et al. (2010) demonstraram que a expressão de uma proteína receptora de *Arabidopsis* introduzida em plantas de tomate e tabaco resultou em um sistema de proteção resistente a um amplo número de bactérias patogênicas.

A respeito das interações compatíveis, os estudos estão focados principalmente em bactérias que possuem a característica de promover o crescimento vegetal (também chamadas de PGPB – “plant growth-promoting bacteria”) e onde foram obtidos importantes avanços. Estas bactérias podem desempenhar este papel através de diferentes mecanismos, sendo estes classificados como mecanismos diretos (por exemplo, disponibilização de nutrientes e modulação dos níveis de fitohormônios); indiretos (produção de antibióticos, enzimas,

sideróforos; competição por sítios de colonização; indução da resposta sistêmica) e ainda controlando os efeitos de estresses ambientais (efeitos abióticos) (GLICK, 2012).

Em 2013, a bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae*, que é capaz de colonizar muitas plantas da família *Poaceae*, demonstrou a capacidade de produzir sideróforos (ROSCONI et al., 2013), além do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) descrito anteriormente (BALDANI et al., 1992). Outra bactéria endofítica diazotrófica, *Azospirillum lipoferum*, tem sido descrita como produtora dos fitohormônios ácido abscísico e giberelinas, demonstrando estar envolvida na amenização dos sintomas gerados por estresse hídrico em milho (COHEN et al., 2009). Neste caso, as bactérias associadas as plantas não produzem genuinamente hormônios vegetais, mas sim compostos como estruturais análogos que possuem os mesmos efeitos naturais dos fitohormônios (fitorreguladores) (BRADER et al., 2014).

Bactérias patogênicas também podem produzir fitorreguladores, como é o caso de diversas espécies de *Pseudomonas* que produzem o composto coronatina (FONSECA et al., 2009), que é análogo ao composto natural de plantas jasmonato, que por vez apresenta fitotoxicidade (LÓPEZ; BANNENBERG; CASTRESANA, 2008) e ainda pode atuar na supressão do fechamento dos estômatos e resposta de defesa (LEE et al., 2013). Observando o genoma de *Candidatus Burkholderia kirkii*, têm-se especulado o papel desta bactéria em proteção contra patógenos e herbívoros em plantas de *Psychotria* (família *Rubiaceae*) (CARLIER; EBERL, 2012), através da produção, por esta bactéria, de metabolitos secundários e o aminociclitol, o qual foi descrito com ação antibiótica, antifúngica e inseticida (MAHMUD, 2003). Em plantas de arroz, uma rizotoxina produzida pelo fungo *Rhizopus microsporus*, responsável pela praga de mudas de arroz, foi caracterizada também em *Burkholderia endofungorum* (LACKNER et al., 2011; LACKNER; PARTIDA-MARTINEZ; HERTWECK, 2009; PARTIDA-MARTINEZ; HERTWECK, 2005). Outras espécies de *Burkholderia* spp. também foram apontadas como produtoras de toxinas em plantas da família *Rubiaceae*, causando doenças em ruminantes (VERSTRAETE et al., 2011).

Bactérias endofíticas podem influenciar na produção de metabolitos secundários quando em interação com o tecido hospedeiro, como por exemplo, a bactéria endofítica *Pseudonocardia* sp. estirpe YIM 63111, que foi classificada como sendo hábil em aumentar a produção do composto artemisinina, conhecido como antimalárica, quando em interação com a planta *Artemisia annua* (LI et al., 2012). Um outro exemplo é o caso da interação da bactéria endofítica *Methylobacterium extorquens* com plantas de morangos, na qual foi verificado que esta bactéria sintetiza o composto 2-hidroxi-propanal (ou lactaldeído), precursor do composto produzido pela planta 2,5-dimetil-4-hidroxi-2H-furan-3-one (DMHF ou furaneol), que é responsável pela qualidade e o sabor, melhora a qualidade dos morangos (NASOPOULOU et al., 2014).

Uma outra característica benéfica é a competição por nutrientes, como por exemplo bactérias do gênero *Sphingomonas* foram descritas possuir a capacidade de competir com a bactéria patogênica *Pseudomonas syringae* por nutrientes em folhas de plantas de *A. thaliana*, conferindo assim proteção a esta planta (INNEREBNER; KNIEF; VORHOLT, 2011).

2.3 Endófitos

Descritos pela primeira vez por Bary (1866), durante mais de um século os endófitos foram quase que ignorados, pois se conhecia muito pouco sobre suas funções no interior dos vegetais (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Por definição, são microrganismos que habitam o interior de plantas e sua comunidade é constituída principalmente por fungos e bactérias, que não causam prejuízos aparentes aos seus hospedeiros (AZEVEDO, 1998; HARDOIM et al., 2015). Tais microrganismos penetram, principalmente, no tecido da raiz,

porém partes aéreas como flores, caules e cotilédones podem também ser habitados. Dentro da planta, esses microrganismos podem se localizar no ponto de entrada ou se dispersar de forma sistêmica (ZINNIEL et al., 2002; HALLMANN et al., 1997). Sua forma de penetração ativa nos tecidos de plantas ocorre como consequência da atividade de enzimas como celulases e pectinases; entretanto, pode também ocorrer através de aberturas naturais ou provocadas por injúrias (HALLMANN et al., 1997). Seu modo de dispersão pode ser via sementes, propagação vegetativa, partes mortas da planta ou por insetos (BALDANI et al., 1997).

2.3.1 Bactérias endofíticas: definição e diversidade

Bactérias endofíticas podem ser definidas como bactérias que são capazes de colonizar os tecidos internos das plantas não demonstrando sinal externo de infecção ou de efeito negativo nesses tecidos (SCHULZ; BOYLE, 2006; HOLLIDAY, 1989). Segundo STROBEL et al. (2004), dentre as 300.000 espécies de plantas, cada uma é hospedeira de endófitos, porém apenas algumas dessas plantas tem sido amplamente estudada a sua microbiota endofítica (RYAN et al., 2008). BERG e colaboradores, em 2005, definiram que as bactérias endofíticas representam um nicho ecológico similar ao dos fitopatógenos, o que as tornam suscetíveis aos agentes de biocontrole.

Alguns trabalhos pioneiros apontaram a capacidade desses microrganismos endofíticos no controle de fitopatógenos (STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000; DUIJFF; GIANINAZZI-PEARSON; LEMANCEAU, 1997; KRISHNAMURTHY; GNANAMANICKAM, 1997), insetos (AZEVEDO et al., 2000) e nematoides (HALLMANN et al., 1998, 1997). Em outros casos, eles podem promover a estabilidade da planta frente a condições adversas (CHANWAY, 1997) e o desenvolvimento da planta (BENT; CHANWAY, 1998). Além dessa funções, bactérias endofíticas têm demonstrado potencial em sintetizar novos compostos que estão sendo utilizados em tratamentos de doenças humanas, animais e vegetais (STROBEL et al., 2004).

Grupos e gêneros de bactérias têm sido descritos como sendo endofíticas em plantas distintas através do isolamento dessas a partir de tecidos superficialmente desinfestados (REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998; HALLMANN et al., 1997). Porém a utilização de métodos independente de isolamento por cultivo tem revelado um maior número de bactérias endofíticas, como é caso de análises de genes obtidos do DNA total dos microrganismos presentes no interior dos tecidos (MIYAMOTO; KAWAHARA; MINAMISAWA, 2004; REITER et al., 2002; SESSITSCH et al., 2002; CHELIUS; TRIPLETT, 2000; ENGELHARD; HUREK; REINHOLD-HUREK, 2000).

Bactérias endofíticas de diferentes grupos taxonômicos foram identificadas em plantas como arroz, milho, banana, soja, abacaxi, batata-doce, café, cana-de-açúcar e etc. Dentro do grupo das alfa-Proteobacteria, destacam-se bactérias como: *Azospirillum brasilense*, *A. amazonense*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Rhizobium leguminosarum* e *Sphingomonas paucimobilis*. Bactérias como: *Azoracis* sp., *Burkholderia* sp., *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisulbalbicans* são as principais representantes do grupo das beta-Proteobacterias. No grupo taxonômico das gama-Proteobacteria, destacam-se as bactérias: *Enterobacter* spp., *Erwinia* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* spp. e *Serratia* sp. Alguns representantes do grupo das Firmicutas como: *Bacillus* spp., *Clostridium* e *Staphylococcus saprophyticus* apresentam estirpes caracterizadas como endofíticas. Para o grupo dos Bacteriodetes, a bactéria *Sphingobacterium* sp. foi identificada como sendo endofítica. Para o táxon Actinobacteria, as bactérias que foram classificadas como sendo endofíticas são: *Curtobacterium* sp., *Mycobacterium* sp. e *Streptomyces* (revisado por ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

As gramíneas de importância econômica, tais como cana-de-açúcar, arroz, trigo, sorgo, milho e algumas forrageiras, foram identificadas como hospedeiras de diversas espécies de bactérias diazotróficas endofíticas (DÖBEREINER, 1992), sendo as principais *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *Azospirillum* spp. e *Burkholderia* spp. (BODDEY et al., 2003; JAMES, 2000; BALDANI et al., 1997; JAMES et al., 1997). A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) foi inicialmente descrita em bactérias diazotróficas da rizosfera de uma grande variedade de plantas não leguminosas (DÖBEREINER, 1992), porém evidências revelaram que algumas bactérias diazotróficas colonizam o interior dos tecidos da planta (OLIVARES et al., 1996; URETA et al., 1995).

Algumas bactérias diazotróficas endofíticas já foram isoladas a partir de tecidos de cana-de-açúcar, tais como: *Azospirillum brasilense*; *Azospirillum amazonense*; *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp, *Pantoea* sp e *Burkholderia* spp (TEJERA et al., 2005; LOIRET et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2002; OLIVARES et al., 1996; DONG et al., 1994; CAVALCANTE; DOBEREINER, 1988; BALDANI et al., 1986; NUNEZ; COLMER, 1968).

Em relação ao controle de doenças, bactérias como *Pseudomonas* sp, *Curtobacterium luteum* ou *Pantoea agglomerans*, possuem ação inibitória sob a bactéria *Erwinia carotovora*, quando inoculadas em cana-de-açúcar (REITER et al., 2002). Em relação à bactéria *Enterobacter*, estudos mostraram a sua eficiência em promover o crescimento vegetal por meio da fixação biológica de nitrogênio (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; HALLMANN et al., 1998). *Pantoea* também está relacionada com a promoção do crescimento em soja e controle de *Erwinia* (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; STURZ; MATHESON, 1996).

2.3.2 Potencial metabólico e biotecnológico de bactérias endofíticas

Organismos vivos têm sido descritos como uma rica fonte de produção de diversos metabolitos, sendo majoritariamente descobertos em plantas. Entretanto os microrganismos têm sido apontados como uma rica e particular fonte de mais que 20.000 compostos biologicamente ativos, influenciando o comportamento e a sobrevivência de outros organismos, como por exemplo, as plantas (DEMAIN; SANCHEZ, 2009).

Baseando-se no fato de que endófitos coexistem com seus hospedeiros, qualquer modificação genética nesses microrganismos poderá introduzir novas características de interesse nas plantas (AZEVEDO, 1998). A primeira tentativa de manipulação de um microrganismo endofítico foi descrita no trabalho realizado por FAHEY (1988), que consistiu na introdução do gene *cry* de *Bacillus thuringiensis* em *Clavibacter xyli* subespécie *cynodontis* (bactéria endofítica capaz de colonizar o colmo de milho), que ao ser introduzido na planta, via inoculação de sementes, permitiu o controle da broca do colmo de milho. Tal tecnologia foi posteriormente introduzida na produção em larga escala por uma empresa de biotecnologia, que a partir desta ideia vem desenvolvendo microrganismos geneticamente modificados para outras plantas (AZEVEDO, 1998). O mesmo gene de *B. thuringiensis* também foi utilizado em *Bradyrhizobium*, uma bactéria que promove FBN em leguminosas (NAMBIAR; MA; IYER, 1990) e, com a modificação, a bactéria além de fixar nitrogênio, também produz a toxina codificada pelo gene introduzido em plantas de *Cajanus cajan*, conferindo proteção contra larvas do inseto *Rivelia angulata* (DI FIORE; DEL GALLO, 1995).

Atualmente, há uma ampla evidência de que muitas bactérias endofíticas promovem o desenvolvimento dos vegetais por meio de efeitos diversos, como: produção de reguladores de crescimento (como os hormônios auxinas, citocininas e giberelinas); inibição do estresse vegetal pela síntese do 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase;

disponibilização de nitrogênio por meio do processo de fixação de N₂; mobilização do fósforo (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; DOBEREINER; BODDEY, 1981); indução dos mecanismos de defesa do vegetal; produção de substâncias patogêno-antagonista ou ainda pela competição de colonização de sítios ou nutrientes (WEYENS et al., 2009; STROBEL et al., 2004; HALLMANN et al., 1997). A produção de fitorreguladores já foi relatada em bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; LEE et al., 2004; ZAKHAROVA et al., 2001). Por exemplo, o ácido abscísico e a giberelina, produzidos por *Azospirillum lipoferum*, foram considerados responsáveis por amenizar os sintomas gerados pelo estresse hídrico em plantas de milho (COHEN et al., 2009). Já no que diz respeito ao controle biológico de pragas e doenças, a espécie bacteriana mais usada como antagonista a patógenos é o *Bacillus subtilis* (BACON et al., 2001).

Metabólicos de interesse biotecnológico têm sido detectados na interação endófito-planta. Plantas de *Artemisia annua*, em interação com a bactéria endofítica *Pseudonocardia* sp. estirpe YIM 63111, foi capaz de induzir a produção do composto artemisinina nos tecidos desta planta, sendo este utilizado pela medicina no tratamento da malária (revisto por BRADER et al., 2014). Do mesmo modo, bactérias do gênero *Streptomyces* sp. também foram caracterizadas como produtoras de metabólicos antimaláricos, como o munumbicina e coronamicina (revisto por RYAN et al., 2008). Outro exemplo é a *Pseudomonas viridiflava*, que foi detectada dentro dos tecidos de um grande número de espécies de gramíneas produzindo dois novos compostos antimicrobianos chamando de ecomicinas, que foram capazes de inibir a patogênese de bactérias patogênicas ao humano como *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (MILLER et al., 1998). Strobel e sua equipe em 1993 demonstraram a produção de um agente ativo – taxol – caracterizado como anticâncer produzido por *Taxomyces andreanae* quando associados com a planta *Taxus brevifolia*.

A produção de “bioplásticos” tem despertado grande interesse comercial, e estes também estão sendo descritos em trabalhos com bactérias endofíticas (KALIA; CHAUHAN; BHATTACHARYYA, 2003). A primeira bactéria produtora de um biomaterial caracterizado como bioplástico foi o *Bacillus megaterium* (LEMOIGNE, 1926). Os bioplásticos mais produzidos por essas bactérias são os polihidroxialcanoatos (PHA). A bactéria endofítica *Herbaspirillum seropedicae*, presente nos tecidos de cana-de-açúcar, foi caracterizada como sendo produtora do bioplástico polihidroxibutirato (PHB), quando crescida em diferentes fontes de carbono (CATALÁN et al., 2007).

Bactérias endofíticas também foram utilizadas em associação com plantas no contexto da fitorremediação. Ryan e colaboradores em sua revisão em 2007 sobre as possíveis aplicações de bactérias endofíticas descreveram uma lista de organismos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *P. savastanoi*, *P. putida*, *Methilobacterium populi*, *Burkholderia cepacia* e *Herbaspirillum* sp. que podem ser utilizados como modo de suprir a necessidade da utilização dos compostos nitrogenados utilizados em muitos cultivos de plantas, inclusive a cana-de-açúcar, bactérias com a capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio (denominadas diazotróficas), foram apontadas pioneiramente em trabalhos realizados por Dr. Johanna Döbereiner (DÖBEREINER; DAY; DART, 1972; DÖBEREINER, 1961, 1988, 1992, 1997). A possibilidade de se substituir o nitrogênio fertilizante pela fixação biológica de nitrogênio é importante, pois esta é econômica e ambientalmente vantajosa (REIS et al., 2000). Entretanto, as bases moleculares das interações endofíticas com a planta ainda não são bem compreendidas. Métodos independentes de cultivo para análises da comunidade e a genômica funcional, bem como, a genômica comparativa, têm fornecido uma melhor compreensão da dinâmica, sinalização e funções das associações endófito-planta (revisado por REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011). Tais esclarecimentos são importantes, pois tem sido verificado que microrganismos endofíticos têm proporcionado benefícios à planta hospedeira,

o que os coloca no mesmo nível de microrganismos como os fungos micorrízicos e as bactérias simbiontes que também fixam nitrogênio atmosférico (AZEVEDO, 1998).

2.4 Metodologias de Estudos de Microrganismos Associados às Plantas

Os estudos de microrganismos associados às plantas são tradicionalmente baseados em isolamento em meio de cultivo. Contudo, as técnicas de cultivo são laborosas e a grande maioria de bactérias não pode ser obtida como cultura pura; fazendo com que a diversidade de organismos cultiváveis não seja bem avaliada, já que um grande número de meios e condições de cultivo deve ser utilizado para avaliar a diversidade de um determinado nicho (MAGNANI, 2005). Outra limitação é o fato de que ainda existem microrganismos que não são cultiváveis (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011).

Conforme supracitado, conclui-se que a escolha de um método adequado no estudo de diversidade é de suma importância, devido ao fato de que muitas técnicas excluem a possibilidade de se conhecer alguns microrganismos, principalmente aquelas que são baseadas em cultivo. Com o surgimento e desenvolvimento de técnicas moleculares, verificou-se que é possível ter acesso aos microrganismos não cultiváveis (revisado por REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011). Por exemplo, análises de genes do rRNA a partir do DNA metagenômico têm aprimorado as investigações sobre a diversidade microbiana nos últimos anos (LUNDBERG et al., 2013; BULGARELLI et al., 2012; SESSITSCH et al., 2012; WANG et al., 2008; YOKOUCHI et al., 2006). Similarmente, trabalhos que investigaram a presença de diazotróficos ativos em cana-de-açúcar através de RT-qPCR (Reação em cadeia da polimerase quantitativo, transcriptase reversa), uma técnica independente de cultivo, têm revelado a atividade de bactérias fixadoras de nitrogênio da ordem Rhizobiales, além de outras bactérias previamente caracterizadas e até mesmo totalmente desconhecidas (FISCHER et al., 2012; BURBANO et al., 2011; THAWEENUT et al., 2011). Tais resultados sugerem que quantidades significativas de nitrogênio podem estar sendo suprido à planta de cana-de-açúcar através de bactérias não cultiváveis, especificamente de seu mecanismo de fixação biológica de nitrogênio, e também mostram que estratégias independentes de cultivo são essenciais para melhor compreender a diversidade genética, estrutura populacional, o papel ecológico e as características funcionais dos microrganismos associados à planta de cana-de-açúcar (SCHWAB; DOS-SANTOS; BALDANI, 2014).

A estratégia clássica reducionista da reação em cadeia da polimerase (PCR) de genes únicos se utiliza de um pequeno grupo de genes modelos o que pode gerar problemas associados à concepção dos iniciadores, como: falta de ampla cobertura filogenética, falso favorecimento de determinados grupos filogenéticos ou inespecificidade para os genes alvos (SCHWAB; DOS-SANTOS; BALDANI, 2014). A metagenômica permite uma visão global dos fenômenos em todos os genes simultaneamente o que possibilitaria a identificação de outras atividades úteis em endófitos diazotróficos, para além da fixação de nitrogênio (SCHWAB; DOS-SANTOS; BALDANI, 2014; SESSITSCH et al., 2012).

2.4.1 Metagenômica

Por definição, Metagenômica é a análise genética direta de genomas contidos em uma amostra ambiental (HANDELSMAN et al., 1998). O campo inicialmente começou com a clonagem de DNA ambiental, seguido do rastreamento das funções que estavam sendo expressas (HANDELSMAN, 2004), sendo, em seguida, rapidamente complementado por sequenciamento direto (*shotgun*) do DNA ambiental (TYSON et al., 2004; VENTER et al., 2004). Estes projetos iniciais não só mostram o princípio da abordagem metagenômica, mas

também descobriram uma enorme diversidade de genes de características funcionais no mundo microbiano (revisado por THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012).

O acesso à ampla composição genética de comunidades microbianas, proporcionado pela metagenômica, permite uma descrição muito mais ampla da filogenia do que análises de diversidade do gene de 16S rRNA. Por si só, a metagenômica fornece informação genética em potencial para novos biocatalisadores ou enzimas, ligações genômicas entre função e filogenia de organismos não cultiváveis e perfis evolucionários da função e estrutura da comunidade (revisado por THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012).

a) Abordagens metagenômicas utilizadas na prospecção de genes e funções

A metagenômica é um grande marco no campo da ecologia microbiana nas últimas décadas (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012). Definida como a análise genética direta dos genomas presente em uma amostra ambiental (HANDELSMAN, 2004). Esta metodologia tem crescido rapidamente com o surgimento das tecnologias de sequenciamento, chamados de “nova-geração” ou de larga-escala (OULAS et al., 2015). Essas tecnologias têm permitido a análise direta do DNA metagenômico, sem a necessidade de amplificar o DNA total e clonar em vetores, diminuindo as taxas de erros (OULAS et al., 2015).

Neste contexto, a prospecção de genes e funções, utilizando o sequenciamento em larga-escala, pode ser baseado em duas abordagens: 1) construção de biblioteca metagenômica e 2) sequenciamento direto do DNA metagenômico (WILSON; PIEL, 2013). A primeira envolve o isolamento do DNA metagenômico (que deverá ser de alta qualidade) (GURGUI; PIEL, 2010; OUYANG et al., 2010; LILES et al., 2008), podendo ser feito também um enriquecimento das células alvo (IKEDA et al., 2009; WANG et al., 2008; JIAO et al., 2006) e a construção de vetores e clonagem em organismos modelo (como por exemplo *Escherichia coli*) (WILSON; PIEL, 2013). Após a construção das bibliotecas, é feita a triagem das funções por meio de *screening* funcional (ensaios bioquímicos/enzimáticos *in vitro*) (REYES-DUARTE; FERRER; GARCÍA-ARELLANO, 2012) ou por meio de homologia (PCR, por exemplo) (WILSON; PIEL, 2013). A segunda abordagem é baseada em análise das sequências por meio da bioinformática (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012), ou seja, após a extração de DNA metagenômico, este é sequenciado em larga escala seguido de montagem das sequências (KUNIN et al., 2008) e anotação/predicação dos genes comparando-os com bancos de dados (MEYER et al., 2008). Nesta abordagem é altamente recomendado que se restrinja o máximo possível a extração ao DNA das células alvo, ou seja, o passo de enriquecimento celular é aconselhável antes da extração e sequenciamento das moléculas de DNA (WILSON; PIEL, 2013; IKEDA et al., 2009; WANG et al., 2008). Também é possível utilizar o DNA metagenômico para a análise de expressão de funções em um microrganismo heterólogo (WILSON; PIEL, 2013; REYES-DUARTE; FERRER; GARCÍA-ARELLANO, 2012).

Uma problemática na utilização da abordagem metagenômica na prospecção de genes é a demanda de DNA nos sequenciamentos em larga escala (>1 µg) (WAYNE, 2013) e ainda o baixo número de células bacterianas em relação ao hospedeiro (BULGARELLI et al., 2013). Nesse contexto, além do enriquecimento das células alvo, tem-se utilizado uma técnica nomeada de “amplificação de múltiplos deslocamentos” (*multiple displacement amplification* - MDA) (HAVEN, 2001), onde se utiliza a polimerase Phi29 (DEAN et al., 2001; SALAS; MOSKOWITZ, 1993), iniciadores aleatórios e baixa quantidade de DNA, que permite à amplificação de genomas completos em pouco tempo (YOKOUCHI et al., 2006). Esta técnica tem sido também utilizada para o sequenciamento de uma única célula (LASKEN, 2007). Em amostras complexas, esta amplificação tem demonstrado grande aplicação na amplificação de metagenomas de baixo número de células (YOKOUCHI et al.,

2006). Este tipo de amplificação é compatível com as atuais tecnologias de sequenciamento, e pode ser aplicada inclusive na prospecção de genes e funções pertinentes ao DNA metagenômico (SRINIVASAN; BATRA, 2014).

b) Metagenômica como ferramenta de análise de interações planta-bactéria

A metagenômica surgiu no contexto das investigações que buscam considerar todos os componentes de um bioma, utilizando os sequenciadores em larga-escala (MELCHER; VERMA; SCHNEIDER, 2014), onde é possível produzir um alto número de informações com baixa taxa de erro (REUTER; SPACEK; SNYDER, 2015). No estudo da microbiota associada a plantas, tem sido um desafio obter a real representação de todos os microrganismos presentes (GUTTMAN; MCHARDY; SCHULZE-LEFERT, 2014). Para solucionar esta problemática, estudos independentes de cultivo, baseados em abordagens metagenômicas e utilizando o sequenciamento em larga-escala, tem possibilitado a identificação de novos microrganismos e elucidando funções exercidas por estes no tecido hospedeiro (GUTTMAN; MCHARDY; SCHULZE-LEFERT, 2014). Por exemplo, WANG et al. (2008), buscaram analisar a microbiota da espécie arbórea *Mallotus nudiflorus* por meio da metagenômica enriquecendo o homogenato antes da extração de DNA das bactérias presentes. Os autores justificam que escolheram esta planta devido a trabalhos anteriores terem isolado um composto antibiótico que poderia ser produto bacteriano quando em associação com a planta, porém não foi possível identificar qual (ou quais) bactéria(s) estaria(m) produzindo este composto. Resultados do sequenciamento do DNA metagenômico revelou um grande potencial de aplicações biotecnológicas de funções exercidas pela microbiota ali presente.

A abordagem metagenômica pode também ser utilizada na investigação de um único gene/função. Nikolic et al. (2011), por exemplo, buscaram analisar a presença de genes que codificam a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase (genes *acdS*), observando o metagenoma obtido de plantas de batata (*Solanum tuberosum* L). Essa enzima muito comum em bactérias promotoras de crescimento vegetal, capaz de reduzir o nível de etileno em plantas em desenvolvimento ou sob condições de estresse (GLICK, 2005). O trabalho identificou a predominância de *operons acdS* com similaridade para *Pseudomonas*, *Burkholderia*, e ainda um *operon acdS* relacionado a uma bactéria não cultivável, demonstrando assim a importância da metagenômica no estudo de funções exercidas pela microbiota.

Em um estudo realizado por SESSITSCH et al. (2012), os autores identificaram por meio da metagenômica características funcionais da microbiota endofítica de raízes de arroz. Informações valiosas foram descritas nestas análises, como: metabólitos relacionados a adaptações de microrganismos de vida-livre dentro das raízes; sistemas de secreção; sequestro de metais e armazenamento; *quorum sensing*; detoxificação de espécies reativas de oxigênio; fixação de nitrogênio; promoção do crescimento vegetal; resistência a estresses; biocontrole de patógenos e biorremediação. O trabalho demonstra a importância de se utilizar a metagenômica em análise de comunidades microbianas, devido ao número de informações obtidas nas análises. Okubo et al. (2014), utilizando brotos de arroz de duas cultivares diferentes, compararam a rizosfera, filosfera e tecidos de raiz por meio da metagenômica, revelou diferentes entendimentos sobre o metabolismo de fitorreguladores, carbono e nitrogênio exercidos pela comunidade bacteriana associada a planta. A abundância de genes relacionados ao metabolismo de compostos C1 e catabolismo ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato), por exemplo, foram maiores do que os genes relacionados ao ácido indolacético e fixação biológica de nitrogênio. O salicilato hidrolase foi detectado em todos os microbiomas exceto na rizosfera. Estas informações são importantes para o entendimento das interações planta-microrganismo e metabolismo bioquímico em brotos de arroz.

Integrando a análise metagenômica e metaproteômica (chamada de abordagem metaproteogenômica), KNIEF et al. (2012) aplicaram esta abordagem para analisar a microbiota da filosfera e rizosfera de plantas de arroz. O estudo revelou a presença de um processo de conversão de carbono-1 na rizosfera e filosfera; proteínas envolvidas na metanogênese e de bactérias metanotróficas, sendo este último amplamente ligado ao gênero *Methylobacterium*. A expressão dessas proteínas foi predominante na filosfera; o processo de fixação de nitrogênio foi detectado ativa exclusivamente na rizosfera, porém foram encontrados genes *nifH* em várias bactérias da filosfera; e outros traços fisiológicos envolvidos nos processos de transporte e resposta a estresse foram encontrados. O trabalho, portanto, demonstra a capacidade desta integração de metodologias em identificar *in situ* a fisiologia e composição de comunidades microbianas.

c) Importância da metagenômica no contexto das bactérias endofíticas

Até recentemente, para identificação de uma espécie bacteriana era necessário obter uma cultura pura e, nesta identificação utilizavam-se características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas. Um grande número de organismos foi identificado e tantos outros reclassificados através do uso de técnicas moleculares, o que permite a identificação de organismos não cultiváveis (KIRCHHOF et al., 1997; UEDA et al., 1995). A metagenômica tem mostrado ser uma das principais estratégias aplicadas nos estudos sobre os potenciais biotecnológicos de microrganismos endofíticos (LUNDBERG et al., 2013; SESSITSCH et al., 2012; THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012); porém, esses estudos exigem uma etapa prévia de enriquecimento das células bacterianas, pois estas se encontram em pequena minoria relativamente às células da planta hospedeira (WANG et al., 2008).

Segundo BULGARELLI et al. (2013), o número estimado de células bacterianas endofíticas é de aproximadamente 10^4 – 10^8 por grama de raiz, em comparação, as bactérias rizosféricas estão em maior número, cerca de 10^6 – 10^9 bactérias por grama de solo, ou seja, considerando que a massa de uma célula bacteriana é de aproximadamente 1 pg, 10^8 dessas células equivaleriam a 0,0001 g; portanto, existem cerca de 0,0001 g de células bacterianas a cada 1 g de tecido hospedeiro. Este aspecto faz com que seja necessária uma etapa prévia de enriquecimento das células bacterianas endofíticas para um posterior estudo metagenômico (WILSON; PIEL, 2013). Alguns trabalhos foram publicados relatando o enriquecimento da microbiota endofítica (IKEDA et al., 2009; JIAO et al., 2006; WANG et al., 2008), porém é preciso investigar se essas metodologias poderiam funcionar com plantas de cana-de-açúcar, devido ao fato de que esta é uma planta cujo colmo contém altos níveis de polissacarídeos, compostos fenólicos, nucleases e muita fibra (VIRUPAKSHI; NAIK, 2007).

2.4.2 Perspectivas e aplicações de genes e funções identificados em estudos metagenômicos

A metagenômica é capaz de ampliar o conhecimento sobre comunidades microbianas, pois é uma metodologia independente de cultivo o que permite analisar também microrganismos ainda não-cultiváveis (TAUPP; MEWIS; HALLAM, 2011), revelando assim novos metabólicos com diversas aplicabilidades (WILSON; PIEL, 2013). Diferentes trabalhos têm demonstrado, por meio da metagenômica, a estrutura e as funções exercidas por microrganismos presentes em ambientes como solo, água, tecidos de planta e ainda o rumem (DAI et al., 2014; JACQUIOD et al., 2013; SESSITSCH et al., 2012; HESS et al., 2011; IKEDA et al., 2009; DINSDALE et al., 2008).

A aplicação por meio da biotecnologia de genes identificados através da metagenômica tem sido amplamente utilizado na medicina, como por exemplo, uma

abordagem de metagenômica funcional que utiliza a metodologia de sequenciamento *shotgun* e *screening* heterólogo de genes com plasmídeos BACs. Esta aplicação tem sido utilizada para identificar novos genes que conferem melhorias no processo de colonização e estabelecimento de probióticos no intestino de murinos (YOON et al., 2013). Em 2014, Culligan et al. mencionaram o termo “metabiotecnologia” para definir esta aplicação na área da biotecnologia.

Em 2014, um grupo de pesquisadores chineses demonstraram através da metagenômica funcional um grupo de bactérias resistentes a antibióticos encontrados em solos agrícolas (SU et al., 2014). A abordagem utilizada foi por meio da montagem da biblioteca metagenômica, na qual o DNA total extraído a partir de amostras do solo foi fragmentado por meio de enzima de restrição, separados eletroforéticamente e os fragmentos de 1-3kb foram selecionados para a montagem dos plasmídeos utilizando o vetor pUC19. Células de *E. coli* foram transformadas e os vetores positivos foram sequenciados na plataforma Sanger. A partir das sequências de DNA, foi feita a identificação de ORFs (*Open Reading Frames*) através do *webserver* “ORFfinder” e comparadas com o banco de dados não-redundante do NCBI. Neste trabalho os autores identificaram genes que conferem resistência aos antibióticos rifampicina, cloranfenicol, aminoglicosídeo e tetraciclina, sugerindo que as bactérias portadoras desses genes de resistências são potencialmente prejudiciais à saúde humana (SU et al., 2014).

Para a indústria bioquímica e farmacêutica, tem sido amplamente aplicado a metagenômica funcional na identificação de novas enzimas. Kim et al. (2006) caracterizaram e isolaram uma nova esterase a partir de uma amostra metagenômica que foi digerida com enzimas de restrição, inserida em fosmídeos e clonadas em células de *E. coli*. Neste trabalho eles utilizaram o *screening* dos clones em ensaios substrato específico. A partir dos clones que apresentaram atividade esterase, os plasmídeos foram sequenciados e comparados com banco de dados. A proteína gerada nos clones que foram identificados como portadores de “novos” genes esterase, foi purificada e bioquimicamente caracterizada (KIM et al., 2006).

Estudos que buscam analisar a estrutura de microbiomas de plantas podem auxiliar na definição das funções que estes microrganismos poderiam estar desempenhando no hospedeiro, como por exemplo, YEOH et al. (2016) ao analisar o microbioma da raiz de cana-de-açúcar em condições de presença e ausência de fertilizante nitrogenado, observou que a microbiota presente possuía um alto número de genes *nif* ativos (envolvidos no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN)), quando sob pouca taxas de fertilizante. O trabalho utilizou a plataforma 454 FLX Titanium (sequenciamento em larga-escala), utilizando o DNA metagenômico (YEOH et al., 2016). Um outro exemplo similar, desta vez com uma espécie arbórea, foi realizado em 2008 por Wang e colaboradores. Neste trabalho os autores demonstraram a importância de enriquecer as células alvo antes das análises metagenômicas, ou seja, eles propuseram um protocolo de eliminação do material vegetal antes da extração de DNA das bactérias. O preparo das amostras de DNA metagenômico para o sequenciamento seguiram uma metodologia clássica aplicado ao estudo de metagenomas: o DNA metagenômico foi fragmentado utilizando enzimas de restrição, clonados em vetores do tipo fosmídeos e, então, sequenciados utilizando o método Sanger (HANDELSMAN, 2004). Após o sequenciamento, os dados foram comparados com o banco de dados do NCBI, identificando assim as funções e genes presentes nas amostras e seus respectivos portadores. Os autores concluem que este trabalho proporciona base teórica para futuros estudos sobre os potenciais biotecnológicos dessa comunidade (WANG et al., 2008). De modo similar, SESSITSCH et al. (2012) analisou características funcionais da comunidade endofítica de raízes de arroz. Neste trabalho, também foi realizado uma biblioteca do tipo *shotgun*, no qual o DNA metagenômico também foi enriquecido e fragmentado. O vetor utilizado foi o pUC19 e estes foram inseridos em células de *E. coli*. O sequenciamento também foi do tipo Sanger e as sequências foram

classificadas utilizando um *software*. Os autores também demonstraram com esse trabalho dá suporte a futuras investigações sobre o potencial biotecnológico que esta microbiota teria para a agricultura (SESSITSCH et al., 2012). Outro trabalho, também utilizando raízes de arroz, que buscou analisar, em específico, as funções exercidas pelas bactérias associadas a esta planta, foi realizado por OKUBO et al. (2014). A metodologia de análise foi através do sequenciamento *shotgun* na plataforma 454 GS FLX Titanium. Após o sequenciamento, os dados foram mapeados ao genoma de arroz para remover os *reads* oriundos da planta, e a predicação/anotação dos genes/funções foi realizado utilizando webserver MG-RAST. Os resultados demonstraram informações sobre o metabolismo de fitohormônios, carbono e nitrogênio exercidos na interação bactéria-planta. Os autores sugerem que os resultados fornecem informações relevantes sobre a melhor compreensão desta interação que poderia ser útil em análises metaproteômica (OKUBO et al., 2014).

O estudo de funções e genes relacionados a interação bactéria-planta teve grandes avanços com utilização do PCR em tempo real. Trabalhos baseados no monitoramento dos genes *nifH* demonstraram o papel exercido de bactérias diazotróficas em plantas da família *poaceae* e ainda revelou novas bactérias que desempenham esta função (FISCHER et al., 2012; RINCON-FLOREZ; CARVALHAIS; SCHENK, 2013; ROUWS et al., 2014; THAWEENUT et al., 2011; VIDEIRA et al., 2009). Porém esta técnica fica limitada devido à restrição de um pequeno grupo de genes (SCHWAB; DOS-SANTOS; BALDANI, 2014). A metagenômica tem uma visão global dos genes que possibilita a identificação de outras funções para além da FBN (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011). A fim de identificar e possivelmente aplicar funções exercidas pela interação das bactérias endofíticas com a planta, é necessário elucidar as bases moleculares dessa interação (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011). Acredita-se que com futuras tecnologias de sequenciamento muitos questionamentos sobre esta relação poderão ser elucidados. Contudo efeitos benéficos exercidos por essas bactérias têm sido descritos, como por exemplo a promoção do crescimento vegetal, proteção contra estresses bióticos e abióticos, fixação biológica de nitrogênio e produção de metabólitos secundários (HARDOIM et al., 2015). Futuros trabalhos utilizando esses bioprodutos poderão promover uma agricultura mais sustentável (BERG et al., 2013).

2.5 Metodologias de Sequenciamentos de “Nova-geração” (Next-Generation Sequencing)

Nas últimas décadas, o uso de tecnologias de “próxima geração” (ou *Next generation sequencing* – NGS) tem ampliado o conhecimento sobre os estudos de genomas. Estas tecnologias permitem que um genoma completo seja sequenciado mais rápido, fácil e com maior qualidade do que tecnologias pioneiras, como por exemplo o sequenciamento proposto por Sanger, que teve seu lançamento em 1977 (SRINIVASAN; BATRA, 2014). Sua aplicação na medicina tem ajudado a determinar a causa de doenças causadas por desordem no microbioma humano (WALTERS; XU; KNIGHT, 2014) e em análise de amostras ambientais, tem ajudado a descrever a estrutura e funções de comunidade microbianas, como por exemplo do solo (LV et al., 2014) e oceanos (SUNAGAWA et al., 2015).

Atualmente existem diversos tipos de sequenciadores de próxima geração, que diferem principalmente na abordagem que é empregada na identificação dos nucleotídeos, o número de sequências produzidas por reação e o tempo de sequenciamento; e estas tecnologias/abordagens têm sido definidas como de segunda à quarta-geração devido aos aspectos das abordagens utilizadas (CLOONEY et al., 2016). Estas metodologias de sequenciamento variam de abordagens que requererem uma prévia amplificação por PCR das amostras antes do sequenciamento propriamente dito à utilização de uma única molécula de DNA no sequenciamento, sem a necessidade de amplificação por PCR. Outro diferencial

destas novas tecnologias é a precisão dos resultados e custo por sequenciamento, o que tem revolucionado drasticamente os estudos atuais (SRINIVASAN; BATRA, 2014). Até o presente momento as tecnologias de sequenciamentos mais utilizados são as plataformas Roche 454 GS-FLX, Illumina MiSeq, Illumina HiSeq e o Ion PGM; na qual cada um desses possui suas peculiaridades e aplicações. Essa diversidade de tecnologia/abordagens faz com que seja necessário avaliar o tipo de plataforma a ser empregado no estudo, pois fatores como o preparo das amostras, que podem incluir etapas além da extração, como amplificação, purificação e quantificação (SALONEN; VOS, 2016; SINCLAIR et al., 2014; GIHRING; GREEN; SCHADT, 2012), podem influenciar significativamente nos resultados (CLOONEY et al., 2016).

2.5.1 Tecnologias de 2º geração

Esta geração de sequenciamento, que incluem as plataformas Roche 454, Illumina (Solexa), Illumina MiSeq, ABI SOLiD, Illumina HiSeq, Polonator G.007, Ion Torrent, e SLAF-seq; é bastante diversa, mas os fundamentos das suas tecnologias são similares. De forma geral, a preparação das amostras inclui etapas de fragmentação do DNA seguido pela ligação de adaptadores, e o método utilizado para determinar a sequência de DNA pode ser divididas em três formas: 1) sequenciamento de matriz cíclica, 2) sequenciamento utilizando hibridização de sondas e 3) sequenciamento de fragmento amplificado locus-específico (SLAF-seq) (SRINIVASAN; BATRA, 2014).

A primeira metodologia, sequenciamento de matriz cíclica, pode ser resumida como um sequenciamento baseado em coleta de dados por imagem (MITRA et al., 2003). Esta metodologia foi apresentada com a introdução do pirosequenciamento com sua primeira aplicação na plataforma comercial Roche 454 GS20 (SRINIVASAN; BATRA, 2014). Esta foi a primeira plataforma de “nova-geração” comercial (MARGULIES et al., 2005). Esta metodologia conclui-se que é baseada em síntese, na qual DNA molde é fragmentado aleatoriamente (por nebulização, geralmente), desnaturados e são inseridos adaptadores em suas extremidades. Os fragmentos com adaptadores são ligados à microesferas magnéticas por meio do pareamento com sequências curtas complementares presentes na superfície da microesfera (DRESSMAN et al., 2003). As simples-fitas presentes nas esferas são então distribuídas em uma placa contendo micropoços e amplificadas em uma PCR de emulsão, onde milhares de cópias são produzidas (REUTER; SPACEK; SNYDER, 2015). As microesferas ligadas às sequências alvo fita simples são capturadas individualmente em poços de uma placa em escala picométrica e então são fornecidos os reagentes para a reação de pirosequenciamento (que inclui: dNTPs, ATP sulforilase, Luciferase, Luciferina, DNA polimerase e adenosina 5' fosfosulfato (APS)) (REUTER; SPACEK; SNYDER, 2015). A reação de sequenciamento se inicia com a liberação de um pirofosfato a cada adição de um dNTP à cadeia. Esse pirofosfato é convertido para ATP, pela ATP sulfurilase utilizando o APS, sendo este utilizado pela luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal de luz (SRINIVASAN; BATRA, 2014; RONAGHI et al., 1996). O sinal de luz emitido é identificado a cada base incorporada e em cada poço de sequenciamento, e cada base é adicionada por vez na placa, em ciclos que variam em adição e lavagens (SRINIVASAN; BATRA, 2014). Neste tipo de sequenciamento em suas primeiras versões resultavam em ~200.000 *reads* de 100-250 pb e suas últimas versões, 454 GS FLX Titanium, produzem *reads* de até 700 pb (MARGULIES et al., 2005), porém esta plataforma produz muitos erros relacionados a homopolímeros com mais de 6 pb e seus reagentes são de alto custo (SRINIVASAN; BATRA, 2014).

O sequenciamento de matriz cíclica também pode ser baseado em detecção de fluorescência por síntese. Neste caso a etapa de preparo de DNA inclui a desnaturação do

mesmo, montagem de bibliotecas com adição de adaptadores nas fitas únicas e PCR em ponte, na qual geram milhões de cópias idênticas ao DNA molde e estas estão espacialmente separadas (BENTLEY; BALASUBRAMANIAN; SMITH, 2014). O primeiro sequenciador a adotar esse tipo de metodologia foi o Illumina (Solexa) e atualmente esse tipo de sequenciamento domina o mercado (SRINIVASAN; BATRA, 2014; METZKER, 2010). Quatro anos após o surgimento desta técnica a mesma empresa (Illumina) desenvolveu o sequenciador HiSeq 2000, na qual produz um grande número de *reads* com uma baixa taxa de erro (menor que 2%) e de custo menor do que os sequenciadores como 454 e SOLiD (REUTER; SPACEK; SNYDER, 2015; SHENDURE; JI, 2008). O Illumina MiSeq também é baseado nesse tipo de tecnologia (sequenciamento por síntese) e seu diferencial é o tempo de sequenciamento que é menor que as demais plataformas (LIU et al., 2012).

Em 2014 a Illumina divulgou o NextSeq 500, na qual a sua aplicabilidade é similar ao MiSeq, porém este é mais rápido e em menor dimensão. O seu grande diferencial dos demais Illumina é a utilização de apenas dois canais de detecção de sinais e os nucleotídeos são marcados em vermelho (citosina), verde (timina), amarelo – sendo esse a união de vermelho e verde (adenina) e a guanina não é marcada. Essa modificação fez com que fosse reduzido o tempo de processamento das imagens geradas (REUTER; SPACEK; SNYDER, 2015).

Um caso especial da metodologia baseada em coleta de dados por imagem são as plataformas que utilizando a hibridização de sondas marcadas com fluoróforo no preparo das amostras (ZHOU et al., 2012). Uma das plataformas mais conhecidas que utiliza esse tipo de abordagem é o ABI SOLiD, no qual são realizados repetidos ciclos de hibridização com as sondas e clivagens (SRINIVASAN; BATRA, 2014). Neste caso a sonda possui um sítio de ligação e outro de clivagem onde fica localizado o fluoróforo, e a cada clivagem é emitido a fluorescência (MARDIS, 2008). Esta abordagem produz *reads* de 85 pb com uma precisão de 99.99% (SRINIVASAN; BATRA, 2014). Outra plataforma baseada em hibridização é o Polonator G.007. Neste é utilizado nanonucleotídeos como sondas (SRINIVASAN; BATRA, 2014). Porém sua utilização não foi bem aceita devido a erros de inadequada cobertura e falsos-positivos, além de que esta técnica requer uma alta infraestrutura e é de alto custo (PATIL, 2001).

A terceira metodologia (SLAF-seq) é de baixo custo e de alta eficiência e neste caso não há mais a necessidade de se utilizar um DNA genômico de alta qualidade (SUN et al., 2013). Neste caso, sua aplicabilidade está associada a verificação de polimorfismos ou genotipagem envolvidos entre sequências e o DNA molde pode ser um produto gerado em uma PCR ou por enzima de restrição (SCHMUTZ et al., 2010). Esta técnica reduz a complexidade do preparo de bibliotecas genômicas, como mandatório em outros tipos de metodologias, e é possível diferenciar cerca de 10.000 amostras de uma só vez (SRINIVASAN; BATRA, 2014).

2.5.2 Tecnologias de 3^o geração

A 3^a geração de metodologias de sequenciamento é marcada com introdução de sequenciamento de moléculas únicas, ou seja, não há mais a necessidade de amplificar o DNA molde, evitando assim os possíveis erros gerados por PCR (SRINIVASAN; BATRA, 2014). Sequenciadores desta geração se baseiam em duas técnicas, uma óptica e outra não-óptica: 1) sequenciamento de molécula única (SMS) e 2) sequenciamento de semicondutor não-óptico. As plataformas inseridas nesta geração são Pacific Biosciences Single Molecule Real-time (SMRT), Helicos Biosciences true Single Molecule (tSMS) e uma nova versão do Ion Torrent, o Ion Personal Genome Machine (PGM) (REUTER; SPACEK; SNYDER, 2015; SRINIVASAN; BATRA, 2014).

A técnica do tipo SMS fornece diversas vantagens em relação aos sequenciadores de segunda-geração. Esta técnica é baseada na abordagem do sequenciamento por síntese, semelhante aos das segunda-geração, mas neste caso não há necessidade de amplificação do DNA molde, reduzindo assim as chances de erros (TIMP et al., 2010). Outra vantagem é que o mesmo produz sequências longas (~1000 pb) e pouco tempo (SRINIVASAN; BATRA, 2014). De forma geral, a informação sobre as bases do DNA sequenciado é obtida através do escaneamento da fluorescência gerada com a adição de bases na fita-molde por uma DNA polimerase, similar ao mecanismo do PCR em tempo real (EID et al., 2009). No caso da plataforma tSMS há uma pequena diferença, neste a DNA polimerase é marcada com um fluoróforo no qual quando próximo à um nucleotídeo marcado com um aceptor de fluoróforo, emite uma fluorescência e o fluoróforo só é liberado após a incorporação da base (SRINIVASAN; BATRA, 2014). Esses tipos de sequenciadores atualmente podem gerar *reads* de até 8,5 kb na plataforma PacBio RSII, e ainda quando combinada com a P5-C3 DNA Polimerase estes fragmentos podem ser de até 30.000 bases (ROSS et al., 2013). Porém uma alta taxa de erro (~5%) está associado à esta técnica (ROBERTS; CARNEIRO; SCHATZ, 2013).

No sequenciamento não óptico, ou seja, a coleta dos dados não é baseada em imagens, o funcionamento desta técnica é semelhante à de um medidor de pH (SRINIVASAN; BATRA, 2014). O preparo das amostras é igual ao do sequenciador 454, porém as esferas contendo os amplificadores gerados na PCR de emulsão, são inseridos em um chip juntamente com as dNTPs (SRINIVASAN; BATRA, 2014). A cada inserção de nucleotídeo ocorre uma alteração no pH que é medido por um sensor iônico, e cada base corresponde a um sinal (BARZON et al., 2011). A plataforma Ion PGM foi o primeiro sistema que não requer a emissão de fluorescência na detecção das bases, permite um alto número de dados em comparação aos sequenciadores considerados “rápidos” de segunda geração (BARZON et al., 2011).

2.5.3 Tecnologias de 4^o geração

A geração mais atual de metodologia de sequenciamento, pode-se considerar a junção de vantagens das técnicas utilizadas na terceira-geração, como: utilização de uma única molécula e rapidez; e a introdução uma nova tecnologia chamada de “Nanopore”. A técnica Nanopore também não requerer a amplificação do DNA molde, sequenciamento em tempo real com vários ciclos e ainda não é mais preciso da síntese para ser gerado a informação (SRINIVASAN; BATRA, 2014).

O sequenciamento Nanopore consiste no conceito que uma única molécula de DNA pode ser identificada quando esta passa através de um poro em escala manométrica (NIEDRINGHAUS et al., 2011). Esses poros são formados por proteínas de membrana (bicamada lipídica) e materiais sintéticos na fase sólida (silicone nítico, como por exemplo) (SRINIVASAN; BATRA, 2014). A identificação das bases ocorre em conjunto com uma exonuclease - na qual desnatura o DNA e direciona uma simples fita para o poro -, e dentro da proteína que forma o poro existe um adaptador, a ciclodextrina, na qual “mantem” o DNA dentro do póro o tempo suficiente (~20ms/base) para a leitura da corrente eletrônica que é gerada com a passagem do DNA no nanoporo (REUTER; SPACEK; SNYDER, 2015; SRINIVASAN; BATRA, 2014). A primeira plataforma desse tipo de sequenciamento foi lançada pela empresa Oxford Nanopore technology, e esta plataforma é capaz de gerar *reads* grandes (~2kb), podendo identificar 1 bilhão de bases de DNA em 6 h por um preço de US\$ 900 (SRINIVASAN; BATRA, 2014). Em 2014 foi lançada uma plataforma portátil, o MinION na qual consegue produzir 16.000 *reads* variando de 6-60kb em 18hs. Porém este, e assim como outros sequenciadores que é baseado em sequenciamento de uma molécula de

DNA, produz uma alta taxa de erros relacionados a inserção (4,9%), deleção (7,8%) e substituição (5,1%) (REUTER; SPACEK; SNYDER, 2015). Este tem sido utilizado como complementar ao sequenciamento do Illumina a fim de solucionar *gaps* gerados na montagem de genomas (REUTER; SPACEK; SNYDER, 2015).

3 CAPITULO I

DESENVOLVIMENTO DE UMA ESTRATÉGIA INDEPENDENTE DE CULTIVO PARA ENRIQUECER CÉLULAS BACTERIANAS ENDOFÍTICAS DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR APLICÁVEL A ESTUDOS DE CARACTERIZAÇÃO DE COMUNIDADES MICROBIANAS ¹

¹ Capítulo publicado na revista *Microbial Ecology*, em fevereiro de 2017. DOS-SANTOS, Carlos M. et al. A culture-independent approach to enrich endophytic bacterial cells from sugarcane stems for community characterization. *Microbial ecology*, v. 74, n. 2, p. 453-465, 2017.

3.1 RESUMO

Os endófitos bacterianos constituem uma comunidade muito diversificada que conferem importantes benefícios para agricultura. Alguns desses benefícios permanecem pouco compreendidos, principalmente devido às problemáticas associadas às plantas como baixo número de células bacterianas endofíticas o que dificulta a recuperação dos genomas microbianos por metodologias independentes de cultivo. Um método de enriquecimento físico, independente de cultivo e não-tendencioso, de células endofíticas bacterianas a partir de tecidos de plantas pode ajudar a contornar esses problemas, especialmente no caso da cana-de-açúcar, que têm um alto nível de interferentes, como polissacarídeos, compostos fenólicos, nucleases e fibras. O presente estudo descreve uma abordagem de enriquecimento de células bacterianas endofíticas de base de colmo de cana-de-açúcar. Os resultados demonstram que o conteúdo genético obtido no processo de enriquecimento das células bacterianas foi apropriado para a análise de caracterização da comunidade através do sequenciamento em larga escala. Esta análise da comunidade revelou além da presença de gêneros descritos anteriormente em tecidos de cana-de-açúcar, outras bactérias que podem estar exercendo funções como a promoção do crescimento vegetal e o controle biológico, não descritas anteriormente para cana-de-açúcar. Os resultados revelaram a predominância de gêneros pertencentes ao filo das Proteobacterias, mas também OTUs incluídas nos filos das Actinobacterias, Bacteroidetes, Firmicutes e entre outros. Além disso, comparando os dados presentes e da literatura, foi possível listar um grupo de endófitos bacterianos mais frequentemente detectados em tecidos de cana-de-açúcar. O protocolo o enriquecimento celular bacteriano endofítico estabelecido neste presente trabalho possibilitou o acesso à comunidade bacteriana endofítica de amostras de colmo de cana-de-açúcar, e pode ser aplicável a outras plantas para o avanço no estudo das bactérias endofíticas.

Palavras-chaves: Sequenciamento larga-escala. Enriquecimento celular. Bactérias endofíticas. Base de colmo.

3.2 ABSTRACT

Bacterial endophytes are a very diverse community, which confer important benefits to agriculture. Some of these benefits remain little understood, mainly due to problems associated with plants, like low number of endophytic bacterial cells which hinders the recovery of microbial genomes by culture-independent methodologies. A method of physical enrichment, culture-independent and non-biased, of endophytic bacterial cells from tissues of plants can help circumvent these problems, especially in the case of sugarcane, which have a high level of interfering as polysaccharides, phenolic compounds, and nucleases. The present study describes an approach to endophytic bacterial cell enrichment of sugarcane base stems. The results shown that the genetic content obtained from the bacterial cell enrichment process was appropriate for the analysis of characterization of the community through the large-scale sequencing. The community analysis revealed beyond the presence of genera described earlier in sugarcane tissues, others bacterial that may be acting as the plant growth promotion and the biological control, not described previously for sugarcane. The results revealed the predominance of genera belonging to the Proteobacterial phylum, but also included in the Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, and among others. In addition, by comparing the data present and literature, it has been possible to list a group of bacterial endophytes most often detected in tissues from sugarcane. The endophytic bacterial cell enrichment protocol established in this present work has enabled access to endophytic bacterial community of base stem samples of sugarcane, and may be applicable to other plants for the advancement in the study of endophytic bacteria.

Keywords: Large-scale sequencing. Cell enrichment. Endophytic bacteria. Base stem.

3.3 INTRODUÇÃO

Os endófitos bacterianos vivem nos tecidos das plantas e são supostamente não patogênicos para seus hospedeiros (HALLMANN et al., 1997; REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011). Estes organismos colonizam principalmente os tecidos radiculares, mas também outras partes da planta, como folhas, frutas, tubérculos, óvulos, hastes, sementes e nódulos (OLIVARES et al., 1996; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Todas as plantas são colonizadas por uma infinidade de microrganismos endofíticos (revisado por HARDOIM et al., 2015). Plantas de cultivo importantes como o arroz (SESSITSCH et al., 2012; SUN et al., 2008), a cana-de-açúcar (MAGNANI et al., 2013; ROUWS et al., 2014; YEOH et al., 2016), o sorgo (MAREQUE et al., 2014), o milho (CHELIUS; TRIPLET, 2001) e a soja (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004) foram descritas como capazes de abrigar uma rica comunidade bacteriana endófito. Estudos iniciais demonstram o papel desses microrganismos como controladores de patógenos bacterianos (DUIJFF; GIANINAZZI-PEARSON; LEMANCEAU, 1997; KRISHNAMURTHY; GNANAMANICKAM, 1997; STURZ; MATHESON, 1996), pragas de insetos (AZEVEDO et al., 2000) e pragas de nematóides (HALLMANN et al., 1998). Em outros casos, os microrganismos endofíticos demonstraram a capacidade de melhorar as respostas das plantas às condições de estresse (CHANWAY, 1997) e estimular o crescimento das plantas (DOBEREINER, 1997; HARDOIM; VAN OVERBEEK; ELSAS, 2008). Além dessas funções importantes que ajudam a aumentar o rendimento agrícola (BERG et al., 2013; SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2014), as bactérias endofíticas também demonstraram potencial para sintetizar compostos que podem ser usados no tratamento de doenças humanas e animais (GLICK, 2012; RYAN et al., 2008).

Metodologias de enriquecimento da microbiota endofítica dos tecidos das plantas, como em arroz (SESSITSCH et al., 2012) e outras espécies de plantas (JIAO et al., 2006; WANG et al., 2008; IKEDA et al., 2009) foram descritas anteriormente, mas nenhuma relacionada a cana-de-açúcar. Superar esse gargalo é um desafio devido ao fato de que esta planta possui um alto conteúdo de polissacarídeos, compostos fenólicos, nucleases e fibras em seus colmos (VIRUPAKSHI; NAIK, 2007), o que dificulta, por exemplo, a obtenção de uma amostra de DNA de qualidade. Uma possível solução poderia ser a adaptação de abordagens utilizadas em outras espécies de plantas (JIAO et al., 2006; IKEDA et al., 2009; WANG et al., 2008; SESSITSCH et al., 2012) para enriquecer células bacterianas endofíticas de tecidos de cana-de-açúcar, permitindo posterior caracterização desta microbiota. Alternativamente, uma abordagem utilizada anteriormente para enriquecer organelas de cana-de-açúcar (mitocôndrias e cloroplastos) (VIRUPAKSHI; NAIK, 2007) também poderia ser adaptada para enriquecer as células bacterianas endofíticas.

Nesse trabalho é descrita uma abordagem de enriquecer a microbiota bacteriana endofítica de base de colmo de cana-de-açúcar, tomando com base método usado anteriormente para enriquecer organelas de cana-de-açúcar. Antes foram testadas outras abordagens para células bacterianas endofíticas de outras plantas, mas não funcionavam com cana-de-açúcar. A eficiência da abordagem adaptada foi mostrada através de análises de perfil de colônias, microscópicas e moleculares, incluindo uma análise da comunidade bacteriana utilizando o sequenciamento do tipo Illumina MiSeq de genes 16S rRNA, resultando em um perfil taxonomico de células bacterianas diverso com baixo conteúdo de DNA da planta.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Material de estudo

Foram utilizadas amostras de base de colmo de cana-de-açúcar das variedades RB867515 (responsiva à inoculação em termos de produtividade) (REIS et al., 2009), plantadas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia (Seropédica – RJ) (Tabela 1). O solo deste campo experimental é classificado como Acrisol ou tipo Hapludult, não havendo nenhum cultivo a mais de 5 anos antes do plantio deste experimento. O mesmo foi submetido a uma fertilização inicial com 80 kg de P ha⁻¹ e 60 kg de K ha⁻¹ e correção de pH com 1,5 Mg de calcário ha⁻¹. As plantas não receberam nenhum tratamento com pesticidas.

Tabela 1: Descrição das amostras de DNA metagenômico de bactérias endofíticas obtidas neste trabalho

Amostras	Localidade do experimento (Latitude/Longitude)	Data do plantio	Data da coleta
A1	22°44'50.3''S/43°40'15.7''W	Setembro 2013	Novembro 2013
A2	22°44'50.3''S/43°40'15.7''W	Setembro 2013	Abril 2014
A3	22°45'11.2''S/43°39'50.2''W	Outubro 2013	Mai 2014

3.4.2 Coleta e preparo das amostras biológicas

Foi utilizado 1 kg de base de colmo de plantas de cana-de-açúcar por extração de dois diferentes locais e durante duas diferentes épocas do ano. As amostras foram deixadas no escuro a 4 °C por 72 h para reduzir o conteúdo de polissacarídeo.

a) Desinfestação superficial

Os colmos foram lavados, descascados e desinfestados superficialmente por imersão em etanol 95% seguida de flambagem, por três vezes, devolvendo as amostras para um recipiente estéril em banho de gelo.

A eficiência de desinfestação deste material foi avaliada rolando um pedaço de colmo desinfestado em uma placa de petri com meio DYGS (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JR; VICTOR, 1986) suplementado com 2,5% de caldo de cana-de-açúcar esterilizado por filtração, e incubando esta placa por uma semana a 30 °C.

b) Homogeneização do tecido

Os colmos foram cortados em pedaços de aproximadamente 1 cm³ e homogeneizados em liquidificador (~22.000 rpm) em tampão TEBCP [50 mM de TRIS-HCl, pH 7,8, 25 mM de EDTA-Na₂, 0,2 % de BSA (P/V), 0,13%, hidrocloreto de cisteína, 1% de PVP (P/V)] (BAKKEN, 1985; SESSITSCH et al., 2012; TRIBOUSH; DANILENKO; DAVYDENKO, 1998; VIRUPAKSHI; NAIK, 2007). Em seguida o homogenato foi filtrado utilizando uma peneira de nylon para um recipiente estéril acondicionado no gelo e, em seguida, foi transferido para tubos de centrifuga, mantendo-os sempre a 0 °C (WANG et al., 2008). Foi realizada uma centrifugação a 1.000 x g por 20 min a 0 °C, coletando o sobrenadante para um novo recipiente estéril (BAKKEN, 1985; WANG et al., 2008).

3.4.3 Preparo e aplicação da bactéria repórter

Durante a elaboração do procedimento de enriquecimento (não envolvendo as amostras utilizadas no estudo), uma bactéria repórter expressando a proteína verde fluorescente (GFP) foi adicionada $\sim 10^7$ células mL^{-1} à metade do volume do homogenato na etapa de homogeneização do tecido, para o monitoramento do enriquecimento por meio da fluorescência. Esta bactéria foi previamente cultivada em 250 mL de meio LB (BERTANI, 1951) suplementado com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina à 37°C durante a noite, centrifugado a $1000 \times g$ por 10 min a 4°C e resuspenso em 10 mL de TEBCP.

3.4.4 Enriquecimento celular das bactérias endofíticas

O enriquecimento das células bacterianas ocorreu através de etapas de filtragem, centrifugação e tratamento com nucleases, adaptados de procedimentos previamente utilizados para outras espécies vegetais (JIAO et al., 2006; IKEDA et al., 2009; SESSITSCH et al., 2012).

a) Filtragens

O homogenato foi sequencialmente filtrado (SESSITSCH et al., 2012) em 8, 5 e 3 μm de porosidade, em seguida, uma nova centrifugação foi feita a $18.000 \times g$ por 20 min a 0°C , com a finalidade de sedimentar as bactérias e organelas vegetais (BAKKEN, 1985).

b) Eliminação das organelas por lise

O sedimento formado foi lavado três vezes com o tampão TECP [100 mM de TRIS-HCl, pH 7,8, 50 mM de EDTA- Na_2 , 0,13 % de hidrocloreto de cisteína, 1 % de PVP (P/V)] (TRIBOUSH; DANILENKO; DAVYDENKO, 1998; VIRUPAKSHI; NAIK, 2007), centrifugando a suspensão a $18.000 \times g$ por 10 min a 0°C , descartando o sobrenadante ao término. Uma nova lavagem do sedimento foi realizada, desta vez utilizando água deionizada estéril (gelada) de modo a lisar as organelas presentes no homogenato (CAPLAN; GREENAWALT, 1966). Seguindo as mesmas condições das lavagens supracitadas, o sobrenadante foi lavado até o aparente desaparecimento do sedimento correspondente aos cloroplastos (cor verde). Ao término, o sedimento foi novamente ressuscitado em Água Deionizada Estéril gelada.

c) Redução do DNA vegetal

Foram adicionados à suspensão: 1x do tampão de reação das DNases, 1 mg mL^{-1} estreptomicina e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ cicloheximida. Subsequentemente, acrescentou-se a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RNase A, 200 U RNase-Free DNase I (Epicentre) e 200 U Baseline-ZEROTM DNase (Epicentre), incubando a 37°C durante 1 h ou à noite ($\sim 12 \text{ h}$) (SESSITSCH et al., 2012; TRIBOUSH; DANILENKO; DAVYDENKO, 1998). Depois da incubação, a atividade das DNases foi inibida através de lavagens realizadas com o tampão TEDF (50 mM de TRIS-HCl, pH 8,0, 50 mM de EDTA- Na_2 , 2 % de DEPC, 50 mM de NaF) (TRIBOUSH; DANILENKO; DAVYDENKO, 1998; VIRUPAKSHI; NAIK, 2007) em dois ciclos de centrifugação a $18.000 \times g$ por 10 min a 0°C , descartando os sobrenadantes e adicionando o tampão. Ao término, o sedimento foi ressuscitado em tampão TE e, então, se transferiu o conteúdo para um microtubo.

3.4.5 Análises microscópicas

O extrato enriquecido foi submetido ao teste de Gram (BARTHOLOMEW; MITTWER, 1952) e analisado por microscopia de contraste de fase com o microscópico Axioplan (Carl Zeiss). Alíquotas contendo a bactéria repórter foram coletadas após os passos do processo de enriquecimento descrito acima para a contagem de células. As células foram micrografadas usando o microscópico confocal LSM700 com a objetiva de imersão em água 40x/0,6. As imagens foram processadas utilizando o software Zen 2.1 (black) (Carl Zeiss). O GFP foi excitado utilizando o laser de 488 nm com emissão entre 493 e 1000 nm. A imagem de luz transmitida também foi coletada por contraste de fase, para permitir a imagem dos quadrantes da câmara de Neubauer, e sobreposição com a imagem de fluorescência do GFP.

3.4.6 Extração e avaliação do DNA bacteriano

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo descrito por Virupakshi e Naik (2007). À da suspensão de células das bactérias endofíticas, foi adicionado SDS 10%, 10 mg ml⁻¹ de proteinase K e 10 mg ml⁻¹ de RNase A; homogeneizando bem e incubando o sistema de digestão por uma hora ou durante a noite a 37 °C.

A primeira etapa da extração iniciou-se com a adição de 1 volume de fenol equilibrado ao sistema, centrifugando por 5 min a 4 °C na velocidade máxima. O sobrenadante foi coletado para um novo tubo, onde foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 5 M e foi então realizada uma nova extração com 1 volume de clorofórmio : álcool isoamílico 24:1 (v/v), centrifugando novamente por 5 min a 4 °C em velocidade máxima. Coletou-se novamente o sobrenadante para um novo tubo. O DNA foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol anidro gelado e incubação a 0 °C por 1 h ou mais. Ao final da precipitação, centrifugou-se por 30 min a 0 °C em velocidade máxima (~16.000 x g), desprezando o sobrenadante e lavando-se o sedimento com etanol 70 %, centrifugando novamente por 5 min na velocidade máxima a 0 °C. O sobrenadante foi descartado no término e o sedimento formado foi seco. Após estar bem seco, o sedimento foi redissolvido em tampão TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA-Na₂), transferindo então a solução para um novo microtubo para dar prosseguimento com uma nova lise e extração.

A segunda etapa de extração teve seu início com a adição novamente de SDS 10 %, 10 mg ml⁻¹ de proteinase K, 10 mg ml⁻¹ de RNase A; homogeneizando e incubando a 37 °C por uma hora. Em seguida adicionou-se NaCl 5 M e solução CTAB/NaCl previamente aquecida à 65 °C e foi incubado sob mesma temperatura (65 °C) por 15 min, agitando o microtubo a cada 3 min. Prosseguindo, 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v/v) foi adicionado e centrifugado por 5 min em velocidade máxima a 4 °C. O sobrenadante foi então coletado para um novo tubo e 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1 (v/v/v) foi adicionado e centrifugado nas mesmas condições. O novo sobrenadante formado foi coletado para um novo tubo para assim receber a adição de 0,6 volumes de isopropanol gelado. Incubou-se a mistura por um tempo maior que 25 min em banho de gelo e em seguida foi centrifugado por 20 min a 4 °C em velocidade máxima, descartando o sobrenadante. O sedimento de DNA resultante foi então lavado com etanol 70 % e centrifugando-o em velocidade máxima a 0 °C. Por fim, secou-se o sedimento seguido de ressuspensão em tampão TE.

3.4.7 Quantificação do DNA total por espectrofluorimetria e análise por eletroforese em gel de agarose não-desnaturante

No fim de cada procedimento de extração, a quantidade e a qualidade do DNA total foram avaliados utilizando a metodologia de espectrofotometria (NanoDrop™ - Thermo

Scientific™) e espectrofluorimetria no equipamento Qubit® 2.0 (Invitrogen™) utilizando Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen).

Em seguida, as amostras foram eletroforicamente separadas em gel de agarose não-desnaturante a 0,8 % (P/V) sendo este, ao término, corado com solução de brometo de etídio a 10 mg mL⁻¹ e em seguida visualizado a transluinação UV utilizando o fotodocumentador Kodak Gel Logic 100 Imaging System.

3.4.8 Avaliação do enriquecimento celular bacteriano endofítico

a) Análise por restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA)

O processo de enriquecimento das células bacterianas a partir da base do colmo da cana foi avaliado através da técnica de análise de restrição de DNA ribossômico (rDNA) amplificado (“ARDRA”) essencialmente como descrito por SCHWAB et al. (2014). Esta análise consiste em amplificar o gene 16S rDNA bacteriano (controles positivos) e do DNA total de tecidos de base de colmo de cana-de-açúcar, e baseando-se nas sequências de DNA disponíveis em base de dados pública (NCBI) para o 16S rDNA de cloroplasto de cana-de-açúcar, de mitocôndria de espécies vegetais filogeneticamente próximas, e de bactérias. Uma enzima de restrição apropriada foi escolhida e testada quanto à sua capacidade de distinguir entre DNA bacteriano e de cana-de-açúcar.

Sendo assim, os iniciadores complementares referentes à região 16S rDNA utilizados neste trabalho foram o 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (LANE, 1991) e Amp2 (5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3') (WANG; QI; CUTLER, 1993). As sequências de DNA dos iniciadores foram comparadas com as sequências de DNA das espécies vegetais através do programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997). As análises de restrição *in silico* foram realizadas utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999).

As estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho como controle foram a estirpe Ppe8 de *Burkholderia tropica*, DH10B de *Escherichia coli*, PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*, *Bacillus* spp., e *Nocardioides* spp. O DNA das estirpes bacterianas foi isolado pelo método do CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987).

O 16S rDNA de bactéria ou de cana-de-açúcar (principalmente de cloroplastos, mas também de bactérias associadas) foi amplificado por PCR utilizando kit de Taq-DNA polimerase da Invitrogen com reações de 20 µL compostas por 1x do tampão PCR Buffer (Invitrogen), 1,5 mM da solução de MgCl₂, 50 µM de cada dNTP, 0,25 µM de cada iniciador, 0,5 U da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e ~10 ng de DNA molde. O ciclo de amplificação desta PCR foi composto por uma desnaturação inicial à 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 45 seg e 72 °C por 2 min, e por fim, uma etapa de 72 °C por 8 min. Após visualização por eletroforese em gel de agarose, o DNA dos sistemas de PCR foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol. Em seguida, os amplificados foram redissolvidos no sistema de digestão da enzima *Nsi*I. A reação de digestão foi procedida conforme descrito pelo fabricante (New England Biolabs - NEB). Em seguida os produtos da digestão foram eletroforicamente separados em gel de agarose não-desnaturante a 1 % (p/v) sendo este ao término corado com solução de brometo de etídio a 10 mg mL⁻¹ e em seguida visualizado a transluinação UV utilizando o fotodocumentador Kodak Gel Logic 100 Imaging System.

b) PCR de 16S rRNA para diferenciar bactérias de mitocôndrias

A reação de amplificação pelos iniciadores 799F (5'-AACMGGATTAGATACCCKG-3') (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991), geram fragmentos de tamanhos diferentes entre bactérias e gramínea (arroz) (SUN et al., 2008), ao contrário dos iniciadores 27F e Amp2 (utilizados na ARDRA). Outro fato é que tais iniciadores conseguem anelar-se ao DNA genômico de mitocôndrias, mas não de cloroplastos. Sendo assim, com estes iniciadores, é possível avaliar o enriquecimento e extração do DNA de bactérias endofíticas de cana-de-açúcar similarmente à técnica de ARDRA. Neste caso, são gerados fragmentos de amplificados de 16S rRNA de mitocôndrias da cana-de-açúcar (com aproximadamente 1000 pb) e de bactérias (com cerca de 700 pb). Desta forma, esta PCR auxilia na avaliação do enriquecimento e extração do DNA bacteriano endofítico da cana, podendo ser complementar ao ARDRA, conforme demonstrado para arroz por SUN et al., (2008).

Foram utilizadas amostras controles de bactérias (estirpe Ppe8 de *Burkholderia tropica*, DH10B de *Escherichia coli*, PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*, *Bacillus* spp., e *Nocardioides* spp) e uma amostra de DNA total de folha e colmo, extraído conforme Virupakshi & Naik (2007), para verificar o perfil de fragmentos de 16S rRNA de bactérias e de mitocôndrias.

A PCR foi realizada utilizando o kit Platinum Pfx DNA polimerase (Invitrogen), em um sistema de 20 µL contendo aproximadamente 5 ng de DNA, 1x de tampão de reação, 200 µM dNTPs, 20 pmol de cada iniciador e 1,5 U de polimerase. Depois da desnaturação inicial de 5 min a 94 °C houve 30 ciclos de: desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 52 °C por 45 seg e extensão a 68 °C por 1 min. A extensão final foi realizada por 8 min a 72 °C. Os produtos da PCR foram eletroforéticamente separados em gel de agarose a 1 % (P/V) sendo este, ao término, corado com solução de brometo de etídio a 10 mg mL⁻¹ e em seguida foi visualizado a transliminação UV utilizando o fotodocumentador Kodak Gel Logic 100 Imaging System.

c) Construção de biblioteca de genes 16S rRNA de mitocôndria e sequenciamento

Após ter confirmação do enriquecimento satisfatório da microbiota endofítica em relação ao material vegetal (banda de DNA bacteriano predominante em relação ao DNA vegetal, revelado pelas análises de ARDRA e/ou PCR), a banda relacionada a amplicon de mitocôndria de cana-de-açúcar foi sequenciada. Para tal, o DNA amplificado por PCR dos genes 16S rRNA, com os iniciadores 799F e 1492R foram eletroforéticamente separados e as bandas relacionadas aos amplicons de mitocôndria foram cortadas e purificadas utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Subsequentemente, os produtos da PCR purificados foram clonados em vetores pGEM-Teasy (Promega), conforme o fabricante. Por fim células de *Escherichia coli* DH5alfa quimiocompetentes (NEB) foram transformadas com os vetores gerados acima, por meio do protocolo proposto pela fabricante.

Após a transformação, as células foram recuperadas em meio LB líquido, e cultivadas por aproximadamente 12 h a 37 °C em meio LB (BERTANI, 1951) sólido, suplementado com 100 µg mL⁻¹ de ampicilina, 0,5 mM de IPTG e 40 µg mL⁻¹ de X-gal. Cerca de 3 clones foram selecionados e seu DNA plasmidial foi sequenciado pelo método de Sanger. As sequências foram avaliadas quanto a sua similaridade com sequências de 16s rRNA de mitocôndrias de outras gramíneas utilizando o BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997) tendo com o banco “nr” do NCBI como referência.

3.4.9 Sequenciamento, em larga escala, dos genes 16S rRNA e análise de diversidade e riqueza da microbiota endofítica

As amostras de DNA de bactérias endofíticas de base de colmo de cana-de-açúcar, enriquecidas conforme o protocolo descrito acima, foram enviadas ao grupo parceiro da UFPR e submetidas ao sequenciamento em larga escala dos genes 16S rRNA. Para isto foram amplificadas por meio da PCR utilizando iniciadores 515f (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806r (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') e adaptadores descritos/construídos por CAPORASO et al., 2011, na qual flanqueiam regiões de hiper-variabilidade – v4 dos genes de 16S rRNA, utilizando 1× KlenTaq DV Ready Mix (Sigma-Aldrich), 5 pmol de cada iniciador, e 10 ng de amostra em reações de 10 µL, sendo estes amplificados em um ciclo com uma desnaturação inicial a 96 °C por 2 min, e 25 ciclos a 96 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg, e 68 °C por 60 s. Em seguida os produtos de PCR foram sequenciados na plataforma Illumina MiSeq em *pair-ends*. Os dados do sequenciamento foram analisados utilizando o software MOTHUR v.1.35.1 (SCHLOSS et al., 2009), onde foram montados contigs a partir dos *reads forward* e *reverse (pair-ends)* e as sequencias contíguas foram alinhadas utilizando o banco de dados SILVA SEED v119 (disponível em <https://www.mothur.org>) como arquivo de referência. Sequencias ambíguas, quiméricas e maiores que 275 pb foram removidas e as amostras foram normalizadas reduzindo o número das diferentes sequencias em proporção ao número de *reads* da menor amostra. Apenas as sequencias de alta qualidade e normalizadas foram utilizadas para a classificação taxonômica, construção das matrizes de distância; clusterização das sequencias em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU – *Operational Taxonomic Units*), ou seja, agrupamento de sequencias semelhantes; construção dos gráficos de rarefação e os cálculos dos índices de diversidade (SHANNON, 1949; SIMPSON, 1949) e riqueza (CHAO; BUNGE, 2002). As sequencias representativas de cada OTU foram submetidas a duas classificações para a confirmação da classificação espécies/gêneros, baseadas em comparação com o banco de dados SILVA SEED e não redundante (nr) do NCBI (acesso em 18-02-2016). Foi avaliado também, de acordo com dados da literatura, a importância agrobiotecnológica dos gêneros/espécies (OTUs) detectadas neste trabalho.

3.4.10 Compilação de dados para definir o grupo de gêneros bacterianos endofíticos mais citados em tecidos de cana-de-açúcar

Uma busca na literatura por dados de gêneros de bactérias endofíticas isolados/detectados, a partir de tecidos de cana-de-açúcar superficialmente-desinfestados e caracterizados através do sequenciamento do gene 16S rRNA, de trabalhos dos últimos anos (MENDES et al., 2007; LUVIZOTTO et al., 2010; MEHNAZ; BAIG; LAZAROVITS, 2010; TAULÉ et al., 2012; DE SANTI FERRARA et al., 2012; BENEDUZI et al., 2013; MAGNANI et al., 2013; ROUWS et al., 2014; MUANGTHONG; YOUPENSUK; RERKASEM, 2015; ARMANHI et al., 2016; DE SOUZA et al., 2016) foi realizado para serem compilados juntamente com os dados deste presente trabalho, com a finalidade de estabelecer um grupo de gêneros/espécies mais presentes nos tecidos de cana-de-açúcar. O critério utilizado para definir este grupo consistiu em selecionar os gêneros com frequência ≥ 3 dos dados compilados.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 Obtenção do DNA metagenômico enriquecido de bactérias endofíticas de tecidos de colmo de cana-de-açúcar

Um protocolo de enriquecimento para células bacterianas endofíticas foi estabelecido (DOS-SANTOS et al., 2017) baseado em trabalhos já publicados, no qual consiste em etapas de centrifugações, filtrações, lavagens com água ultrapura estéril e tratamento com nucleases (JIAO et al., 2006; WANG et al., 2008; IKEDA et al., 2009; SESSITSCH et al., 2012).

O procedimento de desinfestação superficial adotado neste presente trabalho foi eficiente em eliminar os microrganismos dos colmos descascados, visto que após o período de incubação (uma semana) da placa de petri contendo o meio DYGS suplementado com 2,5% de caldo de cana-de-açúcar tocado com um colmo desinfestado, não apresentou crescimento microbiano (formação de colônias) (Figura 1).



Figura 1: Teste de verificação da desinfestação superficial.

A presença da bactéria repórter durante o enriquecimento foi quantificada através da contagem das células fluorescentes no material enriquecido, que mostrou um decréscimo não significativo do número de células (redução de ~100x, partindo de 10^{10} células iniciais para 10^8 no final) (Figura 2) e uma grande redução (~10.000x) da biomassa (1 kg de colmo para um pellet de ~100 mg).

Também com a finalidade de confirmar o enriquecimento das bactérias endofíticas juntamente das bactérias repórter, o material enriquecido foi inoculado em meio rico para a verificação da viabilidade das bactérias. Após a incubação pode ser observado uma variedade de unidades formadoras de colônias (UFCs) (Figura 3). Análises microscópicas da amostra enriquecida, também confirmou o enriquecimento através da detecção de estruturas similares a de células bacterianas (Figura 4), indicando que o enriquecimento foi eficiente e preservou as bactérias.

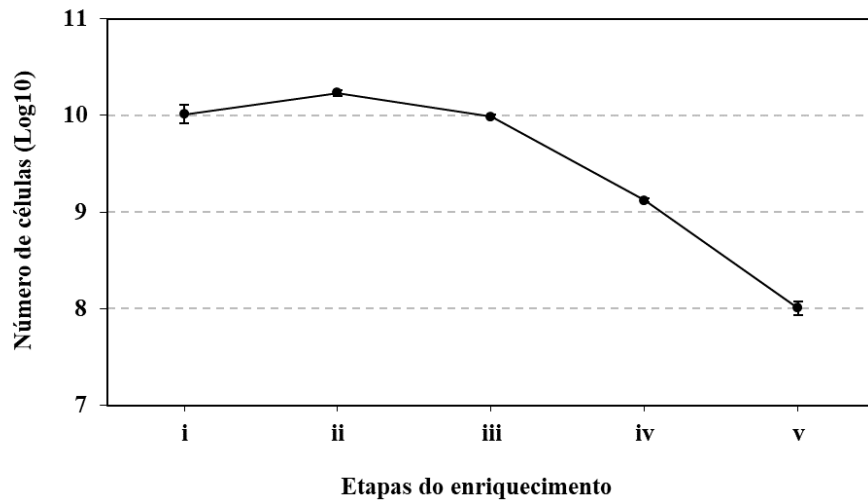


Figura 2: Número total de células de bactéria repórter durante os passos de enriquecimento. Etapas: 'i' homogeneização do tecido; 'ii' centrifugação a 1.000 x g; 'iii' filtragens; 'iv' lise das organelas/lavagens; 'v' remoção do DNA vegetal/tratamento com nucleases.

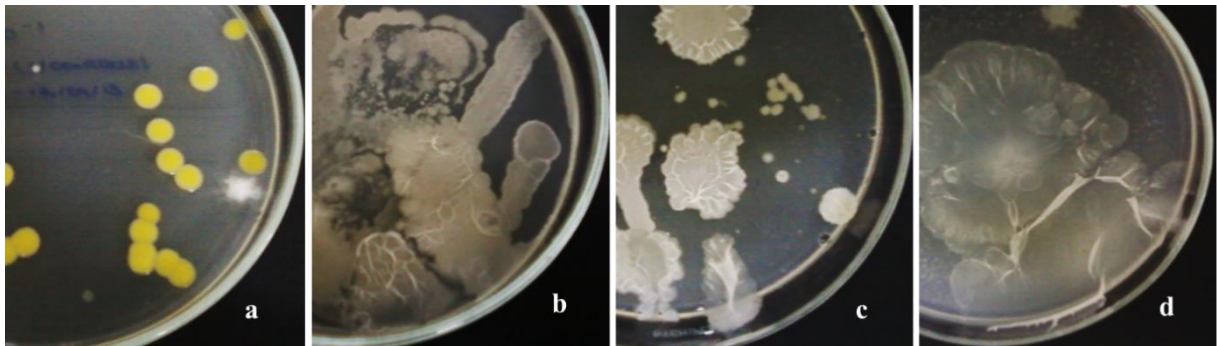


Figura 3: Colônias obtidas com a semeadura do material enriquecido. 'a' Não diluída; 'b', 'c', 'd' diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . 'a' e 'b' são sem bactéria repórter, 'c' e 'd' com bactéria repórter.

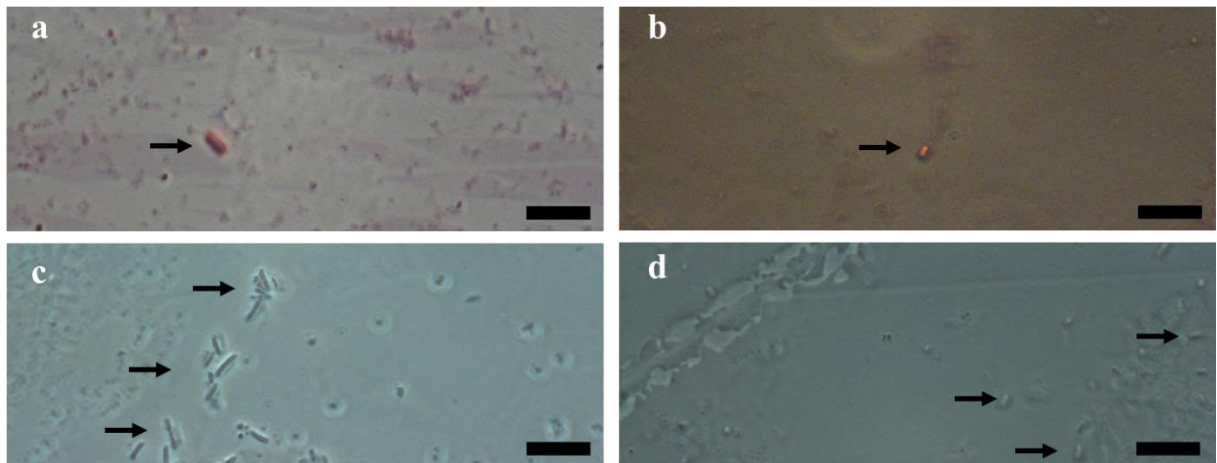


Figura 4: Micrografias do material enriquecido. 'a' e 'b' teste de Gram. 'c' e 'd' microscopia de contraste de fase. 'a' e 'b' representam a amostra enriquecida sem a bactéria repórter e 'c' e 'd' contém a presença da bactéria repórter. As setas indicam estruturas bacterianas. Barras de escalas: 10 μ m.

Estes resultados indicaram que o procedimento de enriquecimento bacteriano endofítico foi eficiente em preservar as células bacterianas, permitindo se obter bactérias viáveis, com diversidade e com uma pequena perda de células. Após estas confirmações, o enriquecimento das três amostras de cana-de-açúcar (utilizando 1 kg de base de colmo) utilizadas nas demais análises deste trabalho foi realizado por completo, sem utilizar a bactéria repórter.

Em relação ao método de extração de DNA tem sido utilizado o proposto por Virupakshi & Naik (2007). O DNA metagenômico, das três amostras descritas neste trabalho, foi avaliado por fluorimetria e espectrometria, obtendo uma média de ~10 ng de DNA dupla fita de bactérias endofíticas (Tabela 2), e demonstrou ser de qualidade suficiente para amplificação por PCR.

Tabela 2: Análise quantitativa por espectrofotometria e fluorimetria das amostras de DNA metagenômico

Amostras	Razões de absorbância		Massa total de DNA (ng)	
	260/230	260/280	Nanodrop	Qubit
A1	1,81	0,90	494	5.66
A2	1,55	1,30	290	5.44
A3	1,88	1,38	1.280	14.16

3.5.2 Perfil de ARDRA do DNA metagenômico endofítico

Wang e colaboradores em 2008 em seu estudo demonstraram que uma enzima adequada poderia seletivamente clivar o produto de PCR do 16S rDNA de cloroplasto vegetal em um sítio único gerando dois fragmentos apenas, enquanto que em 16S rDNA bacteriano não ocorreria a clivagem. O resultado desta digestão é facilmente identificável em uma simples análise por eletroforese. Subsequentemente, aprimorando a metodologia para o estudo metagenômico de bactérias endofíticas de cana-de-açúcar, Schwab e colaboradores (2014) realizaram algumas análises *in silico* e selecionaram uma enzima de restrição que cliva somente uma vez esta região em cloroplasto de cana-de-açúcar. Neste caso a enzima selecionada foi a *NsiI*, a mais adequada.

A análise por ARDRA foi realizada utilizando controles bacterianos, uma amostra de DNA total de folha e de colmo (não enriquecido), seguido das amostras de DNA metagenômico enriquecido (deste presente trabalho). O resultado pode ser visto na Figura 5a, na qual foi possível observar que para as amostras enriquecidas, os fragmentos relacionados ao DNA de cloroplastos têm sua intensidade em gel de agarose reduzida, sugerindo assim a diminuição das fitas molde deste DNA e consequentemente a baixa amplificação deste DNA por PCR. Sendo assim, pode-se concluir que o método adotado para enriquecer o DNA bacteriano em relação ao DNA vegetal é válido para o contexto deste presente trabalho.

3.5.3 Perfil de PCR do DNA metagenômico endofítico

Amplificações do DNA de bactérias e de mitocôndria foram feitas em uma mesma PCR a fim de avaliar o enriquecimento das células alvo deste trabalho (bactérias endofíticas). A PCR com os iniciadores 799F e 1492R foi realizada como forma complementar a análise de ARDRA, pois conforme descrito na metodologia, nas análises *in silico* os iniciadores utilizados na ARDRA não se anelaram a sequências genômicas de mitocôndrias, o que geraria dúvidas quanto à avaliação da efetividade do enriquecimento. Segundo Sun e sua equipe (2007), os iniciadores 799F e 1492R se anelam ao rRNA de mitocôndria de plantas de arroz além de sequências de bactérias. A planta de arroz (*Oryza sativa*), segundo o NCBI, também é

uma planta dentro da família *poaceae* a qual pertence a cana-de-açúcar. O resultado neste caso são dois fragmentos de diferentes tamanhos, um relacionado ao gene 16S de mitocôndria e o outro o de bactérias.

Uma PCR utilizando esses iniciadores foi realizada, e seu resultado representado na Figura 5b. Conforme pode observar, amplificados de mitocôndrias e bactérias resultam em fragmentos de tamanhos diferentes. Podendo assim, avaliar o enriquecimento do DNA bacteriano endofítico de cana-de-açúcar, juntamente com ARDRA.

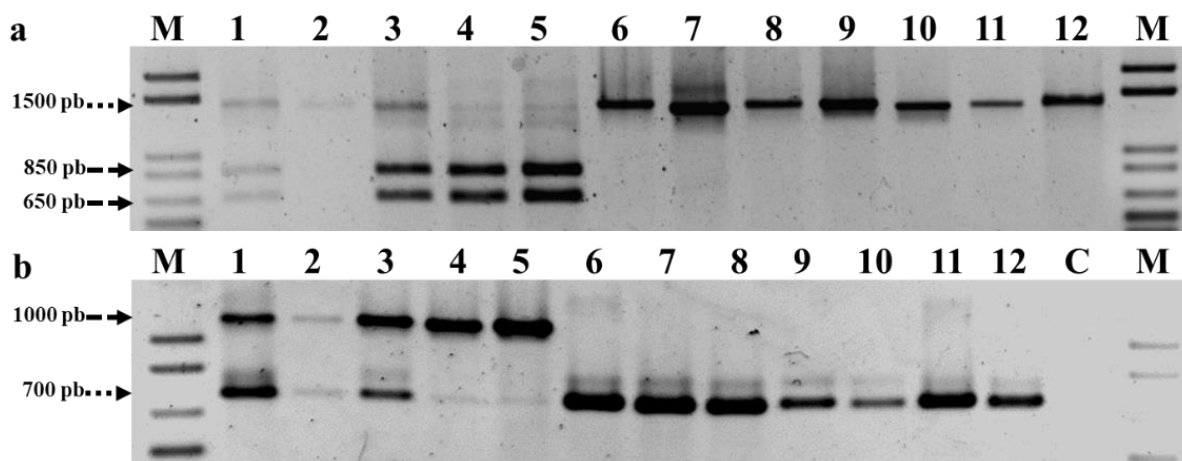


Figura 5: Perfis moleculares do material enriquecido. 'a' Perfil de ARDRA após a amplificação com os iniciadores 27f e Amp2 e digestão com *Nsi*I. 'b' Perfil de amplificação do gene 16S rRNA utilizando os iniciadores 799f e 1492r. Setas pontilhadas indica o perfil de bactérias e as tracejadas indicam o perfil de planta (mitocôndria e cloroplasto). 1, 2 e 3 correspondem ao DNA metagenômico de bactérias endofíticas enriquecidos da base de colmo de cana-de-açúcar (sem a bactéria repórter). 4 e 5 DNA total de cana-de-açúcar de amostras de folhas e colmo, utilizando o protocolo original de Virupakshi e Naik et al., 2007. 6-12 controles bacterianos (estirpe Ppe8 de *Burkholderia tropica*, DH10B de *Escherichia coli*, PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*, *Bacillus* spp., e *Nocardioides* spp). E 'C' branco da PCR. M marcador 1 kb Plus (Invitrogen).

3.5.4 Perfil das seqüências da biblioteca de genes 16S rRNA

Em relação aos clones de amplicons de mitocôndria, ficou confirmada a eficácia dos iniciadores em selecionar diferencialmente tais sequencias descrita por Sun et al. (2007), pois após a análise de similaridade utilizando o programa BLASTn, observou-se forte semelhança a sequencias de mitocôndria de plantas da família *Poaceae* (gramíneas) contidas no banco de dados do NCBI, como Milho, Sorgo e Capim gigante (Tabela 3); entretanto, até o momento desta análise, não foi possível encontrar na base de dados seqüência de mitocôndria para plantas de cana-de-açúcar. Sendo assim, a seqüência parcial relativa ao 16s rRNA de mitocôndria de cana-de-açúcar foi depositada no banco de dados GenBank, sob o número de acesso KX752573.

Tabela 3: Similaridade das sequencias de 16S rRNA de mitocôndria ao banco de dados “nr” do NCBI.

	Organismo	Identidade	Código Genbank
Mitocôndria	<i>Tripsacum dactyloides</i> (Capim gigante)	99 %	DQ984517.1
16S rRNA	<i>Sorghum bicolor</i> (Sorgo)	99 %	DQ984518.1
	<i>Zea mays</i> (Milho)	97 %	DQ490951.2

Foram sequenciadas também pelo método Sanger, desta vez na empresa Macrogen (Coréia do Sul) os fragmentos relacionados a cloroplastos gerados pela digestão com a enzima *NsiI* na análise por ARDRA. Resultados das análises das sequencias dos fragmentos de cloroplastos por meio do BLASTn revelaram similaridade com sequências de cloroplasto de cana-de-açúcar e outras *Poaceae* depositadas no NCBI, demonstrando que a enzima adotada para essa avaliação do enriquecimento é válida em reconhecer DNA de cloroplasto e não clivar o DNA bacteriano, gerando assim distinção dos fragmentos em gel de agarose.

3.5.5 Diversidade, riqueza e perfil taxonômico das amostras metagenômicas

Aproximadamente 70.200 *reads* foram obtidos nos dados brutos do Illumina MiSeq. Os dados brutos foram depositados no banco de dados *Sequence Read Archive* (SRA) sob o número de acesso SRP082262. Após a etapa de filtragem por qualidade e montagem de *contigs* das sequencias, ~60.600 *reads* foram classificados como sendo de alta qualidade. Apenas 0,9 % dessas sequências foram classificadas como sendo quimeras. A etapa de normalização resultou em ~54.000 sequencias e 144 OTUs no total, ou seja, uma amostragem de ~18.000 sequencias para cada amostra. As curvas de rarefação não demonstraram diferenças significativas entre as amostras (Figura 6). Os índices de riqueza e diversidade (Tabela 4) também não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,03$) entre as amostras e, ainda, revelaram uma microbiota diversa e rica, indicando que o procedimento de enriquecimento bacteriano descrito neste trabalho manteve a diversidade esperada de bactérias endofíticas.

Tabela 4: Índices estimados de riqueza e diversidade para cada amostra metagenômica

Amostras	OTUs Observadas	Índices de Riqueza e Diversidade*		
		Chao1	Simpson	Shannon
A1	79	98,5 (86,09; 132,45)	0,61 (0,60; 0,61)	1,0 (0,98; 1,03)
A2	68	85,0 (73,34; 122,16)	0,48 (0,47; 0,48)	1,3 (1,27; 1,32)
A3	76	97,0 (83,29; 136,45)	0,25 (0,25; 0,26)	1,9 (1,93; 1,97)

*Os valores dos limites do intervalo de confiança de 97 % estão representados entre parênteses

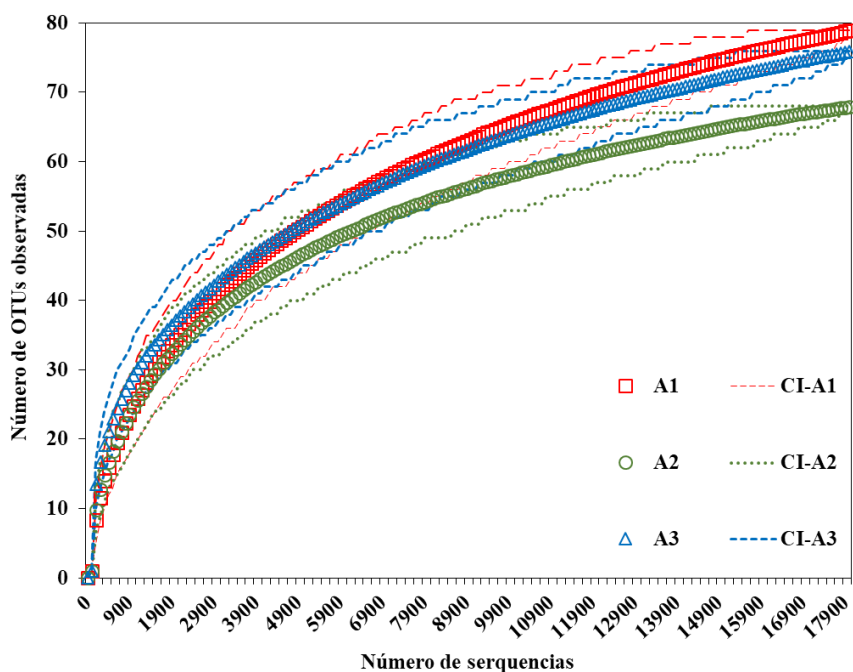


Figura 6: Curva de rarefação das amostras normalizadas calculada com 3 % de dissimilaridade. CI = Intervalo de confiança.

A classificação taxonômica das OTUs presentes em todas as amostras revelou baixo número detectável de sequências relacionadas a plastídios (cianobactéria/cloroplasto) e mitocôndria (Rickettsiales/mitocôndria), quando comparadas ao número total de sequências relacionadas a bactérias (Tabela 5).

Tabela 5: Porcentagem de sequências após a normalização.

Classificação	Média (%)	Número de sequências detectadas por amostra		
		A1	A2	A3
Rickettsiales/mitocôndria	0,07	0,03	0,00	0,19
Cianobactéria/cloroplasto	0,03	0,02	0,02	0,07
Bactéria	99,89	99,95	99,98	99,75

A classificação taxonômica das OTUs relacionadas a bactérias, demonstrou que os grupos mais dominantes, ou seja, com maior número de sequências/OTUs, em todas as amostras foram das Proteobactérias (~54% das OTUs detectadas), seguida por Firmicutes (~16%), Bacteroidetes (~9%) e Actinobacterias (~8%); foram detectadas também OTUs não classificadas (~6%) (Figura 7).

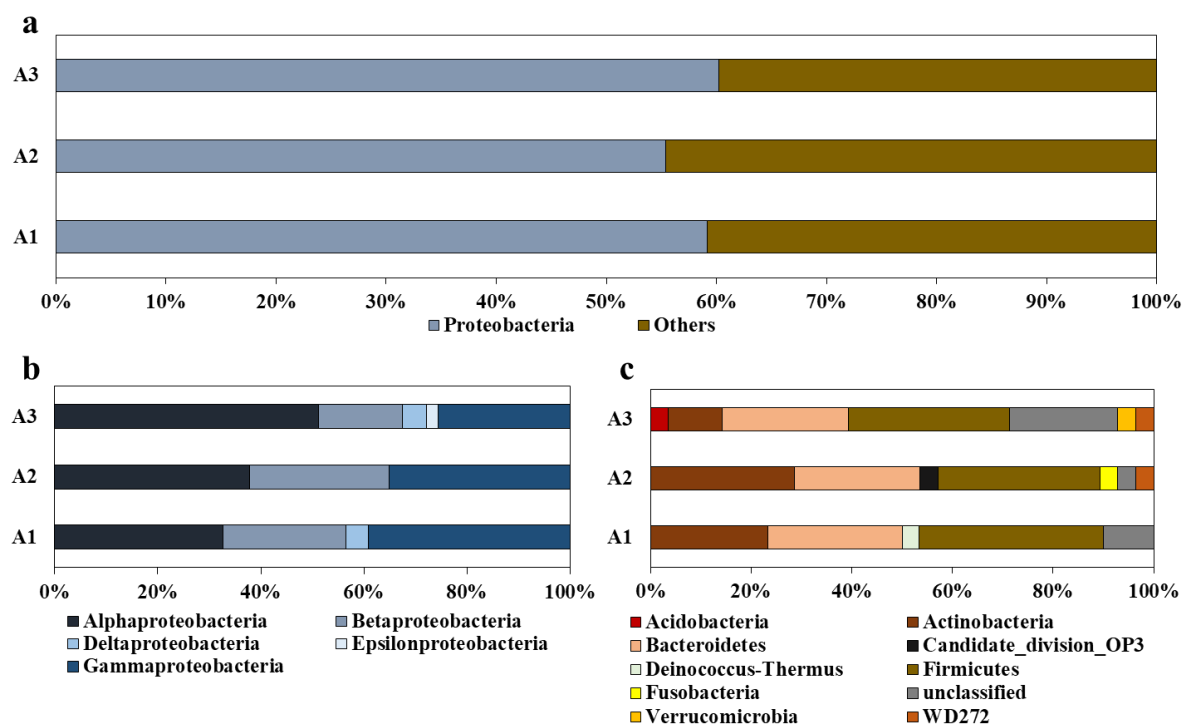


Figura 7: Diversidade de filós dos OTUs detectados nas amostras A1, A2 e A3. ‘a’ Proteobacteria. ‘b’ Subdivisões de Proteobacteria. ‘c’ Outros Filós.

A Classificação taxonômica das OTUs revelou um a grande diversidade de gêneros (Anexo A) já relatados em outros trabalhos com tecidos de cana-de-açúcar (Anexo B) e ainda gêneros não-relatados e/ou ainda não cultiváveis (segundo o NCBI). Comparações com dados da literatura indicaram que as OTUs detectadas neste presente trabalho possuem características de interesse agrobiotecnológico, principalmente relacionados a promoção de crescimento vegetal (Anexo A). E a compilação dos dados da literatura a respeito dos gêneros já detectados em amostras de cana-de-açúcar, resultou em um grupo de 22 gêneros. Cerca de 16 % dos gêneros deste grupo foram detectados nas OTUs descritas neste presente trabalho (Anexo C).

3.6 DISCUSSÃO

O estudo de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar iniciou-se com o uso de técnicas baseadas em cultivo focando, principalmente, de bactérias diazotróficas (DÖBEREINER, 1992; OLIVARES et al., 1996; URETA et al., 1995). Porém, verificou-se que ainda existe um grande número de bactérias que não são cultiváveis (revisado por REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011). A introdução de técnicas independentes de cultivo que utilizam o gene 16S rRNA no estudo de microbiotas (como a eletroforese em gel desnaturante (DGGE), polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição terminal (tRFLP), e bibliotecas de clones de 16S rRNA), possibilitaram um melhor panorama da microbiota em relação às técnicas baseadas em cultivo (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). O surgimento de tecnologias de sequenciamento em larga escala, conhecidos como *next-generation sequencing*, tem permitido ampliar ainda mais o conhecimento sobre microbiotas, sem a necessidade de clonagem dos genes 16S rRNA (ZHANG et al., 2011). BULGARELLI e colaboradores em 2012, por exemplo, utilizaram esta abordagem com a planta modelo *Arabidopsis thaliana* para comparar a estrutura da microbiota presente no solo e no rizoplaneo. Entretanto, é sabido que a microbiota endofítica está em baixo número em relação a microbiota do solo e a quantidade de células vegetais (BULGARELLI et al., 2013). Este fato faz com que seja necessário uma etapa de enriquecimento destas bactérias no estudo da microbiota endofítica, evitando assim a excessiva presença de DNA vegetal (como o de mitocôndria, cloroplasto e nuclear) (WANG et al., 2008; SESSITSCH et al., 2012). Neste contexto, tem-se utilizado a técnica de PCR utilizando iniciadores que capazes de distinguir o DNA vegetal do bacteriano através de amplicons de tamanhos diferentes (SUN et al., 2008; CHELIUS; TRIPLETT, 2001), porém sabe-se que por si só esta técnica é seletiva, e os erros produzidos poderiam refletir no perfil microbiano (BECKER et al., 2000; SIPOS et al., 2007). Atualmente, tem sido introduzida no contexto do estudo de comunidades microbianas a Polimerase Phi29 DNA a fim de tentar solucionar o problema do baixo número de células, onde é possível amplificar todo o genoma (ou metagenoma) de uma determinada amostra (YOKOUCHI et al., 2006). Esta técnica poderia ser aplicada no estudo da microbiota endofítica, entretanto, questionamentos foram levantados a respeito do quanto esta amplificação interfere na estrutura da microbiota, presumindo-se que ainda há a necessidade de mais investigações sobre sua validação no estudo de metagenomas (YILMAZ; ALLGAIER; HUGENHOLTZ, 2010). Deste modo, acredita-se que a melhor forma de analisar uma microbiota é diminuir o máximo possível de DNA vegetal e o uso de técnicas que poderiam gerar mudanças na composição do DNA metagenômico.

Tendo como base estas colocações, o presente trabalho buscou estabelecer uma metodologia de enriquecimento para as bactérias endofíticas dos tecidos de colmo de cana-de-açúcar, preservando a viabilidade das bactérias para se obter DNA íntegro e presença reduzida de DNA vegetal; adaptando as etapas de enriquecimento previamente reportadas (JIAO et al., 2006; WANG et al., 2008; IKEDA et al., 2009; SESSITSCH et al., 2012). Alguns métodos de processamento de colmo de cana-de-açúcar foram testados, como por exemplo a maceração com pistilo e gral (TRIBOUSH; DANILENKO; DAVYDENKO, 1998; VIRUPAKSHI; NAIK, 2007) e liquidificador (BAKKEN, 1985; WANG et al., 2008). A maceração exigiu muito mais tempo e labor, e interferiu na integridade das células bacteriana endofíticas. Métodos que utilizaram o liquidificador com água ou outros tampões para processar as amostras não preservaram a viabilidade bacteriana (TRIBOUSH; DANILENKO; DAVYDENKO, 1998; VIRUPAKSHI; NAIK, 2007; WANG et al., 2008). O melhor processamento foi utilizando o liquidificador com tampão adaptado do original MTEN de

Virupakshi e Naik (2007) sem os compostos osmoticamente ativos. As lavagens com água e suspensão hipotônica lisaram as células vegetais e as células bacterianas permaneceram intactas (CAPLAN; GREENAWALT, 1966). Foram observadas também muitas fibras menores na suspensão após a etapa do processamento dos tecidos. Sendo assim, a fim de eliminar da suspensão essas fibras e possíveis fungos, foram adicionadas as etapas de filtragens (SESSITSCH et al., 2012). Após as lavagens com água, possivelmente estavam em suspensão as células bacterianas, DNA vegetal e talvez de outros organismos associados, como fungos e insetos, por exemplo. Portanto, um tratamento enzimático tornou-se necessário para eliminar essas contaminações. Nesta etapa, foi observado que o tempo de reação enzimática de 1 h conforme descrito por Triboush et al. (1998) e Sessitsch et al. (2012) não foi suficiente em nossas amostras, então alterou-se este tempo para ~16 hs (ou durante a noite). Ao término da extração de DNA, o procedimento de enriquecimento demonstrou baixa presença de DNA vegetal nas amostras conforme os resultados de ARDRA e PCR, permitindo que fosse possível detectar um alto número de sequência de DNA bacteriano nas demais análises da microbiota.

Os índices estimadores de riqueza e diversidade utilizados neste trabalho (Tabela 4) demonstraram que o procedimento não interferiu significativamente na composição da comunidade, visto que, o estimador Chao1, que baseia-se na ideia que se uma comunidade está sendo amostrada e espécies raras ainda estão sendo descobertas, provavelmente ainda há espécies mais raras não encontradas (CHAO, 1984; CHAO; BUNGE, 2002), demonstrou valores estimados maiores do que os observados. O índice de diversidade Simpson, calcula a probabilidade de dois indivíduos selecionados ao acaso em uma amostra serem pertencentes à mesma espécie. Assim, assume-se que quanto maior o valor, menor é a diversidade de espécies estimada para a amostra (LUDWIG; REYNOLDS, 1988; SIMPSON, 1949). De modo contrário é expresso o valor para o índice Shannon. Neste é expresso o grau de incerteza que existe em se predizer a qual espécie pertence um indivíduo escolhido ao acaso em uma comunidade, ou seja, quanto maior for essa incerteza, maior será o valor e maior será a diversidade da amostra. (LUDWIG; REYNOLDS, 1988; SHANNON, 1949).

Trabalhos sobre a comunidade bacteriana de cana-de-açúcar concentraram-se principalmente na microbiota das raízes na última década, e também revelaram diazotróficos ativos das subdivisões alfa e beta-proteobactérias, além de outras bactérias previamente não caracterizadas ou desconhecidas (BURBANO et al., 2011; THAWEENUT et al., 2011; FISCHER et al., 2012). Neste trabalho, também foi detectada a prevalência de Proteobactérias em todas as amostras e, entre elas, as bactérias que podem contribuir para a fixação biológica do nitrogênio na cana-de-açúcar, conforme relatado anteriormente (FISCHER et al., 2012). Outras investigações em bactérias endofíticas em colmo de cana-de-açúcar através de abordagens dependentes e independentes de cultivo mostraram um elevado número de sequências classificadas como *Enterobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. (MAGNANI et al., 2010, 2013). Contudo, no caso das análises independentes de cultivo, limitou-se à baixa cobertura de bibliotecas de clones de amplicons do gene 16S rRNA. No presente estudo, visando uma cobertura mais profunda, utilizando-se o sequenciamento de alto rendimento (Illumina MiSeq) para avaliar a diversidade das bactérias endofíticas enriquecidas, foi possível detectar membros da família *Enterobacteriaceae* (incluindo *Yersinia nurmii*, *Salmonella enterica*, *S. bongori* e *Leuconostoc gelidum*), e *Pseudomonas* spp. (Anexo I).

Ao utilizar uma abordagem dependente de cultivo (captura de bactérias utilizando uma “planta-armadilha”), Rouws et al. (2014) identificaram membros do gênero *Bradyrhizobium* spp. a partir de tecidos internos de raízes de cana-de-açúcar, da mesma variedade utilizada no presente trabalho (RB867515). Em todas as amostras deste presente trabalho, foram detectados membros desse gênero e de outros da família *Bradyrhizobiaceae*, como *Rhodopseudomonas* sp. e *Bosea* sp. (Anexo A), sugerindo que são necessárias mais

investigações sobre o papel desempenhado por estas bactérias para a fixação de nitrogênio na cana-de-açúcar (ROUWS et al., 2014). Também com base em uma abordagem independente de cultivo para investigar bactérias diazotróficas associadas a raízes de uma variedade comercial de cana-de-açúcar (Q208A), Paungfoo-Lonhienne et al. (2014) identificaram as bactérias mais abundantes na rizosfera e raízes submetidas a fertilização nitrogenada subótima, e estas incluíram OTUs relacionadas a *Streptomyces*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Burkholderia* e *Rhizobium* sp. Os autores também isolaram uma nova espécie de *Burkholderia* (*B. australis* sp. nov.), e esta bactéria foi caracterizada, através de ensaios de inoculação de plântulas, como uma fixadora de nitrogênio e promotora de crescimento vegetal. Nas amostras do presente estudo, foram detectadas bactérias membros da família *Burkholderiaceae*, incluindo os gêneros *Cupriavidus*, *Ralstonia* e *Burkholderia* (Anexo A). Membros de *Rhizobium*, *Bacillus* e outro gênero dentro da classe *Bacillus*, *Lactobacillus*, também foram identificados. A presença de bactérias destes gêneros (nomeadamente *Burkholderia* e *Rhizobium*) também foi relatada por Fischer et al. (2012) através de uma abordagem independente de cultivo baseada na caracterização molecular pela diversidade de 16S rRNA e *nifH*, e utilizando a mesma variedade de cana utilizada neste trabalho (RB867515).

Em um trabalho recente, YEOH et al. (2016), com o objetivo de definir o microbioma central (*core microbiome*) de raízes de cana-de-açúcar cultivadas sob diferentes níveis de fertilizantes nitrogenados, concluiu que existe um grupo de 18 famílias bacterianas compartilhadas entre a microbiota de raízes de cana-de-açúcar e *Arabidopsis thaliana*. Estas famílias estão dentro dos grupos taxonômicos de Actinobactérias, Bacteroidetes, Alfa- Beta- e Delta-Proteobacteria. Esses autores também concluíram que existem 10 famílias não presentes em *Arabidopsis*, ou seja, *Conexibacteraceae*, *Cyclobacteriaceae*, *Cytophagaceae*, *Sphingobacteriaceae*, *Kledonobacteraceae*, *Enterobacteriaceae*, *Steroidobacteraceae*, *Kofleriaceae*, *Spirocheataceae* e uma família não classificada da ordem Verrucomicrobia (auto67_4w). Os membros das famílias de *Cyclobacteriaceae*, *Sphingobacteriaceae* e *Enterobacteriaceae* também foram detectados nas bases de colmo da cana-de-açúcar (analisadas neste estudo), conforme descrito anteriormente com relação às raízes da cana-de-açúcar. Essas famílias também foram relatadas em um trabalho recente sobre a microbiota bacteriana e fúngica (DE SOUZA et al., 2016), utilizando os tecidos de colmo, folhas e raízes da cana-de-açúcar variedade SP80-3280. Ainda no mesmo trabalho, os autores relataram uma forte presença de membros das famílias *Sphingomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*, *Acetobacteraceae*, *Moraxellaceae* e *Pseudomonadaceae*. No presente trabalho, foram também detectadas bactérias não classificadas e outras não relatadas anteriormente para os tecidos de cana-de-açúcar (82 OTUs, Anexo I), membros da "Candidate_division_OP3", "WD272".

Os dados do presente trabalho, juntamente com os da literatura, permitiram a identificação de um grupo de gêneros de bactérias endofítica mais citado (Anexo C). Comparando a composição desse grupo com OTUs detectada no presente trabalho, é possível observar que 23 OTUs, pertencentes a 12 gêneros, estão incluídas no grupo de gêneros mais citados (correspondendo a ~ 16% do número total de OTUs detectadas neste trabalho). Os 12 gêneros foram *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Bosea*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Novosphingobium*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* e *Stenotrophomonas*. É interessante notar que todos os gêneros desse grupo também são encontrados na endosfera do colmo de outras plantas de *Poaceae*, como arroz (SUN et al., 2008; IKEDA et al., 2010), sorgo (MAREQUE et al., 2014; MAROPOLA; RAMOND; TRINDADE, 2015), milho (CHELIUS; TRIPLETT, 2001; ROESCH et al., 2008) e trigo (CONN; FRANCO, 2004; ROBINSON et al., 2016). Estes resultados indicam um possível padrão da endosfera entre a família *Poaceae*. Quando comparado com a descrita microbiota de *A. thaliana*, observou-se também que os gêneros *Bacillus*, *Caulobacter*, *Microbacterium*,

Ochrobactrum, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas* e *Streptomyces* foram comuns às duas espécies de plantas, sugerindo um amplo perfil de hospedeiro destes gêneros bacterianos na colonização da endosfera da planta.

Os endófitos de cana-de-açúcar bacterianos foram isolados pela primeira vez para a atividade de fixação de N₂ usando os diversos meios de cultivos semissólidos, como revisto recentemente BALDANI et al., (2014), e incluem estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Nitrospirillum amazonense* (anteriormente *Azospirillum amazonense*), *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Burkholderia tropica*, *B. unamae*, entre outros (BALDANI et al., 1992; REIS; OLIVARES; DÖBEREINER, 1994; OLIVARES et al., 1996; SAJJAD MIRZA et al., 2001; LOIRET et al., 2004; TAULÉ et al., 2012; DE SANTI FERRARA et al., 2012; BENEDUZI et al., 2013). Entre essas espécies bacterianas, *G. diazotrophicus* foi isolado de cana-de-açúcar plantada em diferentes regiões do mundo, como Brasil e Austrália, e PAL5 é um isolado representativo que é provavelmente o endófito mais bem estudado dessa espécie de planta. No presente estudo, no entanto, essa espécie não foi detectada nas amostras. Até onde sabemos, apenas três trabalhos anteriores estudaram os endófitos de cana-de-açúcar utilizando a abordagem independente de cultivo (MAGNANI et al., 2013; ARMANHI et al., 2016; DE SOUZA et al., 2016), e apenas um deles indicou a presença de *G. diazotrophicus* (e outros diazotróficos) (DE SOUZA et al., 2016). Isto está, no entanto, pouco claro, uma vez que essa constatação é apenas mencionada no texto, enquanto que a bactéria não aparece entre os resultados. Por outro lado, tem sido sugerido que a abundância de *G. diazotrophicus* nos tecidos de cana-de-açúcar depende do genótipo, idade e parte da planta, sendo maior nas raízes mais jovens (GOMES et al., 2005). Além disso, é possível que estudos dependentes de cultivo favoreçam o enriquecimento e a detecção de *G. diazotrophicus*. Assim, apesar de suas grandes contribuições potenciais para a fixação de nitrogênio e outros benefícios para a planta hospedeira, parece que esta bactéria não é uma das mais abundantes dentro do colmo de cana-de-açúcar.

3.7 CONCLUSÕES

- ✓ O procedimento de enriquecimento de bactérias endofíticas de cana-de-açúcar foi eficiente para a obtenção de amostras de DNA metagenômico diverso e rico de bactérias, com baixa presença de DNA de plastídios (cloroplastos) e mitocôndria.
- ✓ Há um grande número de OTUs pertencentes ao grupo das Proteobacterias em colmo de cana-de-açúcar, condizente com trabalhos publicados sobre a microbiota de cana-de-açúcar.
- ✓ OTUs de bactérias ainda não classificadas foram detectadas.
- ✓ As semelhanças entre os grupos taxonômicos presentes na amostra enriquecida e os dados publicados indicam que a presente abordagem não afetou significativamente a composição da comunidade bacteriana endofítica dos colmos inferiores da cana-de-açúcar e pode ser aplicada para análise por sequenciamento em larga escala.

4 CAPÍTULO II

ANÁLISE TAXONÔMICA DA COMUNIDADE BACTERIANA PRESENTE NO LÍQUIDO EXTRAÍDO DO APOPLASTO DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR

4.1 RESUMO

O apoplasto tem sido descrito como um possível nicho para o estabelecimento de bactérias endofíticas. Na cana-de-açúcar, este local ocupa ~3% do volume dos colmos e é um significativo local de armazenamento de açúcares. As características do apoplasto, como pH, quantidade de açúcares e temperatura estão perto do ótimo para o crescimento bacteriano, o que sugere um maior número de células bacterianas neste nicho. Trabalhos que visaram elucidar o número de células bacterianas neste local têm definido a presença de $\sim 10^5$ células por mL de líquido do apoplasto. Na literatura existem poucos relatos da diversidade bacteriana do apoplasto e, em sua maioria, tem avaliado somente a presença de bactérias diazotróficas por métodos dependentes de cultivo. Até o presente não existe uma avaliação mais ampla da diversidade bacteriana no líquido do apoplasto, sendo assim este estudo buscou elucidar a comunidade bacteriana do líquido do apoplasto de duas variedades de cana-de-açúcar e, para tanto foi utilizado uma abordagem independente de cultivo e sequenciamento em larga escala dos genes 16S rRNA para a análise taxonômica da comunidade bacteriana. O número de *reads* obtidos no sequenciamento está dentro do esperado, com uma grande diversidade de filos taxonômicos, com destaque para os mais abundantes que foram: Firmutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia e Planctomicetes. Foi possível detectar a presença de gêneros de espécies bacterianas agronomicamente importantes, inclusive bactérias diazotróficas já descritas em cana-de-açúcar como a *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae*. Os resultados encontrados para as variedades trazem valiosos avanços para a compreensão da comunidade bacteriana do apoplasto da cana-de-açúcar.

Palavras-chaves: Líquido do apoplasto. Bactérias endofíticas. Abordagem independente de cultivo. Cana-de-açúcar.

4.2 ABSTRACT

The apoplast has been described as a potential niche for the endophytic bacteria establishment. In sugarcane, this site occupies ~ 3% of the volume of stem and is a significant sugar storage location. The characteristics of the apoplast, like pH, amount of sugars and temperature are near the optimum for bacterial growth, which suggests a greater number of bacterial cells in this niche. Works that sought to elucidate the number of bacterial cells on this site have defined the presence of ~ 10^5 cells per mL of apoplast sap. In the literature there are few reports of apoplast bacterial diversity and in your most, has evaluated only the presence of diazotrophic bacteria by culture-dependent methods. To date there is no broader evaluation of bacterial diversity in the apoplast sap, so this study sought to elucidate the bacterial community of the apoplast of two varieties of suga cane and, for this purpose we used a culture-independent approach and large-scale sequencing of 16S rRNA genes for the taxonomic analysis of the bacterial community. The number of reads from the sequencing is within expectations, with a wide range of taxonomic phyla, with emphasis on the more abundant that were: Firmutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia and Planctomicetes. It was possible to detect the presence of agriculturally important bacterial species, including diazotrophic bacteria already described in sugarcane as *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae*. The results for the varieties bring valuable advances in understanding bacterial community in the Apoplast of sugarcane.

Keywords: Apoplast sap. Endophytic bacteria. Culture-independent approach. Sugarcane.

4.3 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das plantas mais cultivadas no mundo. Esta cultura teve o potencial de rendimento de cerca de 33 milhões de toneladas de açúcar e 25 bilhões de litros de etanol na safra de 2016/17 (CONAB, 2017) Ao longo dos anos, a cana-de-açúcar tem se destacado pelo seu potencial em ser uma fonte alternativa de energia limpa e renovável para a produção de biocombustível (WANG et al., 2013a) o que tem aumentado o interesse pelo aumento de sua biomassa. Entretanto, a produção de biomassa requer uma grande demanda de nutrientes na forma de fertilizantes, principalmente o nitrogênio, o que limita a sua produção (DAWE, 2000). A busca pela redução da utilização de fertilizantes nitrogenados no cultivo da cana-de-açúcar tem sido direcionada em estudos sobre a utilização de bactérias diazotróficas (URQUIAGA; CRUZ; BODDEY, 1992; OLIVEIRA et al., 2002; BODDEY et al., 2003; BALDANI; BALDANI, 2005). Diferentes espécies de bactérias diazotróficas já foram relatadas como sendo endófitas em tecidos de cana-de-açúcar, como por exemplo a *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE; DOBEREINER, 1988) e *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986).

As bactérias endofíticas podem colonizar os tecidos internos das plantas e promover diferentes benefícios para seu hospedeiro (HARDOIM et al., 2015; REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011). Um dos possíveis sítios de localização destas bactérias nos tecidos das plantas é o apoplasto (DONG et al., 1994). Este espaço compreende a região intercelular, e no caso da cana-de-açúcar, ocupa ~3 % dos colmos (DONG et al., 1994) e é um importante compartimento de acúmulo de sacarose (WELBAUM; MEINZER, 1990). TEJERA et al. (2006) descreveu a presença de compostos nitrogenados, sendo os principais aminoácidos e proteínas, bem como formas inorgânicas, em baixas concentrações, como amônio, nitrito e nitrato. Além destas características, o apoplasto possui pH ~5,5, quantidade de açúcar ~10%, conteúdo mineral, bem como temperatura, perto do ótimo para atividade bacteriana (SATTELMACHER, 2001). Essas características poderiam explicar a atividade de fixação biológica de nitrogênio por diferentes bactérias neste local endofítico.

Trabalhos que descreveram a presença de bactérias no apoplasto de cana-de-açúcar têm sido baseados em isolamento por cultivo e focando principalmente em bactérias diazotróficas (ASIS; ADACHI; AKAO, 2004; LOIRET et al., 2004; ASIS JÚNIOR et al., 2003; DONG et al., 1994). Porém, é sabido que esta metodologia limita a análise da comunidade ali presente (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011). Atualmente a utilização de abordagens independentes de cultivo têm possibilitado obter uma visão mais ampla do microbioma de cana-de-açúcar (DOS-SANTOS et al., 2017; DE SOUZA et al., 2016; YEOH et al., 2016; ROUWS et al., 2014; FISCHER et al., 2012; MAGNANI et al., 2010a). Porém, até o presente momento, não existe uma avaliação da comunidade bacteriana presente no líquido do apoplasto utilizando esta abordagem. Esta análise pode trazer informações valiosas aplicáveis ao estudo das interações das bactérias endofíticas com o hospedeiro e o melhoramento do cultivo da planta.

O presente trabalho utilizou uma abordagem independente de cultivo para a análise da comunidade bacteriana presente no líquido extraído do apoplasto extraído de colmos superficialmente esterilizados de duas variedades de cana-de-açúcar. Após a extração do DNA genômico, foram sequenciados, por meio do sequenciamento em larga escala, os genes 16S rRNA da comunidade bacteriana, o que possibilitou observar com uma maior cobertura a comunidade presente nas amostras. Os resultados têm demonstrado uma comunidade rica e diversa, que possui semelhança com outros trabalhos de comunidade bacteriana endofítica de cana-de-açúcar, e ainda gêneros não reportados para esta planta.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Material de estudo

Foram utilizadas amostras de base de colmo de cana-de-açúcar das variedades RB867515 e RB92579, cultivadas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia (Seropédica – RJ) (22°44'50.3''S/43°40'15.7''W), cujo solo é classificado como um Acrisol ou tipo Hapludult, não havendo nenhum cultivo a mais do que 5 anos antes do plantio deste experimento e foi submetido a uma fertilização inicial com 80 kg de P ha⁻¹ e 60 kg de K ha⁻¹, e correção de pH com 1,5 Mg de lima ha⁻¹, não recebendo nenhum tratamento com pesticidas.

4.4.2 Preparo das amostras e coleta do líquido do apoplasto

Amostras de colmo das variedades RB867515 e RB92579 foram utilizadas para a extração do líquido do apoplasto utilizando a metodologia descrita por DONG et al. (1994). Para isto, pedaços de colmo, mais precisamente os entrenós, com ~10 cm, foram descascados, desinfestados superficialmente por flambagem, e colocados em tubos de 50 mL para posterior centrifugação à 3.000 x g por 20 min à 4 °C. O conteúdo resultante desta centrifugação foi armazenado a -20 °C até o momento da extração do DNA total.

4.4.3 Extração do DNA total, quantificação e avaliação por PCR

A extração do DNA total foi realizada seguindo a metodologia proposta por BOSTRÖM et al. (2004) com algumas adaptações. Aproximadamente 50 mL do líquido do apoplasto obtido no processo de centrifugação, de cada variedade, foi filtrado em filtro com porosidade de 5 µm e em seguida com 0,22 µm, transferido o último filtro para um tubo do tipo Falcon de 50 mL. Foi adicionado 157 µL do tampão de lise [400 mM de NaCl, 750 mM de sacarose, 20 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 50 mM de Tris-HCl pH 9.0] suplementado com 1 mg mL⁻¹ de lisozima, incubando à 37 °C por 30 min. Em seguida, foi adicionado 1 % de SDS e 100 µg mL⁻¹ de proteinase K, sendo este sistema incubado à 55 °C por ~12 h. O filtro foi então retirado, lavado com 500 µL de TE e este misturado ao material lisado. Foi então adicionado 50 µg de RNase, 0,1 volume de acetato de sódio à 3 M e 0,6 volume de isopropanol, incubando este sistema à -20 °C por 1 h. Após a incubação, o DNA total foi lavado por meio de centrifugação à 20.000 x g à 4 °C por 20 min, lavando o pellet com 500 µL de etanol 70 % e centrifugando-o nas mesmas condições. O pelet resultante foi seco utilizando o equipamento SpeedVac e ressuspenso em 50 µL de TE. O DNA total foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop™ - Thermo Scientific™) e espectrofluorimetria (Qubit® 2.0 Invitrogen™ – kit Qubit® dsDNA HS Assay).

A PCR para avaliar a relação do DNA bacteriano em relação ao DNA de planta (especificamente mitocondrial) foi realizada de acordo com o descrito no Capítulo I, seção 3.4.8, utilizando os iniciadores 799F e 1492R. Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose não-desnaturante à 1 %. Os fragmentos no gel foram marcados com solução de brometo de etídio a 10 mg mL⁻¹ e em seguida visualizado a transliminação UV utilizando o fotodocumentador Kodak Gel Logic 100 Imaging System.

4.4.4 Sequenciamento em larga escala dos genes 16S rRNA

Os amplicons relacionados ao DNA de bactérias produzidos na PCR dos genes 16S rRNA com os iniciadores 799F e 1492R foram excisados do gel de agarose e purificados utilizando o kit de purificação de DNA de gel de agarose Zymoclean™ Gel DNA Recovery

(Zymo), conforme o recomendado pelo fabricante. Os fragmentos purificados foram verificados quanto a sua integridade em um gel de agarose não-desnaturante à 1 %, marcando-os e visualizando-os por transluminação UV no fotodocumentador Kodak Gel Logic 100 Imaging System.

Estes produtos de PCR, relativos ao DNA bacteriano, foram enviados para UFPR e submetidos ao sequenciamento em larga escala dos genes 16s rRNA. O protocolo de sequenciamento foi o mesmo utilizado no Capítulo I, seção 3.4.9, ou seja, utilizando os iniciadores 515F e 806R e sequenciados na plataforma Illumina MiSeq em pair-ends.

4.4.5 Análise taxonômica dos genes 16S rRNA

Os dados brutos do sequenciamento foram analisados utilizando o software Mothur v1.39.3 (SCHLOSS et al., 2009), seguindo os mesmos parâmetros descritos no Capítulo I, seção 3.4.9; que se resume em montagem de contigs, remoção de sequências ambíguas, quiméricas e maiores que 275 pb, clusterização e análises de alfa e beta-diversidade. Para esta análise foi utilizando o banco de dados SILVA SEED v123 como arquivo de referência, e sequências que foram classificadas como de cloroplastos, mitocôndria e de eucarioto foram removidas.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Avaliação do DNA total

Após a extração do DNA total das três amostras de cada variedade, descritas neste trabalho, foram avaliadas quantitativamente e qualitativamente por fluorimetria e espectrometria, obtendo uma média de ~93 ng para a variedade RB867515 e ~53 ng para a variedade RB92579 de DNA dupla fita (Tabela 6).

Tabela 6: Análise quantitativa por espectrofotometria e fluorimetria das amostras de DNA total do líquido do apoplasto

Variedade	Amostras	Razões de absorvância		Massa total de DNA (ng)	
		260/230	260/280	Nanodrop	Qubit
RB867515	P07	1,30	2,12	12.630,0	123,0
	P11	1,28	2,04	6.965,0	93,0
	P20	1,14	2,08	4.925,0	62,0
RB92579	P10	0,85	2,04	3.585,0	72,5
	P12	1,05	2,12	4.510,0	71,0
	P16	0,94	2,18	3.145,0	15,6

A PCR para avaliar a presença do DNA bacteriano nas amostras de DNA total com os iniciadores 799F-1492R revelou a predominância do DNA bacteriano em relação ao da planta (ou mitocondrial, *vide* Figura 8).

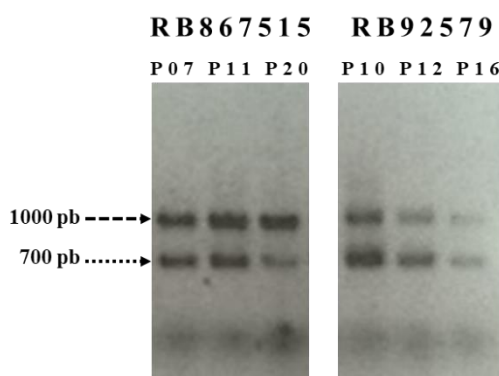


Figura 8: Perfis moleculares dos produtos da amplificação com os iniciadores 799F-1492R para verificar a presença do DNA bacteriano nas amostras de DNA total. As setas pontilhadas indicam o perfil de bactérias e as tracejadas o de planta (mitocôndria).

4.5.2 Sequenciamento e composição taxonômica dos genes 16S rRNA do líquido do apoplasto

O sequenciamento realizado deu origem a 2.345.005 *reads*, sendo estes complementares (*forward* e *reverse*). As sequências (ou *reads*) consideradas de baixa qualidade e as que não geraram *contigs*, foram excluídas resultando em 2.220.737 *contigs*, que variou de 244-504 pb. Sabendo-se que o sequenciamento do tipo Illumina MiSeq dá origem a sequências de no máximo 275 pb, foi então removido do conjunto de *contigs* as sequências maiores que 275 pb. Como forma de reduzir o número de dados para ser processado, foi verificada a presença de sequências ambíguas, o que totalizou em 1.747.900

contigs/sequencias únicas. Este passo não é perdido a informação de quantas vezes uma determinada sequencia se repetiu no conjunto de dados. Após a otimização das sequencias, foi verificada a presença de sequencias quiméricas, utilizando o subprograma do Mothur “uchime”, o qual identificou ~1,6 % de sequencias quiméricas do número total de sequencias, e após a remoção destas resultou em conjunto de 1.680.396 sequencias únicas.

Inicialmente haviam 4 réplicas (amostras) de cada variedade, porém algumas réplicas tiveram um número de *reads* muito inferior das demais. Sendo assim, foram retirados uma réplica de cada amostra, de modo que retirasse as amostras com menor número de sequencias, reduzindo para 1.557.777 sequencias no total. Em seguida, as amostras remanescentes foram normalizadas gerando amostras com número igual de sequencias selecionadas aleatoriamente pelo Mothur, resultando em uma amostragem de 41.563 sequencias para cada grupo de amostra (réplica), na qual deu origem a 498.756 sequencias no total.

Em seguida, foram removidas sequencias classificadas como de cloroplasto/cianobactéria, mitocôndria e eucarioto. Então as amostras foram normalizadas novamente, resultando em 24.873 sequencias por amostra e 149.238 sequencias no total.

Foram detectadas no total 5300 OTUs, das quais 99,7 % foram classificadas como Bactérias e 0,3 % como Archaea. A classificação por filos taxonômicos, revelou a predominância de membros das Proteobacterias (Figura 9), com ~63 % para a variedade RB867515 e ~73 % para RB92579, pertencentes principalmente as sub-divisões Alfa-, Beta- e Gammaproteobacteria (Figura 10), e uma grande diversidade de filos taxonômicos (32 no total) em todas os grupos de amostras, com destaque para Firmutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia e Planctomicetes, que corresponderam, respectivamente, 8, 7, 7, 6, 4, 4 % do número total de *reads* detectados para as variedades (Figura 11). As 10 principais OTUs foram relacionados aos gêneros *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Xanthomonas*, *Acinetobacter*, *Comamonadaceae_unclassified*, *Aerococcus*, *Burkholderia*, *Pantoea* e *Kozakia* (Tabela Online - <https://goo.gl/dJbTXW>).

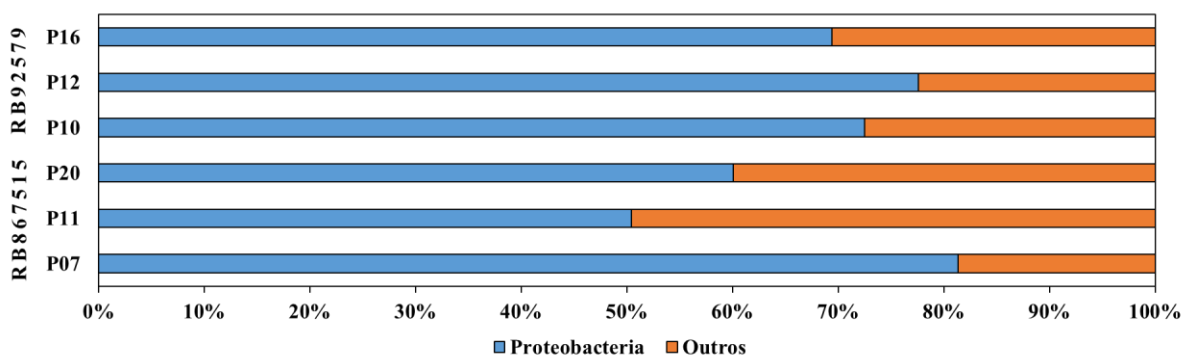


Figura 9: Comparação da diversidade de OTUs pertencentes ao grupo Proteobacteria com os outros detectados nas amostras, de acordo com a sua abundancia relativa.

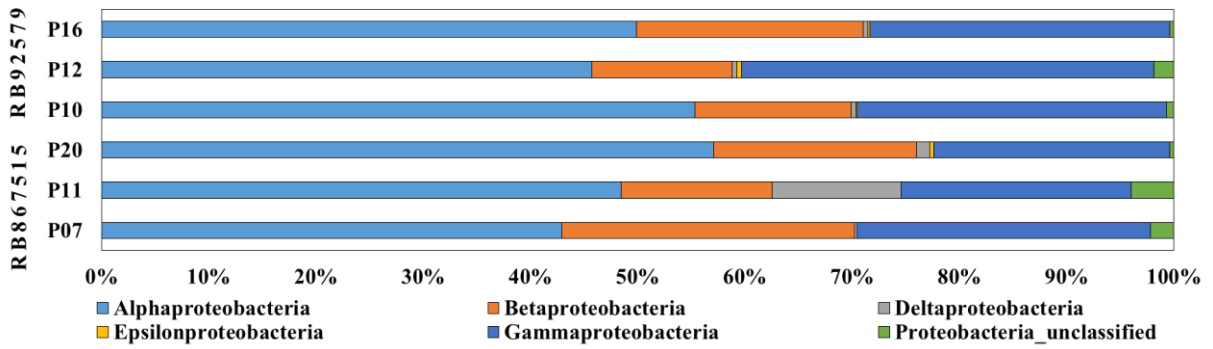


Figura 10: Composição das sub-divisões do grupo Proteobacteria detectadas para cada variedade, de acordo com a sua abundancia relativa.

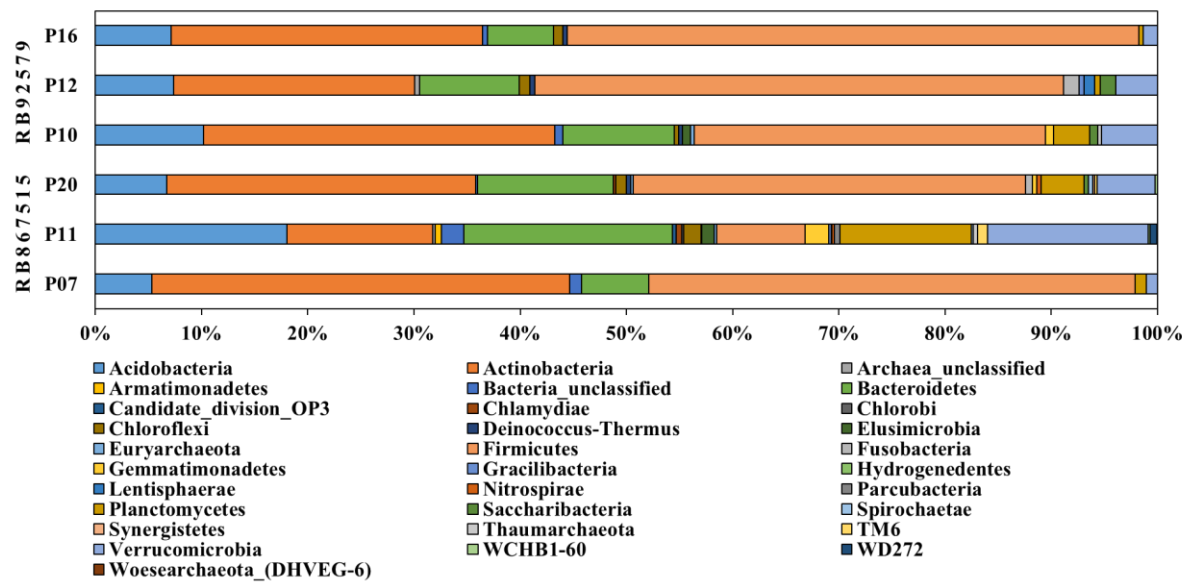


Figura 11: Diversidade de filios das OTUs detectadas nas amostras de cada variedade, exceto o grupo Proteobacteria, baseado em sua abundancia relativa.

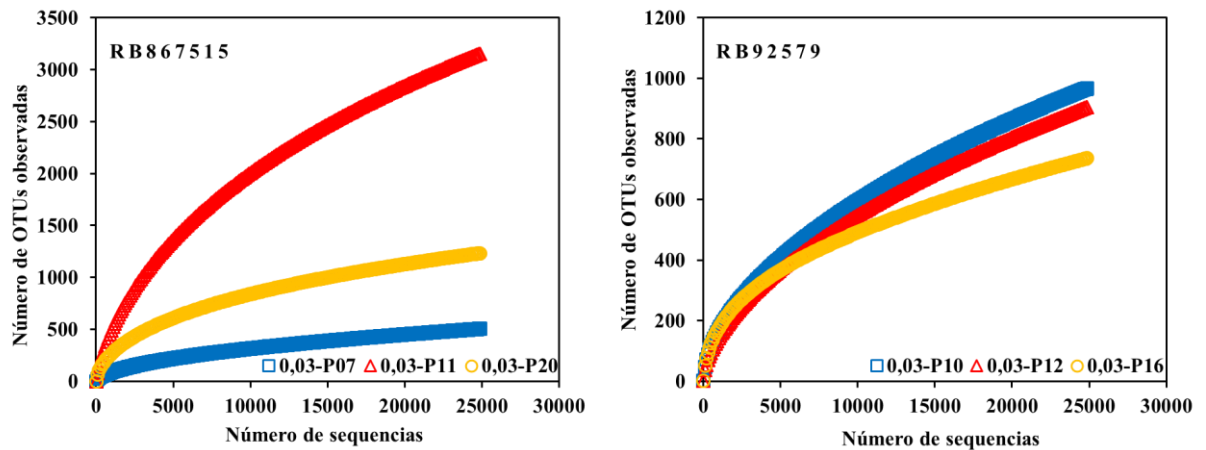


Figura 12: Curvas de rarefação calculada com 3 % de dissimilaridade.

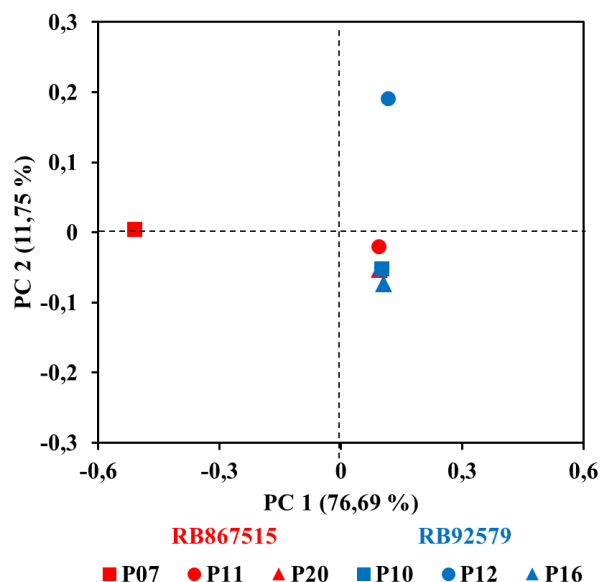


Figura 13: Análise de Componentes Principais (PCA) das amostras das variedades RB82579 e RB867515.

Os índices de diversidade e riqueza (Tabela 7) revelaram que as amostras foram ricas e diversas de OTUs. Para a variedade RB92579 houve maior homogeneidade (índice de Simpson) enquanto que para a variedade RB867515, principalmente a amostra P07, houve a dominância de uma espécie que refletiu no aumento do índice de Simpson.

Tabela 7: Índices estimados de riqueza e diversidade para cada amostra das variedades estudadas

Variedade	Amostras	OTUs observadas	Índices de Riqueza e Diversidade		
			Chao	Shannon	Simpson
RB867515	P07	504	1133,47	2,14	0,37
	P11	3154	5321,97	6,33	0,01
	P20	1233	1941,37	5,17	0,01
RB92579	P10	967	1728,07	4,29	0,03
	P12	905	1851,73	3,64	0,07
	P16	736	1367,94	4,33	0,04

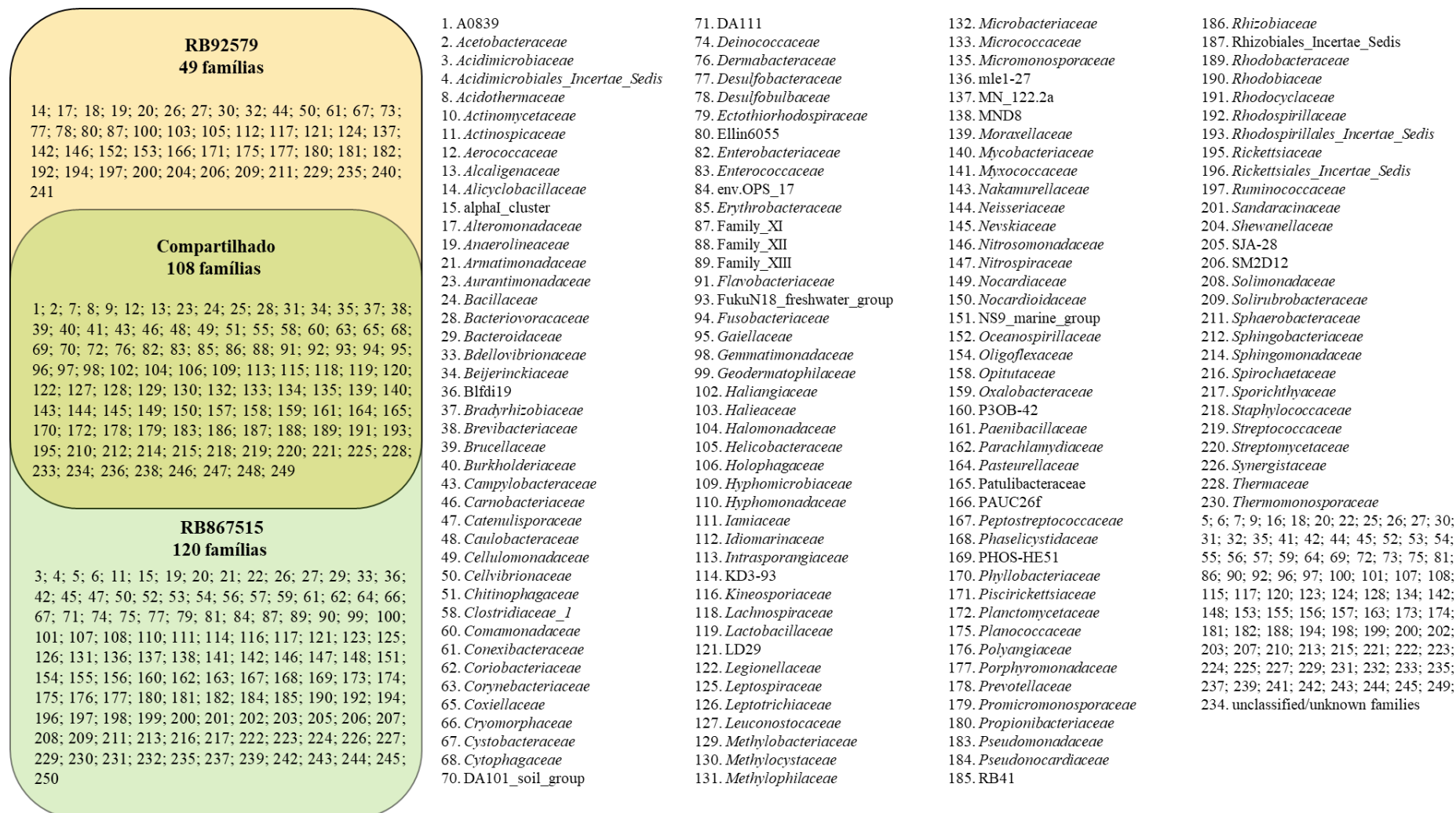


Figura 14: Comparação do número de famílias taxonômicas das variedades RB92579 e RB867515 e suas respectivas famílias compartilhadas.

4.6 DISCUSSÃO

O apoplasto tem sido apontado como um provável sítio de localização das bactérias endofíticas (DONG et al., 1994). Este local, mais precisamente o líquido que o compreende, possui condições como temperatura, pH e nutrientes, favoráveis para o estabelecimento de microrganismos (SATTELMACHER, 2001). Este ambiente na cana-de-açúcar foi descrito como um significativo local para o armazenamento de açúcares (compreendendo ~21 % do açúcar armazenado pela planta) (WELBAUM; MEINZER, 1990), ocupando cerca de ~3 % dos colmos desta planta (DONG et al., 1994). Estudos que visaram a caracterização de microrganismos presentes no apoplasto de cana-de-açúcar foram baseados, principalmente, em abordagens de isolamento por cultivo, e ainda, buscando isolar/detectar bactérias diazotróficas. Por exemplo, DONG et al., (1994) sugeriram este local como o principal habitat dos microrganismos endofíticos em cana-de-açúcar ao detectar por microscopia a localização de *Acetobacter diazotrophicus* (renomeada para *Gluconacetobacter diazotrophicus*) no compartimento apoplasto e seu respectivo líquido extraído. Após este trabalho, novas discussões sobre a real localização dos endófitos foram levantadas, pois *G. diazotrophicus* foi primeiramente descrita como sendo colonizadora dos vasos xilemáticos de cana-de-açúcar (REIS; OLIVARES; DÖBEREINER, 1994). Três anos depois, DONG; MCCULLY; CANNY (1997) demonstraram novamente a presença da bactéria no líquido no qual ele descreveu como sendo do apoplasto e questionou se bactérias benéficas poderiam ocupar os vasos xilemáticos. Anos depois JAMES et al. (2001b) reconfirmaram a presença da bactéria colonizando os vasos do xilema. Desta discussão, o que pode ser sugerido é que talvez bactérias endofíticas, como a *G. diazotrophicus*, tenham a capacidade de colonizar ambos os sítios sem prejudicar o desenvolvimento da planta.

O estudo da diversidade das bactérias endofíticas que habitam o apoplasto de cana-de-açúcar ainda é pouco compreendida, pois são poucos trabalhos disponíveis e estes têm sido focados, principalmente, na detecção de diazotrofos neste local, e utilizando abordagem dependente de cultivo. A densidade de células diazotróficas presente em amostras de líquido do apoplasto de cana-de-açúcar foi descrita na ordem de 10^2 a 10^8 células mL^{-1} (ASIS JÚNIOR et al., 2003). Em 2004, nas Filipinas, ASIS JÚNIOR e colaboradores, buscando também definir a densidade da população de bactérias diazotróficas presente no líquido do apoplasto em relação ao número total de endófitas no caldo de cana-de-açúcar, concluíram que o número de bactérias endofíticas no colmo variou de 10^4 a 10^9 células mL^{-1} de caldo de cana-de-açúcar. Para as bactérias diazotróficas, esta densidade variou dependendo da época do, tendo uma variação de 10^2 a 10^8 células mL^{-1} , ou seja, de uma forma geral, a comunidade bacteriana endofítica presente no colmo de cana-de-açúcar varia de 10^2 a 10^9 células por mL de caldo ou líquido do apoplasto. Contudo, os autores não determinaram as espécies de bactérias que estavam presentes em suas amostras. Em comparação com o número de OTUs detectados no sequenciamento dos genes 16S rRNA neste presente trabalho, considerando que cada OTU representou uma célula e que foram utilizados 50 mL de líquido do apoplasto para cada extração de DNA, para cada amostra resultaria em 10^2 células mL^{-1} . Esta estimativa está dentro do previsto na literatura (ASIS; ADACHI; AKAO, 2004; ASIS JÚNIOR et al., 2003).

Os estimadores de riqueza e diversidade demonstraram uma comunidade rica de espécies raras, visto que, o estimador Chao1 demonstrou valores estimados maiores do que os observados. Este índice/estimado baseia-se no princípio que se uma comunidade está sendo observada e espécies raras ainda estão sendo descobertas, provavelmente ainda há mais espécies não encontradas (CHAO, 1984; CHAO; BUNGE, 2002). A diversidade de espécies estimadas com os índices Simpson e Shannon estimou um alto número de indivíduos/espécies

nas amostras. Neste caso, os valores dos índices são inversamente expressos e correlacionados, em que o índice de diversidade Simpson, calcula a probabilidade de dois indivíduos selecionados ao acaso em uma amostra serem pertencentes à mesma espécie. Assim, assume-se que quanto maior o valor, menor é a diversidade de espécies estimada para a amostra (LUDWIG; REYNOLDS, 1988; SIMPSON, 1949). Enquanto que o índice Shannon é expresso o grau de incerteza que existe em se predizer a qual espécie pertence um indivíduo escolhido ao acaso em uma comunidade, ou seja, quanto maior for essa incerteza, maior será o valor e maior será a diversidade da amostra. (LUDWIG; REYNOLDS, 1988; SHANNON, 1949).

Em um estudo visando investigar a diversidade genética de bactérias endofíticas do apoplasto de cana-de-açúcar, VELÁZQUEZ et al., (2008) por meio de isolamento por cultivo dos microrganismos presentes no líquido do apoplasto obtiveram um resultado de $\sim 10^4$ unidades formadora de colônia (UFC) mL⁻¹. Destes, eles selecionaram 29 tipos de UFCs com morfologia diferenciada e agruparam-nos por similaridade após análise de *finger-printing* genética, resultando em 17 grupos diferentes. Um representante de cada grupo foi utilizado para o sequenciamento do gene 16S rRNA, e análise taxonômica revelou a presença dos gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Rhizobium*, *Kocuria*, *Staphylococcus* e *Xanthomonas*. No presente trabalho foram detectadas: 155 OTUs de *Acinetobacter* no total ($\sim 3,0$ % do número total de OTUs detectados); *Bacillus* foram 7 OTUs (0,1% do total); *Comamonas* 2 OTUs; *Gluconacetobacter* 4 OTUs; *Microbacterium* 2 OTUs; *Micrococcus* 1 OTU; *Rhizobium* 10 OTUs (0,2 %); *Kocuria* 1 OTU; *Staphylococcus* 7 OTUs e *Xanthomonas* 42 OTUs (0,8 %). O gênero *Erwinia* não pôde ser detectado. Os gêneros bacterianos que possuem as espécies diazotróficas comumente isoladas/detectadas nos tecidos de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 2014), como a *Azospirillum amazonense* (BALDANI, 1984), *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1992), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE; DOBEREINER, 1988) e *Burkholderia tropica* (REIS et al., 2004), também foram detectadas neste presente trabalho, sendo representadas, respectivamente, 2, 10, 4 e 82 OTUs. No total, foram detectadas 5300 OTUs diferentes (3738 OTUs para a variedade RB867515 e 1562 para RB92579), indicando novamente que a abordagem independente de cultivo permite uma maior cobertura da comunidade bacteriana.

A comunidade bacteriana encontrada no líquido do apoplasto das duas variedades de cana-de-açúcar apresentou 108 famílias bacterianas compartilhadas entre si, o que sugere um possível padrão na composição neste nicho endofítico. A variedade RB867515 foi representada por um número de OTUs aproximadamente 2 vezes maior que da variedade RB92579. Este fato poderia ser reflexo de fatores bióticos do genótipo da planta na “seleção” de sua comunidade. Os filos Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes foram os mais abundantes em ambas as variedades. Analisando as 20 principais OTUs de cada variedade, é possível observar a presença dos gêneros: *Aerococcus*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Janthinobacterium*, *Methylobacterium*, *Novosphingobium*, *Pantoea*, *Pseudoxanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Xanthomonas*, *Kozakia*, e ainda gêneros não classificados dentro das famílias *Comamonadaceae*, *Enterobacteriaceae* e *Rhizobiaceae*. Estes gêneros já foram relatados em tecidos de cana-de-açúcar por abordagens independentes de cultivo (DE SOUZA et al., 2016; DOS-SANTOS et al., 2017; MAGNANI et al., 2013; YEOH et al., 2016) e dependente de cultivo (BENEDUZI et al., 2013; MAREQUE et al., 2014; MUANGTHONG; YOUPENSUK; RERKASEM, 2015; PAUNGFOO-LONHIENNE et al., 2014). Estes gêneros poderiam estar exercendo funções importantes na associação com a planta de cana-de-açúcar (BULGARELLI et al., 2013). Estas informações são relevantes para futuros estudos visando a compreensão da dinâmica desta comunidade e a sua interação com a planta poderá trazer novos avanços no cultivo da cana-de-açúcar.

4.7 CONCLUSÕES

- ✓ A comunidade bacteriana presente no líquido do apoplasto de cana-de-açúcar das variedades RB867515 e RB92579 pode ser melhor avaliada com a metodologia independente de cultivo utilizada.
- ✓ As variedades apresentaram diferenças entre o número total de OTUs detectadas, chegando a aproximadamente 2 vezes maior para a variedade RB867515.
- ✓ As principais OTUs encontradas em ambas as amostras pertenceram aos filos da Proteobacteria, Firmutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia e Planctomicetes.
- ✓ Não existe na literatura nenhum trabalho que avaliou a comunidade bacteriana presente no apoplasto de cana-de-açúcar (ou outras gramíneas) por método independente de cultivo. Sendo assim, este presente trabalho trouxe informações relevantes ao contexto da comunidade bacteriana endofítica de cana-de-açúcar, compreendendo melhor a comunidade bacteriana presente no apoplasto pelo uso da abordagem independente de cultivo.

5 CAPÍTULO III

**ANÁLISE *IN SILICO* PREDITIVA DAS FUNÇÕES RELACIONADAS À
MICROBIOTA BACTERIANA ENDOFÍTICA DO COLMO DE CANA-
DE-AÇÚCAR**

5.1 RESUMO

O gene 16S rRNA é o biomarcador mais utilizado nos estudos de ecologia microbiana, aplicado principalmente na caracterização da composição taxonômica e diversidade de microrganismos de diversos tipos de amostras, como solo, água, plantas e humana. Com a introdução dos estudos metagenômicos, estes estudos de composição taxonômica têm obtido grandes avanços, pois neste caso, é possível analisar diversos genes, de diferentes microrganismos, simultaneamente, ou seja, em um mesmo sequenciamento, sendo possível obter, além de informações de taxonomia, as características funcionais de uma determinada comunidade. Entretanto, a utilização desta abordagem, em alguns casos, poderia ser impedida devido às dificuldades relacionadas principalmente a problemas com a natureza das amostras e/ou o número total de indivíduos da comunidade alvo. Estudos sugeriram que o perfil dos clusters gerados por genes compartilhados entre espécies e a filogenia baseada no gene 16S rRNA são fortemente correlacionadas, o que permitiu utilizar somente o gene 16S rRNA (mais precisamente o seu sequenciamento) para a análise preditiva do perfil de genes (ou funções) de uma comunidade. Neste caso, o perfil filogenético dos microrganismos baseado no gene 16S rRNA é comparado com o de espécies já conhecidas, que possuem seus respectivos genomas sequenciados e anotados funcionalmente, prevendo os possíveis genes presentes nesta comunidade, assemelhando-se aos resultados obtidos em um sequenciamento metagenômico. Neste presente trabalho, utilizando resultados obtidos nas análises da comunidade bacteriana endofítica de amostras de colmo de cana-de-açúcar, de duas variedades e duas metodologias diferentes independentes de cultivo de obtenção deste perfil taxonômico, foi possível prever as funções pertencentes às bactérias detectadas. Os resultados demonstraram que os gêneros detectados nestas duas abordagens poderiam exercer funções que foram desde a biorremediação à agricultura. A base de dados de genes obtidos pode servir como um apoio a futuras investigações da comunidade bacteriana endofítica de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Perfil genético. Predição de funções. Perfil taxonômico. Endófitos bacterianos

5.2 ABSTRACT

The 16S rRNA gene is the biomarker most widely used in studies of microbial ecology, mainly applied in the taxonomic composition characterization and microorganisms diversity of several samples types, such as soil, water, plants and human. With the introduction of metagenomics studies, these taxonomic composition studies have been most important advances, because, in this case, it is possible to analyze many genes from different organisms, simultaneously, to be precise, in the same sequence, being possible to obtain, besides of taxonomy information, the functional features of a particular community. However, the use of this approach, in some cases, could be hindered due to difficulties related mainly to problems with the nature of the samples and/or the total number of individuals of the target community. Studies have suggested that the profile of the clusters generated by shared genes between species and phylogeny based on 16S rRNA gene are strongly correlated, allowed only use the 16S rRNA gene (more precisely your sequencing) to the predictive analysis of the profile of genes (or functions) of a community. In this case, the phylogenetic profile of microorganisms, based on 16S rRNA gene, is compared with the known species, which have their own genomes sequenced and annotated functionally, predicting the possible genes present in this community, resembling the results obtained in a metagenomics sequencing. In this present work, using results of endophytic bacterial community analyses of samples of sugarcane stems, two varieties and two different culture-independent methodologies for obtaining this taxonomic profile, it was possible to predict the functions belonging to bacteria detected. The results showed that the genera detected in these two approaches could exercise functions that were since bioremediation to agriculture. The database of genes obtained can serve as a support for future research of endophytic bacterial community of sugarcane.

Keywords: Genetic profile. Functions prediction. Taxonomic profile. Bacterial endophytes.

5.3 INTRODUÇÃO

O sequenciamento em larga escala tem permitido grandes avanços aos estudos de ecologia microbiana, facilitando a compreensão de comunidades e sua aplicabilidade biotecnológica. Neste contexto, o uso de marcadores moleculares, como o gene 16S rRNA, são os mais utilizados para caracterizar a composição taxonômica e diversidade filogenética de microrganismos colonizadores de diversos habitats, como por exemplo em estudos de amostras ambientais (ANDERSON et al., 2017; LIGI et al., 2014; SHAW et al., 2015), de tecidos de plantas (AKINSANYA et al., 2015; BULGARELLI et al., 2012; DE SOUZA et al., 2016; MAGNANI et al., 2013) e amostras de espécimes humanas (GRICE et al., 2009; HUSE et al., 2012). Entretanto a aplicação destes genes marcadores restringe-se em uma determinada função gênica, como por exemplo o uso de genes *nifH* (DEDYSH; RICKE; LIESACK, 2004; FISCHER et al., 2012; SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2014; VIDEIRA et al., 2009) (um dos genes envolvidos no processo de fixação biológica de nitrogênio), na qual é utilizado para a identificação filogenética de bactérias diazotróficas presentes em uma comunidade. A partir desta problemática têm sido desenvolvidas estratégias de sequenciamento metagenômico, onde é possível obter não só o perfil taxonômico, mas também metabólico e funcional de uma grande diversidade de microrganismos de uma determinada amostra (AKINSANYA et al., 2015; CULLIGAN et al., 2014; SOLOVYEV; SALAMOV, 2011; YASIR; SALAM PRADEEP; KONWAR, 2014). Esta abordagem dispõe de diversas vantagens, como uma maior cobertura, avaliar diversos genes em um mesmo sequenciamento e acesso à informação de genes raros (LANGILLE et al., 2013). Embora as estratégias de sequenciamento do gene 16S rRNA e metagenômico diferem-se quanto à sua abordagem, o perfil dos clusters gerados por genes compartilhados entre espécies e a filogenia baseada no gene 16S rRNA são fortemente correlacionadas (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2005; SEGATA; HUTTENHOWER, 2011; SNEL; BORK; HUYNEN, 1999), o que pode ser aplicado para inferir o perfil genético de organismos não-cultivados, por meio de comparação com organismos filogeneticamente próximos com suas características bem descritas (LANGILLE et al., 2013). Esta análise, conhecida como análise preditiva, tem sido utilizada para deduzir as funções de interesse agrônomo de comunidades bacterianas de plantas (WEMHEUER et al., 2017) e solo (KAISER et al., 2016); no estudo de doenças causadas por bactérias (HASEGAWA et al., 2017) e ainda na busca por genes de interesse industrial aplicados em reatores de digestão anaeróbica (CHO et al., 2017).

Estudos metagenômicos das funções da comunidade bacteriana endofítica de cana-de-açúcar ainda são poucos explorados. Isto poderia estar relacionado à natureza da planta e ao baixo conteúdo genético bacteriano, conforme demonstrado por DOS-SANTOS et al., (2017). Sendo assim, a análise preditiva de funções desta comunidade pode trazer informações relevantes ao avanço do conhecimento da interação de bactérias endofíticas e a cana-de-açúcar.

Aqui foi feita uma análise de predição, representativa, do conteúdo funcional da comunidade bacteriana presente em amostras de colmo de cana-de-açúcar, por meio de duas metodologias em duas variedades de cana-de-açúcar. Também foi descrita uma possível estratégia para a utilização do pacote R Tax4Fun para análise preditiva a partir de dados obtidos em análises no Mothur.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Origem das amostras

As amostras tiveram sua origem em dois trabalhos distintos: o primeiro conjunto de amostras provém de um estudo da comunidade bacteriana endofítica de amostras de colmo de uma variedade de cana-de-açúcar, utilizando um protocolo de enriquecimento das células bacterianas (Capítulo I). O segundo conjunto teve sua origem no estudo da comunidade bacteriana presente no líquido do apoplasto de colmo de cana-de-açúcar de duas variedades (Capítulo II). Sendo assim, os conjuntos de amostras foram organizados em origem (material de estudo: colmo/apoplasto) e variedade (Tabela 8).

Tabela 8: Organização distribuição das amostras utilizadas para a predição de funções gênicas

Material	Variedade	Amostras	Origem
Colmo	RB867515	A1, A2 e A3	Capítulo I
Apoplasto	RB867515	P07, P11 e P20	Capítulo II
	RB92579	P10, P12 e P16	

5.4.2 Adaptação dos dados obtidos em análise no Mothur para aplicação no Tax4Fun

Após a obtenção de informações de OTUs de cada amostra, foram extraídas do Mothur as sequências representativas de cada unidade taxonômica (OTU). Para análise preditiva foram selecionadas as 20 principais OTUs de cada conjunto de dados. Estes foram reclassificados utilizando o script *assign_taxonomy.py* no QIIME (CAPORASO et al., 2010) pelo método BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), tendo como banco de dados SilvaSSURef_123_NR, disponível no site oficial do Tax4Fun (<http://tax4fun.gobics.de/>). Em seguida, os dados do Mothur foram transformados para arquivo do tipo BIOM (Biological Observation Matrix), e convertidos para um arquivo do tipo tabular, utilizando o pacote “Biom-format” (MCDONALD et al., 2012) no Python (<https://www.python.org/>), que continha informações sobre o número de *reads* de cada OTU. Neste arquivo foi editado o campo “taxonomy”, adicionando as informações obtidas na classificação no QIIME. O arquivo final está representado na Figura 15.

#OTU ID	A1	A2	A3	taxonomy
Otu0001	135.0	12117.0	8063.0	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Novosphingobium;uncultured Sphingomonadales bacterium
Otu0002	13923.0	2502.0	3537.0	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Sphingomonas;uncultured bacterium
Otu0003	1779.0	287.0	1276.0	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Methylobacteriaceae;Methylobacterium;uncultured bacterium
Otu0004	788.0	555.0	803.0	Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Burkholderiaceae;Cupriavidus;Cupriavidus sp. B137
Otu0005	13.0	1159.0	481.0	Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Burkholderiaceae;Ralstonia;uncultured proteobacterium
Otu0006	0.0	92.0	1019.0	Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteriia;Sphingobacteriales;Chitinophagaceae;Hydrotaea;uncultured bacterium
Otu0007	550.0	186.0	242.0	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Nevskiaceae;Nevskia;uncultured bacterium
Otu0008	2.0	87.0	808.0	Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Nitrosomonadales;Nitrosomonadaceae;uncultured;uncultured bacterium
Otu0009	20.0	449.0	337.0	Bacteria;Proteobacteria;TA18;uncultured bacterium
Otu0010	285.0	18.0	468.0	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Methylocystaceae;uncultured;uncultured Methylocella sp.
Otu0011	85.0	263.0	381.0	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Bradyrhizobiaceae;Bradyrhizobium;uncultured bacterium
Otu0012	76.0	12.0	58.0	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Methylobacteriaceae;Methylobacterium;uncultured bacterium
Otu0013	25.0	37.0	60.0	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Moraxellaceae;Acinetobacter;uncultured bacterium
Otu0014	34.0	34.0	50.0	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae;Sphingomonas;Sphingomonas astaxanthinifaciens DSM 22298
Otu0015	37.0	19.0	50.0	Bacteria;Proteobacteria;Betaproteobacteria;Burkholderiales;Oxalobacteraceae;Janthinobacterium;uncultured beta proteobacterium
Otu0016	0.0	0.0	89.0	Bacteria;Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Myxococcales;Polyangiaceae;Sorangium;uncultured bacterium
Otu0017	21.0	12.0	39.0	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Erythrobacteraceae;Altererythrobacter;uncultured bacterium
Otu0018	40.0	16.0	7.0	Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteriia;Sphingobacteriales;Sphingobacteriaceae;Pedobacter;uncultured bacterium
Otu0019	14.0	27.0	15.0	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Staphylococcales;Staphylococcus;uncultured bacterium
Otu0020	11.0	11.0	25.0	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas;uncultured Pseudomonas sp.

Figura 15: Visão geral do arquivo gerado para uso no Tax4Fun. A primeira coluna indica o número da OTU, a segunda, terceira e quarta representam o número de *reads* de cada amostra para cada OTU e a última coluna a sua respectiva classificação taxonômica.

5.4.3 Predição das funções no Tax4Fun

A tabela contendo as informações de classificação taxonômica e abundância de cada OTU foi importada para o pacote Tax4Fun, utilizando o R Studio (<https://www.rstudio.com/>), seguindo os parâmetros descritos pelos autores (ABHAUER et al., 2015) para *reads* de 200-400 pares de base e o perfil de referência obtido pelo UProC (MEINICKE, 2014). Para esta análise foi utilizado o banco de dados de referência SILVA 123 (QUAST et al., 2013) disponível no site oficial do Tax4Fun. Os resultados obtidos foram analisados utilizando a ferramenta online MicrobiomeAnalyst (DHARIWAL et al., 2017) com a opção “Shotgun Data Profiling (SDP)”, onde os genes anotados em KEGG (KANEHISA et al., 2016) pelo Tax4Fun foram categorizados em classes de metabolismo, módulos e COG (Clusters of Orthologous Groups) (TATUSOV et al., 2000).

5.5 RESULTADOS

5.5.1 Grupos de genes previstos pelo Tax4Fun para os conjuntos de amostras de cana-de-açúcar avaliadas e sua distribuição

A análise preditiva no Tax4Fun com as 20 principais OTUs de cada conjunto de dados deram origem à ~4500 genes anotados no KEGG (Tabela disponível online – <https://goo.gl/uokqeJ>). Quando os conjuntos de dados foram comparados, foi possível observar diferenças nos grupos de genes que estão presentes no conjunto “Apoplasto” em relação a “Colmo”, porém, não foi possível observar diferenças entre as variedades, de modo que formaram agrupamentos entre elas (Figura 16).

Os principais grupos de genes (módulos ou unidades funcionais) foram: metabolismo de aminoácidos aromáticos (12% do total), cofator e biossíntese de vitaminas (12%), degradação de compostos aromáticos (11%), metabolismo central de carboidratos (10%) e outros relacionados (7%), capacidade metabólica (9 %), Fixação de carbono (4%), metabolismo de cisteína e metionina (4%), metabolismo do metano (4%), biossíntese da cadeia principal de terpenoide (4%), metabolismo do nitrogênio (4%), metabolismo da lisina (3%). Estes grupos demonstram ser homogêneos dentre as amostras. Outros grupos, como por exemplo o de etabolismo de lipídeos, metabolismo de arginina e prolina, e metabolismo de enxofre, foram mais abundantes no grupo de amostras “colmo” (A1, A2, A3); enquanto que para o grupo de amostra “Apoplasto”, os módulos de biossíntese de metabolitos secundários e metabolismo de histidina foram os mais abundantes (Figura 17).

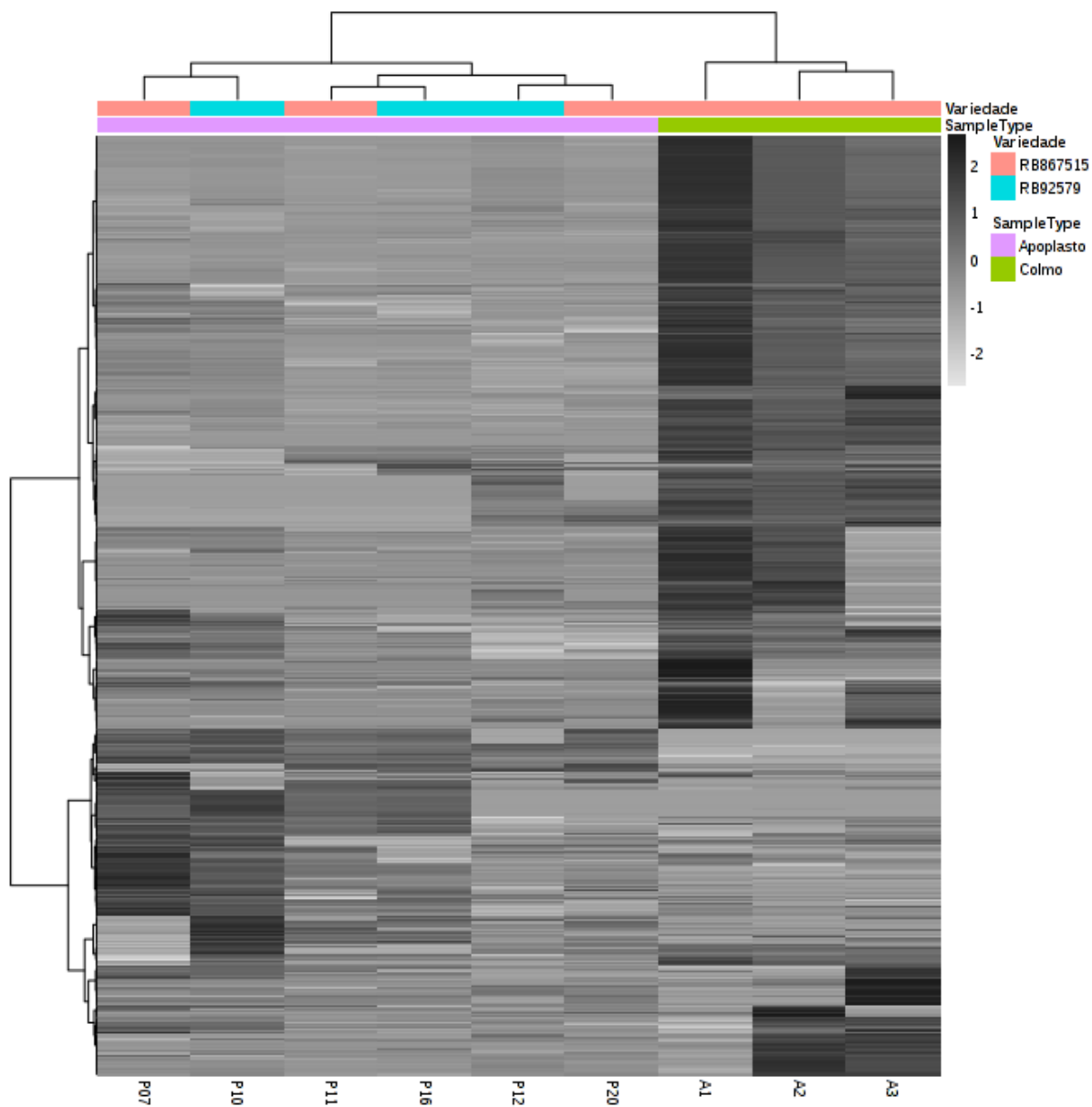


Figura 16: Heat-map representando os genes descritos na análise preditiva de cada amostra e a relação entre amostras e variedades. Foi utilizado o método de distância Euclidiana e Ward para a formação dos clusteres (agrupamentos).

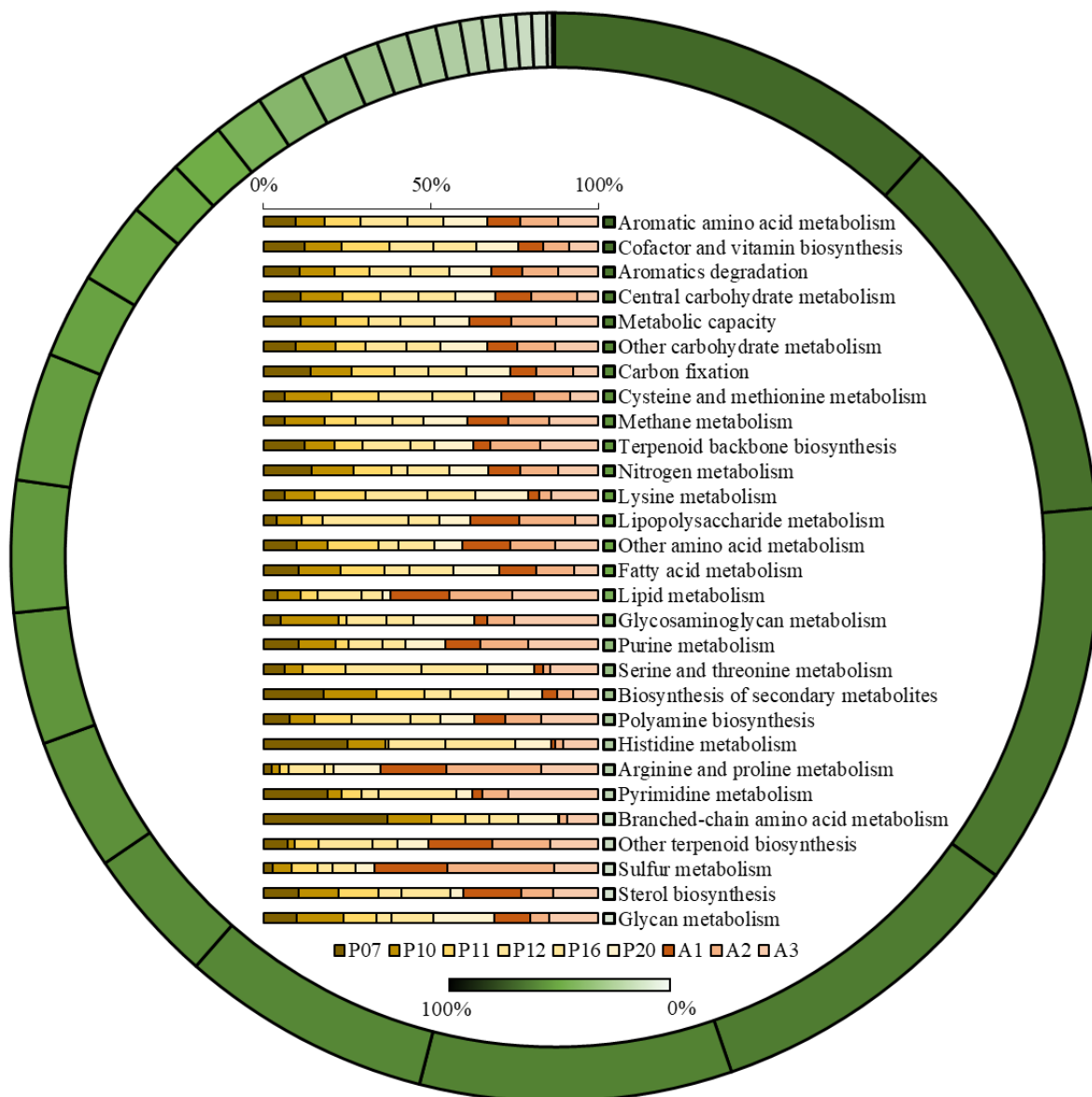


Figura 17: Unidades funcionais (módulos) baseadas em anotação do banco de dados KEGG e sua respectiva abundancia por amostra.

Algumas vias com funções de interesse biotecnológico puderam ser destacadas, com potenciais aplicações à agricultura e biorremediação. Por exemplo, a unidade funcional “Metabolismo de Nitrogênio” foi representado, na análise preditiva, com 4 vias metabólicas do ciclo do nitrogênio, incluindo genes atuantes no processo de Fixação Biológica de Nitrogênio e de Desnitrificação. Genes relacionados ao ciclo do metano também foram descritos, contendo 8 representantes (vias metabólicas). Processos de Biossíntese de Metabolitos Secundários também foram encontrados, como a síntese de Flavonoides e Penicilina. Em relação a processos aplicáveis a biorremediação, foi possível detectar genes envolvidos na degradação de xenobióticos, como por exemplo o Tolueno e Benzeno (Figura 18).

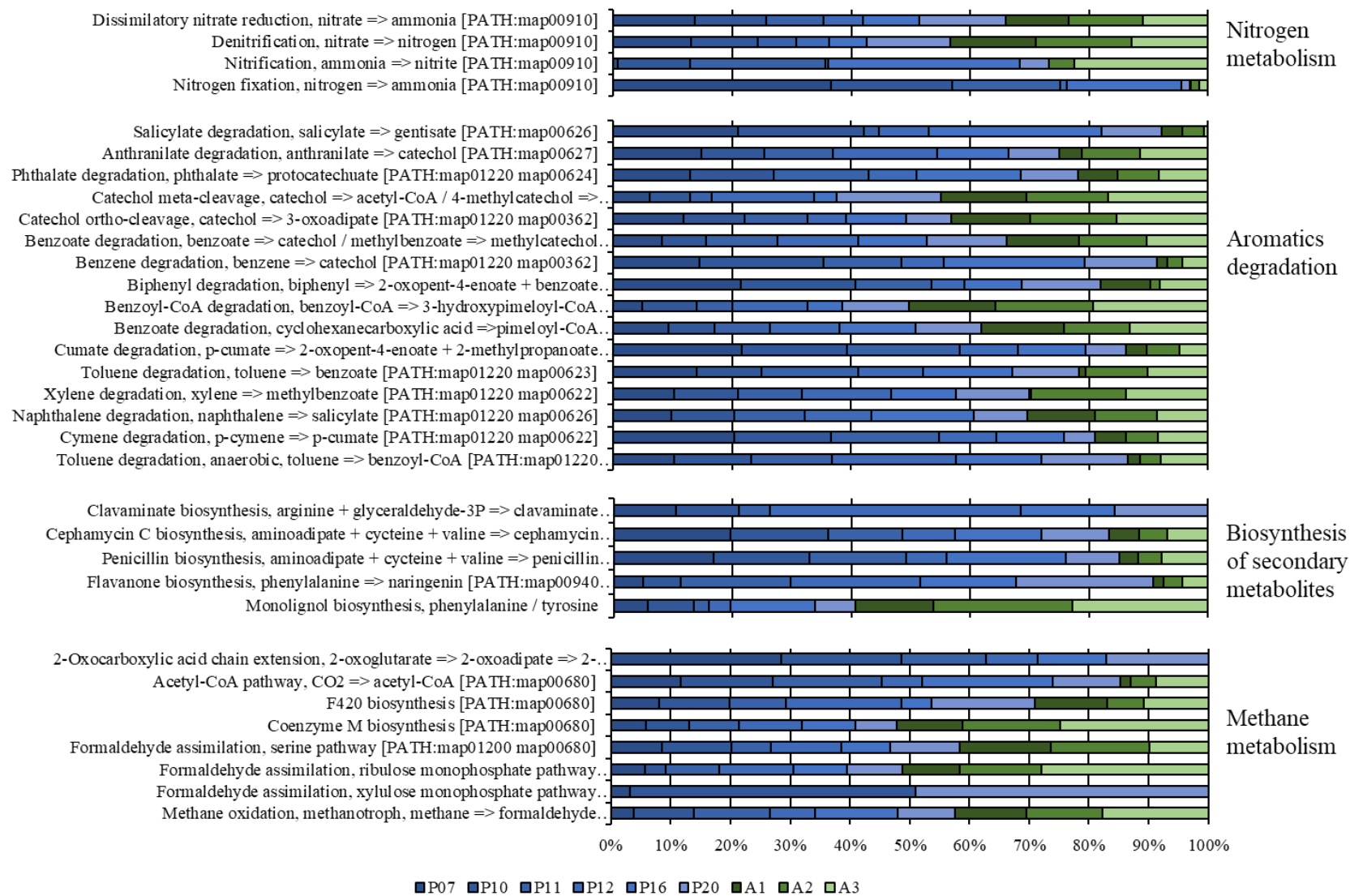


Figura 18: Destaque das principais funções de interesse biotecnológico presentes nas amostras e suas respectivas abundâncias.

5.6 DISCUSSÃO

O uso do sequenciamento metagenômico tem revolucionado os estudos de funções exercidas por comunidades microbianas em diversas áreas, como na medicina (TURNBAUGH et al., 2009), agricultura (SESSITSCH et al., 2012) e ambiental (GIGLIUCCI et al., 2017). Para algumas amostras, esta metodologia de sequenciamento poderia ser dificultosa, devido a problemas, como por exemplo, a obtenção de DNA total de boa qualidade e ainda a quantidade de massa total dessa amostra (DOS-SANTOS et al., 2017; WILSON; PIEL, 2013). Deste modo, muitos estudos limitam-se ao sequenciamento de genes 16S rRNA e a classificação taxonômica dos microrganismos. Entretanto, 16S rRNA ainda é uma poderosa ferramenta nos estudos de comunidades microbianas, na qual, hoje com a introdução de novas tecnologias de sequenciamento (sequenciamento em larga escala) e novas ferramentas de bioinformática, tem proporcionado um melhor entendimento das relações filogenéticas presentes nestas comunidades (JOVEL et al., 2016).

Em 2007, CASE et al. demonstraram que um gene funcional (*rpoB*) poderia também ser utilizado como um marcador molecular, como o 16S rRNA, na classificação taxonômica de espécies bacterianas. Seu trabalho utilizou sequências do gene *rpoB* e 16S rRNA depositados no banco de dados de genomas do NCBI de representantes dos filos Actinobacteria, Cianobacteria, Chlamidiae, Firmicutes, Proteobacteria e Spirochaetes. Estas sequências foram utilizadas para a montagem de duas árvores filogenéticas (uma para o gene *rpoB* e outra para 16S rRNA) e em seguida os perfis filogenéticos destas árvores (a organização dos clusters) foram comparadas. Os autores observaram que o perfil filogenético foi similar entre os genes. A correlação entre a filogenia e os atributos funcionais depende de fatores que incluem a complexidade da característica (função) (MARTINY; TRESEDER; PUSCH, 2013), porém as semelhanças no perfil filogenético entre os genes sugere que é possível prever as funções presentes em um genoma de um organismo nunca antes estudado com base em funções de genomas conhecidos e estreitamente relacionados (LANGILLE et al., 2013). Essas predições dos possíveis genes dos microrganismos em estudo poderiam ser feitas com base em descrições contidas em dados da literatura, porém isto requereria tempo e dependeria da fonte de dados consultada. Deste modo, a aplicação de tal estratégia requer um método automatizado que formaliza a relação entre distância evolutiva e potencial funcional em todo o metagenoma, explicando a variação na cópia do gene e se aproximando à precisão de um sequenciamento metagenômico (KEMBEL et al., 2012; LANGILLE et al., 2013). Programas de bioinformática (ou pacotes) que automatizam esta predição foram desenvolvidos, como por exemplo o PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) (LANGILLE et al., 2013) e o Tax4Fun (Taxonomy for Functions) (ABHAUER et al., 2015), onde o primeiro infere o conteúdo de genes por meio de uma árvore filogenética de 16S rRNA dependendo, assim, da topologia e a distância dos organismos na árvore. Como um organismo mais próximo dentro da topologia da árvore sempre existe, PICRUSt correlaciona todas as OTUs, mesmo que as distâncias filogenéticas sejam grandes. Este procedimento pode ser problemático ao analisar comunidades microbianas que possuem filos pouco caracterizados. Já pelo Tax4Fun, as sequências do gene 16S rRNA são relacionadas com a anotação funcional de genomas procarióticos já sequenciados e a análise é realizada com a identificação de um único organismo mais próximo com base em similaridade de 16S rRNA. Sendo assim, é mais preciso quanto à previsão da composição funcional, pois trata-se de avaliar um único organismo por OTU, não em um conjunto de organismos próximos por OTU. Outra limitação encontrada no uso do

PICRUSt foi quanto ao banco de dados de referência que as amostras devem ser classificadas. Ou seja, o seu arquivo de entrada (a classificação taxonômica das OTUs) deve ser classificado segundo o banco de dados Greengenes. Para o presente estudo, após a reclassificação das OTUs (utilizando o Greengenes) houve diferenças nesta classificação, quando comparadas com a amostra original (classificada de acordo com o SILVA e comparadas com o NCBI), o que poderia gerar uma falsa composição das funções previstas. Isto pode ser devido às atualizações dos bancos de dados, onde o banco de dados SILVA demonstrou sofrer uma maior frequência de atualizações de seus dados, tornando seus dados mais curados do que o Greengenes.

O Tax4Fun transforma a classificação taxonômica das OTU em perfil taxonômico de organismos KEGG, que é subsequentemente normalizado pelo número de cópia do 16S rRNA. Posteriormente, os perfis gênicos anotados no KEGG são convertidos em um “metagenoma artificial”, combinando os perfis funcionais calculados para cada um dos genomas disponível no KEGG. Este “metagenoma artificial” gerados por pacotes, como o Tax4Fun, tem demonstrado estar altamente correlacionado com os perfis funcionais encontrados em um sequenciamento metagenômico propriamente dito; mesmo para amostras que possuam diversos microrganismos ainda desconhecidos ou não cultiváveis, como por exemplo solos, foi possível obter um alto coeficiente de correlação Spearman entre perfis funcionais previstos pelo Tax4Fun e o sequenciamento metagenômico (0,871) (ASSHAUE et al., 2015).

O Tax4Fun foi desenvolvido para ser aplicado com dados obtidos em análise no QIIME utilizando o banco de dados do SILVA ou o servidor SILVAngs. Entretanto, aos usuários do Mothur, até o presente momento, não havia compatibilidade para o uso deste pacote. Aqui foi desenvolvido uma adaptação para aplicar os resultados obtidos em análise no Mothur para o Tax4Fun. Neste caso, os usuários podem realizar todas as análises no Mothur, e ao término, obter as sequências representativas. Em seguida estas sequências são reclassificadas no QIIME. Isto foi necessário pois o Tax4Fun precisa que as classificações estejam até o nível de espécie para a previsão das funções. No Mothur, os autores não recomendam esta classificação pois, segundo eles, para $reads \leq 250$ pb poderia gerar uma classificação imprecisa a nível de espécie (SCHLOSS et al., 2009).

A predição das funções (genes) que poderiam ser encontrados nas amostras estudadas demonstrou diferenças entre a metodologia de obtenção das amostras (Figura 14), porém não entre as amostras de cada grupo, ou seja, o perfil de genes presentes no conjunto “Apoplasto” diferiu dos dados obtidos das amostras de enriquecimento celular bacteriano de colmo (conjunto “Colmo”). Isto pode refletir a composição das OTUs presente em cada conjunto de dados, onde para as OTUs presentes nas amostras do conjunto “Colmo” foram mais homogêneas em comparação a do “Apoplasto”. Esta homogeneidade/heterogeneidade também pode ser observada na análise de PCA (Capítulo II) e ainda a ao observar as curvas de rarefação (Capítulo I – conjunto Colmo, Capítulo II – conjunto Apoplasto).

A composição gênica prevista pelo Tax4Fun revelou funções de interesse para agricultura e biorremediação. Dentre as unidades funcionais (módulos) relacionadas a aplicação na agricultura, o Metabolismo de Nitrogênio foi representado com 4 vias metabólicas envolvidas nos processos de desnitrificação e fixação biológica de nitrogênio (FBN). A FBN é um processo de grande interesse para a agricultura devido as suas vantagens (PEREIRA; REIS, 2011). Bactérias capazes de realizar esta função (chamadas de diazotróficas) já foram relatadas em tecidos de cana-de-açúcar (ANDO et al., 2005; THAWENUT et al., 2011) e ainda sua aplicabilidade no cultivo desta planta (DE NOGUEIRA et al., 2001; FISCHER et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2009). De mesmo modo, o processo de desnitrificação (redução do nitrato para gás nitrogênio – N_2) pode trazer diferentes contribuições para a planta, como por exemplo, quando o nitrogênio está na forma

de NO no processo de desnitrificação, pode alterar o crescimento de raízes laterais e adventícias, e modulando a produção de auxina (CORREA-ARAGUNDE et al., 2016; PAGNUSSAT; LANTERI; LAMATTINA, 2003; PII et al., 2015) e ainda atuando no ciclo do nitrogênio em conjunto com bactérias diazotróficas (na qual torna biodisponível o N₂ na forma de NH₄⁺ através da enzima nitrogenase) (BEDMAR et al., 2013). Bactérias que possuem esta característica também têm sido relatadas em tecidos de cana-de-açúcar (YEOH et al., 2016).

Outras funções de interesse agrícola estão relacionadas à síntese de metabólitos secundários. Na análise preditiva foi possível detectar a presença de vias metabólicas ligadas a produção de antibióticos β-lactâmicos, como clavaminato, que já teve relatada sua produção por *Streptomyces clavuligerus* (SALOWE; MARSH; TOWNSEND, 1990); a cefamicina, que também já teve relatada em *S. clavuligerus*, mas as bactérias *Nocardia lactamdurans* e *Lysobacter lactamgenus* também são capazes de produzir este antibiótico (LIRAS, 1999); e a penicilina, comumente sintetizada por fungos do gênero *Penicillium*, também foram detectados genes relacionados a produção deste composto nas bactérias *Burkholderia fungorum* e *Mesorhizobium loti* (KALIA et al., 2007). A produção destes antibióticos poderiam estar auxiliando a planta na proteção contra patógenos (RAAIJMAKERS; VLAMI; DE SOUZA, 2002). Ainda em relação aos metabólitos secundários, foram encontrados genes relacionados a via metabólica de biossíntese de flavonoides. Neste caso, estes compostos têm sido relatados como responsáveis por atrair bactérias simbiotes em plantas (ABDEL-LATEIF; BOGUSZ; HOCHER, 2012; REDDY et al., 2007), e ainda exercem funções de proteção a planta a fatores abióticos, como por exemplo contra o estresse oxidativo desencadeado pelo excesso de raios UV e baixa irrigação (TATTINI et al., 2004) e proteção contra patógenos pela ação anti-sensoriamento populacional (*quorum sensing*) (KORDBACHEH; EFTEKHAR; EBRAHIMI, 2017). Apesar de ser uma característica de plantas a produção de flavonoides, em 2015 houve o primeiro relato de que a produção de um flavonoide por bactéria - a *Streptomyces clavuligerus*, que é capaz de produzir o composto naringenina (ÁLVAREZ-ÁLVAREZ et al., 2015). Este composto foi relatado como estimulador da colonização de *Azorhizobium caulinodans* em raízes de *Arabidopsis thaliana* (GOUGH et al., 1997) e trigo (WEBSTER et al., 1998). Também foi descrito como regulador na expressão de genes envolvidos na síntese da parede celular e produção de fitohormônios em *H. seropedicae* (TADRA-SFEIR et al., 2011). Outra via metabólica prevista nas análises envolve genes relacionados a produção de monolignol. Esta via está ligada a produção da parede celular das células vegetais (WANG et al., 2013b) e genes envolvidos na síntese de seu precursor (fenilalanina) têm sido relatados em sedimentos de *Streptomyces maritimus* (MOORE et al., 2002).

Para a unidade funcional de metabolismo de metano foram previstos, principalmente, genes envolvidos na via de assimilação de formaldeído e oxidação do metano. Bactérias metanotróficas, aquelas que são capazes de assimilar o metano como sua fonte de carbono (HANSON; HANSON, 1996), têm sido reportadas como importantes coadjuvantes na biorremediação de áreas contaminadas com metais pesados e poluentes orgânicos (PANDEY et al., 2014). Em relação à sua aplicabilidade na agricultura, em plantas de arroz, um estudo baseado em análises de proteômica, revelou a presença de bactérias do gênero *Methylocella* colonizando esta planta e contribuindo para o desenvolvimento da mesma através da fixação biológica de nitrogênio, além de sua principal característica – oxidar o metano atmosférico (BAO et al., 2014).

Em relação a unidade funcional de degradação de compostos aromáticos, em sua maior parte foi composta por degradação de xenobióticos. Bactérias que exercem esta função podem ser utilizadas no processo de biorremediação (WIDADA; NOJIRI; OMORI, 2002). Dentre as vias metabólicas encontradas, incluem a degradação de compostos que poderiam ser

encontrados em ambientes contaminados por petróleo. Neste contexto, diferentes bactérias têm sido utilizadas para a descontaminação (CHEN et al., 2015), como por exemplo o *Bacillus cereus* (BANERJEE; GHOSHAL, 2017).

Estas funções apresentadas aqui poderiam ser aplicadas no cultivo da cana-de-açúcar (e outras *poaceae*/plantas), empregando metodologias da engenharia genérica como por exemplo, um gene de interesse poderia ser expresso de forma heterólogo em outra bactéria (WILSON; PIEL, 2013), e ainda aumentar a sua expressão (GONG et al., 2017; LOACES et al., 2015). Esta abordagem permitiu avaliar a expressão do gene 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (*acdS*) (pertencente a cadeia de síntese do fitohormônio etileno) de uma bactéria não-cultivável, através da montagem da biblioteca metagenômica e expressão heteróloga em células de *E. coli* (NIKOLIC; SCHWAB; SESSITSCH, 2011), demonstrando que as funções úteis de microrganismos não-cultiváveis poderiam ser melhor compreendidas e ainda aplicadas. Outra forma de explorar estas funções poderia ser através do consórcio dos microrganismos identificados na análise preditiva com habilidades benéficas, como por exemplo, a utilização de um inoculante que possui um consórcio de bactérias diazotróficas (capazes de tornar biodisponível o nitrogênio atmosférico) no cultivo da cana-de-açúcar (DA SILVA et al., 2009) e arroz (SILVA FERREIRA; IVO BALDANI; DIVAN BALDANI, 2010). Para além disto, avanços na engenharia genética poderá harmonizar a utilização das funções benéficas dos microrganismos não-cultiváveis (através da expressão heteróloga) em consórcio com microrganismos cultiváveis com características benéficas já bem descritas.

5.7 CONCLUSÕES

- ✓ A análise preditiva das funções relacionadas a microbiota endofítica presente em colmos de cana-de-açúcar demonstrou um grande potencial metabólico de aplicações biotecnológicas.
- ✓ O conjunto de genes previsto para esta comunidade foi ligado a diferentes campos de aplicação, que envolveram desde a aplicação na agricultura (como por exemplo genes atuantes nas vias de fixação biológica de nitrogênio e produção de flavonoides) e na biorremediação (como por exemplo, o tratamento de áreas contaminadas por compostos presentes no petróleo).
- ✓ Este foi um estudo exploratório, porém futuros trabalhos que abordem a utilização destas funções de forma biotecnológica podem trazer grandes avanços para a agricultura e a biorremediação.

6 CAPÍTULO IV

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *SPHINGOMONAS* ASSOCIADAS AO LÍQUIDO DO APOPLASTO DE COLMO DE CANA-DE-AÇÚCAR

6.1 RESUMO

O gênero *Sphingomonas* compreende bactérias Gram-negativas, em forma de bastonetes, aeróbicas e sua principal fonte de carbono é a glicose. Sua membrana externa possui glicosfingolipídeos (GSLs), que se difere de outras bactérias Gram-negativas que possuem lipopolissacarídeos (LPSs). Isolados deste gênero têm sido descritos como associativos de espécies de plantas agronomicamente importantes, como arroz, milho e soja. Outros trabalhos têm demonstrado benefícios proporcionados por estas bactérias como a proteção contra patógenos e promoção do crescimento vegetal, através da produção de fitohormônios e fixação biológica de nitrogênio. O líquido do apoplasto compõe ~3 % do volume do colmo de cana-de-açúcar e possui aproximadamente ~12 % de sacarose. Esse espaço intercelular tem sido descrito como um local apropriado para o estabelecimento de bactérias endofíticas tais como as bactérias diazotróficas *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae*. Estudos recentes utilizando abordagens independentes e dependente de cultivo têm reportado a presença desse gênero em amostras de cana-de-açúcar, porém sua diversidade tem sido pouco avaliada. Trabalhos que visam o isolamento de espécies deste gênero têm sido baseados em seleção de colônias com pigmento amarelo, e utilizando antibióticos como estreptomicina e piperacilina, o que possibilita a redução de microrganismos não-alvo (“background”) na seleção das colônias. O presente trabalho fez uso do líquido do apoplasto de colmo de cana-de-açúcar de duas variedades, e meios de cultura (rico e mínimo suplementado com antibióticos) com o objetivo de avaliar a diversidade de isolados do gênero *Sphingomonas*. Foram obtidos 57 isolados de colônias com coloração amarelas/laranjas. O DNA genômico foi extraído e submetido à uma análise de PCR utilizando iniciadores específicos para *Sphingomonas*. Foram observados produtos de amplificação para 88 % dos isolados. O uso da técnica de BOX-PCR permitiu a identificação de 7 grupos principais e outros isolados, totalizando 30 filotipos com similaridade de ≥ 70 %. O sequenciamento do gene 16S rRNA dos representantes de cada grupo e dos demais filotipos demonstraram similaridade ≥ 80 % com espécies já descritas, como por exemplo *S. paucimobilis* e *S. azotifigens*. Porém, alguns perfis filogenéticos sugerem a existência de novas espécies. Os resultados deste estudo ampliaram o conhecimento sobre a ocorrência de *Sphingomonas* nos tecidos de cana-de-açúcar e podem contribuir para o desenvolvimento de novos insumos baseados na interação planta-*Sphingomonas*.

Palavras-chave: *Sphingomonas*. BOX-PCR. PCR gênero-específico. 16S rRNA. Diversidade.

6.2 ABSTRACT

The *Sphingomonas* genus comprises bacterial gram-negative, rod-shaped, aerobic and your main source of carbon is glucose. Its outer membrane have glycosphingolipid (GSLs), which differs from other gram-negative bacteria that possess lipopolysaccharides (LPSs). Isolates of this genus have been described as associative of agriculturally important plant species, such as rice, maize and soybeans. Other studies have shown benefits provided by these bacteria as protection against pathogens and plant growth promotion, through the production of phytohormones and biological nitrogen fixation. The apoplast sap composes ~ 3% of the volume of the sugarcane stem and has about ~ 12% sucrose. This intercellular space has been described as an appropriate location for the establishment of endophytic bacteria such as the diazotrophs *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae*. Recent studies using culture-independent and -dependent approaches have reported the presence of this genus in sugarcane samples, but your diversity has been little evaluated. Works aimed at the isolation of species of this genus have been based on selection of colonies with yellow pigment, and using antibiotics such as streptomycin and piperacilin, which enables the reduction of non-target organisms (background) in selection of the colonies. The present work used of the apoplast sap of sugarcane stems of two varieties and culture media (rich and minimal, supplemented with antibiotics) to assess the diversity of isolates of the *Sphingomonas* genus. 57 isolated colonies were obtained with yellow/orange coloring. Genomic DNA was extracted and subjected to PCR analysis using specific primers for *Sphingomonas*. Were observed amplification products for 88% of the isolates. The use of the technique of BOX-PCR allowed the identification of 7 main groups and other isolates, totaling 30 filotypes with similarity of $\geq 70\%$. The 16S rRNA gene sequencing of the representatives from each group and the remaining filotypes showed similarity $\geq 80\%$ with already described species, such as *S. paucimobilis* and *S. azotifigens*. However, some phylogenetic profiles suggest the existence of new species. The results of this study have amplified knowledge about the occurrence of *Sphingomonas* in tissues of sugarcane and can contribute to the development of new inputs based in plant-*Sphingomonas* interaction.

Keywords: *Sphingomonas*. BOX-PCR. Gender-specific PCR. 16S rRNA.

6.3 INTRODUÇÃO

O gênero *Sphingomonas*, descrito por Yabuuchi et al. (1990), compreende bactérias Gram-negativas, em forma de bastonetes, com tamanho celular que varia de 0,2–1,4 x 0,5–4,0 µm, estritamente aeróbicas e sua principal fonte de carbono é a glicose, porém outros tipos de açúcares como a sacarose, galactose e xilose também são assimilados por bactérias deste gênero (GARRITY et al., 2005; GLAESER; KÄMPFER, 2014). Suas colônias podem chegar até aproximadamente 1 mm de diâmetro e produzem principalmente um pigmento amarelo (GARRITY et al., 2005). Sua membrana externa possui glicosfingolipídeos (GSLs), do qual se difere de outras bactérias Gram-negativas que possuem lipopolissacarídeos (LPS) (TAKEUCHI; HAMANA; HIRAISHI, 2001). As principais espécies descritas deste gênero provêm de origem clínica, como a *Sphingomonas adhaesiva*, *Sphingomonas capsulata*, *Sphingomonas parapaucimobilis*, *Sphingomonas yanoikuyae* e *Sphingomonas paucimobilis* (espécie tipo) (YABUUCHI; YANO; OYAIZU, 1990), porém, de acordo com o LPSN (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*) hoje há 111 espécies deste gênero (PARTE, 2013), isolados de diversos ambientes, como rizosfera (CHUNG et al., 2011), solo (LEYS et al., 2004) e água doce e marinha (CHANG et al., 2000). Isolados deste gênero também têm sido descritos como associativas de espécies de plantas agronomicamente importantes, como arroz (VIDEIRA et al., 2009), milho (GAO et al., 2016) e soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2005), e outros trabalhos têm demonstrado benefícios proporcionado por estas como a biorremediação (LEYS et al., 2004; ZHOU et al., 2012), proteção contra patógenos vegetais (INNEREBNER; KNIEF; VORHOLT, 2011) e promoção do crescimento vegetal, através da produção de fitohormônios (TSAVKELOVA; CHERDYNTSEVA; NETRUSOV, 2005) e fixação biológica de nitrogênio (VIDEIRA et al., 2009; MUANGTHONG; YOUPENSUK; RERKASEM, 2015).

O líquido do apoplasto compõe ~3 % do volume do colmo de cana-de-açúcar e possui aproximadamente ~12% de sacarose (DONG et al., 1994). Esse espaço intercelular tem sido descrito como um possível local para o estabelecimento de bactérias endofíticas (DONG; MCCULLY; CANNY, 1997), como bactérias diazotróficas *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE; DOBEREINER, 1988; GILLIS et al., 1989) e *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986), porém, ainda há a discussão sobre a real localização dos endófitos nos tecidos internos da cana-de-açúcar (JAMES et al., 2001).

Estudos recentes utilizando abordagens independentes (DE SOUZA et al., 2016; YEOH et al., 2016; DOS-SANTOS et al., 2017) e dependente de cultivo (BENEDUZI et al., 2013) têm reportado a presença do gênero *Sphingomonas* em amostras de cana-de-açúcar, porém sua diversidade é pouco conhecida. Trabalhos que visam o isolamento de espécies deste gênero têm sido baseados em seleção de colônias de pigmento amarelo, e utilizando antibióticos como estreptomicina (VANBROEKHOVEN et al., 2004) e piperacilina (YIM et al., 2010), o que possibilita a redução de microrganismos não-alvo (*background*) na seleção das unidades formadoras de colônias (UFCs).

Neste presente trabalho, foi utilizado o líquido do apoplasto de colmo de cana-de-açúcar de duas variedades comerciais (RB867515 e IACSP5000), e meios rico e mínimo suplementado com antibióticos com o objetivo de avaliar a diversidade de *Sphingomonas* a partir de análise de colônias com pigmentos amarelos e laranjas.

6.4 MATERIAS E MÉTODOS

6.4.1 Extração do líquido do apoplasto e semeadura em meios de cultivo

O líquido do apoplasto das variedades RB867515 e IACSP5000 foi extraído utilizando a metodologia de DONG et al. (1994), na qual consistiu em descascar, desinfestar e centrifugar pedaços de colmo, contendo somente os entrenós e com ~10 cm, em tubos de 50 mL.

Após a extração do líquido do apoplasto, foram feitas diluições até 100x em solução salina 0,9%, e foram inoculadas 100 µL de cada diluição em placas de petri contendo 20 mL dos meios sólidos DYGS, JMV e L9 (ver composição em Anexo I), suplementado com 50 µg mL⁻¹ de cicloheximida, 100 µg mL⁻¹ estreptomicina (VANBROEKHOVEN et al., 2004) e 50 µg mL⁻¹ de piperacilina (YIM et al., 2010). Os inóculos foram cultivados por 4 dias à 30 °C.

6.4.2 Seleção de colônias *Sphingomonas*-tipo e preparo de estoques

Após 4 dias de cultivo, foram selecionadas colônias que apresentaram a coloração amarelo/laranja de cada meio e diluição, e em seguida, os isolados foram repicados para uma nova placa (placa-mestre) de seus respectivos meios de origem, desta vez sem antibiótico. Estas placas foram então incubadas à 30 °C por 48 hrs.

Os estoques dos isolados foram preparados através do cultivo destes em 3 mL de meio DYGS líquido por 24 hrs à 30 °C sob agitação à 200 rpm. Em seguida foram aliqüotados duas réplicas de 1 mL de cada isolado em criotubos de 1,5 mL, centrifugando-os à 5.000 x g por 10 min à 20 °C, retirando o sobrenadante no final e adicionando 1 mL da solução glicerol-água 50 % (v/v). Após completa homogeneização dos estoques, uma réplica de cada isolado foi armazenada à -20 °C e a outra à -70 °C. Os isolados foram nomeados com códigos que representam o meio de origem (DYGS =DY; JMV = JM; L9 = L9), a variedade de cana-de-açúcar (RB867515 = RB; IACSP5000 = IAC); o material de origem (Apoplasto = AP); a data de preparo do estoque (4/4/2017 = 44) e seu respectivo número.

6.4.3 Extração do DNA genômico e quantificação

Um mililitro dos inóculos de cada isolado em meio DYGS líquido, foi utilizado para a extração de DNA genômico (gDNA), na qual foi utilizado o kit de extração Wizard Genomic DNA Purification, ressuspensando o gDNA resultante em 50 µL de água grau PCR e deixando à 4 °C por 12 hrs para total ressuspensão.

Os gDNA dos isolados foram então quantificados por espectrofotometria, no equipamento NanoDrop, e em seguida foi verificado a sua integridade em eletroforese gel de agarose não-desnaturante à 0,8 %, utilizando ~100 ng de gDNA de cada isolado.

6.4.4 Confirmação dos isolados por PCR com iniciadores específicos para o gênero *Sphingomonas*

Para a confirmação dos isolados positivos para *Sphingomonas* foram utilizados ~50 ng do gDNA de cada isolado em reações de PCR com os iniciadores Sph-spt694f (5'-GAGATCGTCCGCTTCCGC-3') e Sph-spt983r (5'-CCGACCGATTTGGAGAAG-3') específicos para o gene Serina palmitoiltransferase (*spt*) de *Sphingomonas* (YIM et al., 2010). As reações foram executadas em sistemas de 20 µL, na qual possuíam 1x do tampão Green GoTaq Flexi Buffer, 1,5 mM da solução de MgCl₂, 50 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada iniciador, 0,5 U da enzima GoTaq DNA Polimerase e ~5 ng de DNA molde, utilizando uma

desnaturação inicial à 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 45 seg, 55 °C por 45 seg e 72 °C por 45 seg, ao término, foi adicionado uma etapa de 72 °C por 5 min. Os amplicons foram eletroforicamente separados em um gel de agarose não-desnaturante à 3 %, e foram selecionados os isolados com amplificação positiva (com o tamanho do amplicon esperado de ~300 pb) para posterior análises.

Para confirmar a especificidade dos iniciadores para o gene *spt* de *Sphingomonas*, foram utilizados 5 isolados anteriormente classificados como sendo do gênero *Sphingomonas* e depositados na Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas (CCBD) da Embrapa Agrobiologia e 1 isolado deste trabalho. Após amplificação com os iniciadores para o gene *spt* e confirmação em gel de agarose, os amplicons foram sequenciados utilizando a metodologia Sanger e as sequencias foram comparadas com o banco de dados não redundante (nr) do NCBI.

6.4.5 Caracterização por BOX-PCR

Para a separação dos filotipos dos isolados selecionados na PCR-*spt* (positivos, com tamanho de amplicon esperado de ~300 pb) em clusters (grupos), foi realizado a análise por BOX-PCR, utilizando aproximadamente 30 ng de gDNA em reações de 10 µL, na qual possuíam 1x do tampão Green GoTaq Flexi Buffer, 1,5 mM da solução de MgCl₂, 75 µM de cada dNTP, 1 µM do iniciador BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC; SCHNEIDER; BRUIJN, 1994), 1 U da enzima GoTaq DNA Polimerase e ~30 ng de DNA molde. O ciclo de reações consistiu em uma desnaturação inicial à 95 °C por 5 min, e 30x de 94 °C por 1 min, 54 °C por 1 min e 65 °C por 8 min, ao término, foi adicionado uma etapa de 65 °C por 16 min. Em seguida, 5 µL dos amplicons foram eletroforicamente separados em um gel de agarose não-desnaturante à 2 % à 90 volts por 2 hrs. Os géis foram corado com solução de brometo de etídio a 10 mg/ml e em seguida visualizados a transluminação UV utilizando o fotodocumentador Kodak Gel Logic 100 Imaging System. As imagens geradas foram analisadas no software BioNumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, versão 7.0), gerando dendogramas com o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean) e coeficiente de Jaccard (J) (SNEATH; SOKAL, 1973), com um tolerância de 2% (KASCHUK et al., 2006), onde foram gerados *clusters* (grupos) com similaridade ≥ 70 %.

6.4.6 Sequenciamento dos genes 16s rRNA e classificação taxonômica

Um representante de cada grupo (*cluster*) formado na análise de BOX-PCR, os demais filotipos com similaridade menor que 70 % entre os isolados e um isolado com resultado negativo para a PCR com os iniciadores específicos para o gene *spt*, foram utilizados para o sequenciamento do gene 16S rRNA e análise de taxonomia. Para esta análise, primeiro foi realizado a PCR dos genes 16S rRNA com os iniciadores 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (LANE, 1991) e Amp2 (5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3') (WANG; QI; CUTLER, 1993), com reações de 20 µL compostas por 1x do tampão Colorless GoTaq Flexi Buffer, 1,5 mM da solução de MgCl₂, 50 µM de cada dNTP, 0,25 µM de cada iniciador, 0,5 U da enzima GoTaq DNA Polimerase e ~10 ng de DNA molde. O ciclo de amplificação desta PCR foi composto por uma desnaturação inicial à 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 60 °C por 45 seg e 72 °C por 2 min, e por fim, uma etapa de 72 °C por 8 min. Os amplicons foram confirmados em gel de agarose não-desnaturante à 1 %, aplicando 5 µL da reação e, em seguida, quantificados por espectrofluorimetria utilizando o equipamento Qubit® (Invitrogen) com o kit de marcação Qubit® dsDNA BR Assay. Aproximadamente 10 µL de cada reação foram submetidos ao tratamento com as enzimas ExoI (ThermoFisher) e FASTAP

(ThermoFisher), adicionando, respectivamente, 6 e 0,7 Unidades de cada enzima. Aproximadamente 100 ng de cada amplicon tratado foram utilizados para a reação de marcação e sequenciamento utilizando a plataforma Sanger, no sequenciador Applied Biosystems™ 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems), utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) para o preparo das reações de sequenciamento. As sequencias foram analisadas quanto a qualidade de suas bases utilizando o software Chromatogram 2 Fasta Converter v1.2.0 (2014) (Heracle BioSoft, www.DnaBaser.com), de acordo com a escala Phred, excluindo regiões com qualidade inferior a 30 (99.9 % de precisão) e as sequencias complementares (*foward* e *reverse*) de cada isolado foram utilizadas para a montagem de *contigs* utilizando a ferramenta CAP (Contig Assembly Program) (HUANG, 1992) do software BioEdit v7.2.5 (HALL, 1999), alterando a porcentagem de similaridade mínima para 90 %. Para os isolados que não foram obter qualidade satisfatória no sequenciamento, foi realizado uma nova PCR, desta vez com o iniciador 27F, em reações diferentes, com os iniciadores 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991) e 1062r (5'-CTCACRRCACGAGCTGAC-3') (DE GREGORIS et al., 2011), utilizando as mesmas condições descritas anteriormente.

As sequencias contiguas (*contigs*) foram comparadas com os bancos de dados SILVA e EzBioCloud, utilizando as plataformas online SINA (PRUESSE; PEPLIES; GLÖCKNER, 2012) (para a classificação baseada SILVA) e “Identify Service” (EzBioCloud, sequencias de espécies tipo) (YOON et al., 2017) para a confirmação dos gêneros, espécies e estirpe (quando possível). Em seguida foram alinhadas utilizando o software Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011), implementado no site do EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk - *European Bioinformatics Institute*) (MCWILLIAM et al., 2013), junto com sequencias de espécies tipo de *Sphingomonas* obtidas na análise no EzBioCloud. O alinhamento resultante foi importado para o software MEGA 7 (KUMAR et al., 2008), onde foi realizado primeiro teste estatístico para determinar o modelo evolutivo (ou de substituição de nucleotídeos) mais apropriado para a análise de filogenia, baseado em pontuações do Critério de Informação Bayesiano (BIC - Bayesian Information Criterion) (SCHWARZ, 1978). Em seguida, foi construído uma árvore filogenética utilizando o método Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987), com o modelo estatístico mais apropriado, com 1000 repetições.

6.5 RESULTADOS

6.5.1 Características gerais das colônias obtidas

Para este experimento, foi utilizado 10^1 do líquido do apoplasto obtido na extração de cada variedade, para realizar as diluições. Ou seja, foram obtidos 15 mL de líquido do apoplasto de cada variedade, e deste foi feita uma amostragem de 100 μ L para as diluições e semeadura. A variedade RB867515 foi a que apresentou maior número de UFC (392 colônias) em relação a variedade IACSP5000 (239 colônias), e subsequente, também foi que apresentou maior número de UFCs amarelas/laranjas (33 colônias X 24 colônias da variedade IACSP5000) (Tabela 9). De modo geral, as colônias que se desenvolveram nos meios foram muito similares entre si, na qual em sua maioria possuíam a forma circular, de elevação convexa e com margem inteira. Algumas exceções puderam ser vistas no meio JMV, no qual alguns apresentaram a forma rizóide, com elevação plana e margem lobulada, e ainda outras com forma circular, com elevação papilada e margem inteira; e no meio DYGS possuía uma colônia na forma filamentososa, com elevação convexa e margem filamentososa. Para as colônias amarela/laranjas selecionadas, todas possuíam a forma circular, convexa e de margem inteira (Figura 19).

6.5.2 Triagem dos filotipos

A análise por PCR com iniciadores específicos para o gênero, que flanqueiam o gene *spt*, indicou que dos 57 isolados selecionados, 88 % apresentaram resultado positivo na PCR (amplicon de 300 pb), ou seja, apenas 7 dos isolados com coloração amarelo/laranja não foi possível amplificar por esta PCR, indicando que possivelmente estes isolados não são do gênero *Sphingomonas* (Figura 20). A confirmação da especificidade dos iniciadores em flanquear o gene *spt* de *Sphingomonas*, demonstrou que as sequências obtidas tinham similaridade ao gene *spt* das espécies de *Sphingomonas* utilizadas como controle, indicando novamente que os isolados que deram negativos na PCR, possivelmente, não pertencem ao gênero alvo do trabalho.

Tabela 9: Relação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de cada variedade de cana-de-açúcar dos meios utilizados no trabalho

Variedade	Meio	Total de UFC (Todas diluições)	Total de UFC amarelas/laranjas
RB867515	DYGS	142	21
	JMV	176	11
	L9	74	1
Subtotal		392	33
IACSP5000	DYGS	85	15
	JMV	102	7
	L9	52	2
Subtotal		239	24
Total		631	57

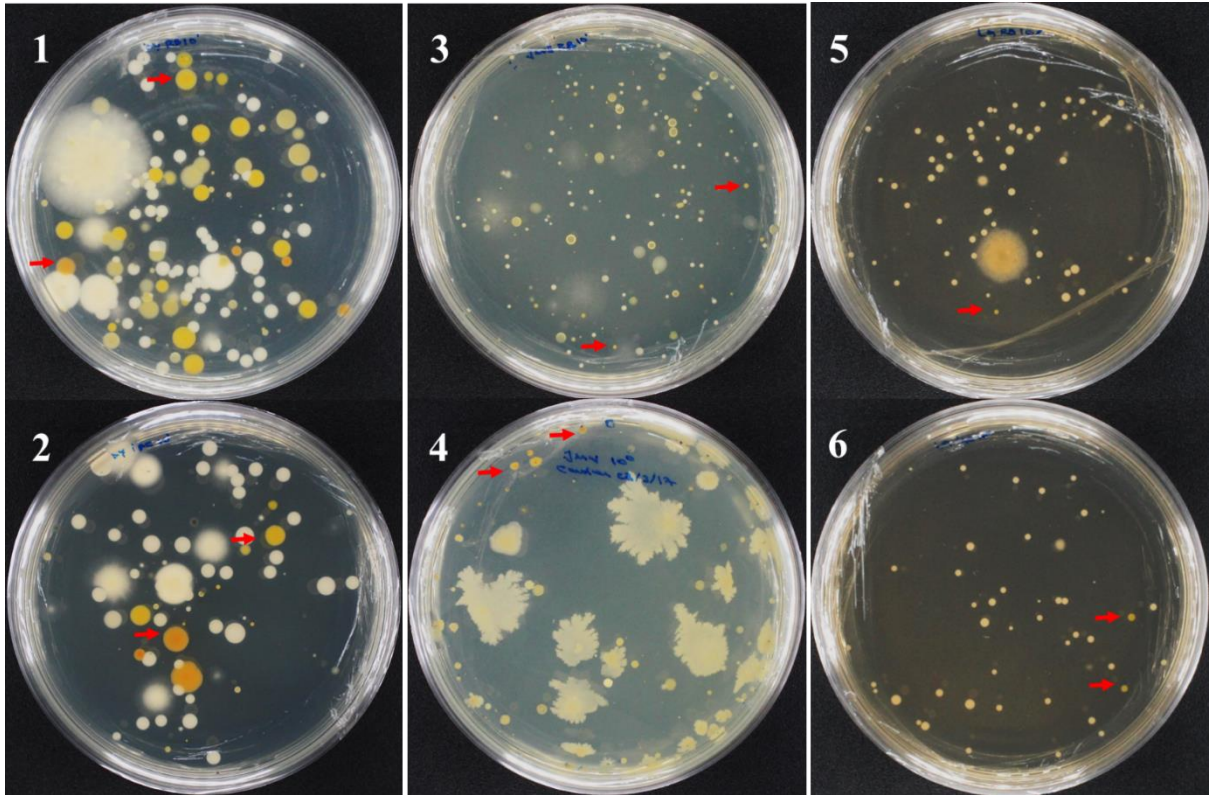


Figura 19: Aspecto das colônias formadas nos meios suplementados com antibióticos. Ambas figuras são de inóculos não diluídos. 1 e 2 meios DYGS, 3 e 4 meios JMV, 5 e 6 meios L9. 1, 3 e 5 são inóculos da variedade RB867515. 2, 4 e 6 variedades IACSP5000. As setas vermelhas indicam colônias típicas de *Sphingomonas*.

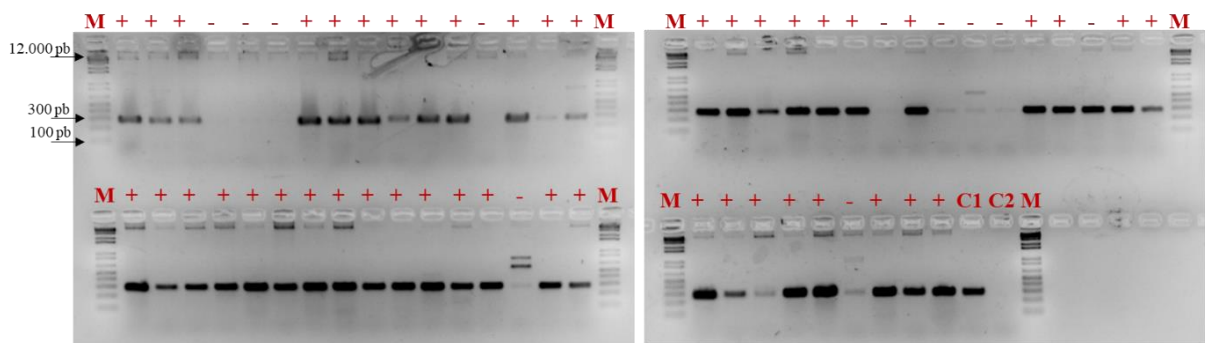


Figura 20: Resultado da PCR do gene *spt* para seleção dos isolados *Sphingomonas*-tipo. *M* padrão de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen), *C1* controle de *Sphingomonas* sp., *C2* controle negativo (branco). Os amplicons com resultado esperado (~300 pb) estão indicados com o símbolo positivo (+).

O dendograma obtido a partir dos dados gerados pela técnica de BOX-PCR (Figura 21) revelou que todos os isolados (incluindo dos meios distintos e das duas variedades de cana) formaram sete grupos principais, sendo o primeiro (G1) composta por 13 isolados, sendo 11 pertencentes à variedade RB867515 (7 do meio DYGS, 3 do meio JMV e 1 do meio L9) e 2 isolados da variedade IACSP5000 originados dos meios DYGS e L9. O segundo grupo (G2) foi composto por um representante de cada variedade, sendo do DYGS para a RB867515 e L9 para a IACSP5000. O terceiro grupo (G3) foi exclusivamente de isolados da variedade IACSP5000, sendo 2 isolados do meio DYGS e 1 do JMV. O quarto grupo (G4) foi formado por 1 representante de cada variedade e ambos vindo do meio DYGS. Similar ao G3,

o grupo cinco (G5) foi formado por representantes somente da variedade RB867515, de origem do meio DYGS. O sexto grupo (G6) foi formado por 1 representante de cada variedade originados do meio JMV. E o grupo sete (G7), possui 2 isolados da variedade RB867515, dos meios DYGS e JMV. Os demais filotipos (24 isolados) que apresentaram similaridade menor que 70 % em comparação aos demais, foram originados dos meios DYGS e JMV, sendo, 8 isolados do meio DYGS e 6 do JMV para a variedade RB867515 e 7 e 3 isolados nos meios DYGS e JMV, respectivamente, para a variedade IACSP5000 (Tabela 10).

Tabela 10: Distribuição dos isolados de cada variedade nos grupos formados na BOX-PCR.

RB867515			IACSP5000		
Grupo BOX-PCR	Isolados Cód.	Cor Colônia	Grupo BOX-PCR	Isolados Cód.	Cor Colônia
G1	DYAPRB4421	Amarela	G1	DYAPIAC4411	Amarela
G1	DYAPRB4423	Amarela	G1	L9APIAC4401	Amarela
G1	DYAPRB4424	Amarela	G2	L9APIAC4402	Amarela
G1	DYAPRB4425	Amarela	G3	DYAPIAC4402	Amarela
G1	DYAPRB4426	Amarela	G3	DYAPIAC4403	Amarela
G1	DYAPRB4429	Amarela	G3	JMAPIAC4401	Amarela
G1	DYAPRB4431	Amarela	G4	DYAPIAC4408	Laranja
G1	JMAPRB4408	Amarela	G6	JMAPIAC4402	Amarela
G1	JMAPRB4411	Amarela		DYAPIAC4401	Laranja
G1	JMAPRB4412	Amarela		DYAPIAC4407	Laranja
G1	L9APRB4403	Amarela		DYAPIAC4409	Laranja
G2	DYAPRB4422	Amarela		DYAPIAC4410	Laranja
G4	DYAPRB4427	Laranja		DYAPIAC4412	Amarela
G5	DYAPRB4416	Amarela		DYAPIAC4414	Amarela
G5	DYAPRB4420	Amarela		DYAPIAC4415	Amarela
G6	JMAPRB4414	Amarela		JMAPIAC4404	Amarela
G7	DYAPRB4435	Amarela		JMAPIAC4405	Rosa*
G7	JMAPRB4418	Amarela		JMAPIAC4407	Branca**
	DYAPRB4417	Amarela			
	DYAPRB4418	Amarela			
	DYAPRB4419	Amarela			
	DYAPRB4428	Laranja			
	DYAPRB4432	Laranja			
	DYAPRB4433	Amarela			
	DYAPRB4434	Amarela			
	DYAPRB4436	Amarela			
	JMAPRB4409	Amarela			
	JMAPRB4410	Amarela			
	JMAPRB4413	Laranja			
	JMAPRB4415	Amarela			
	JMAPRB4416	Amarela			
	JMAPRB4417	Amarela			

* isolado com coloração diferente dos demais, porém positivo na PCR-*spt*

**isolado representativo dos que deram resultado negativo na PCR-*spt*

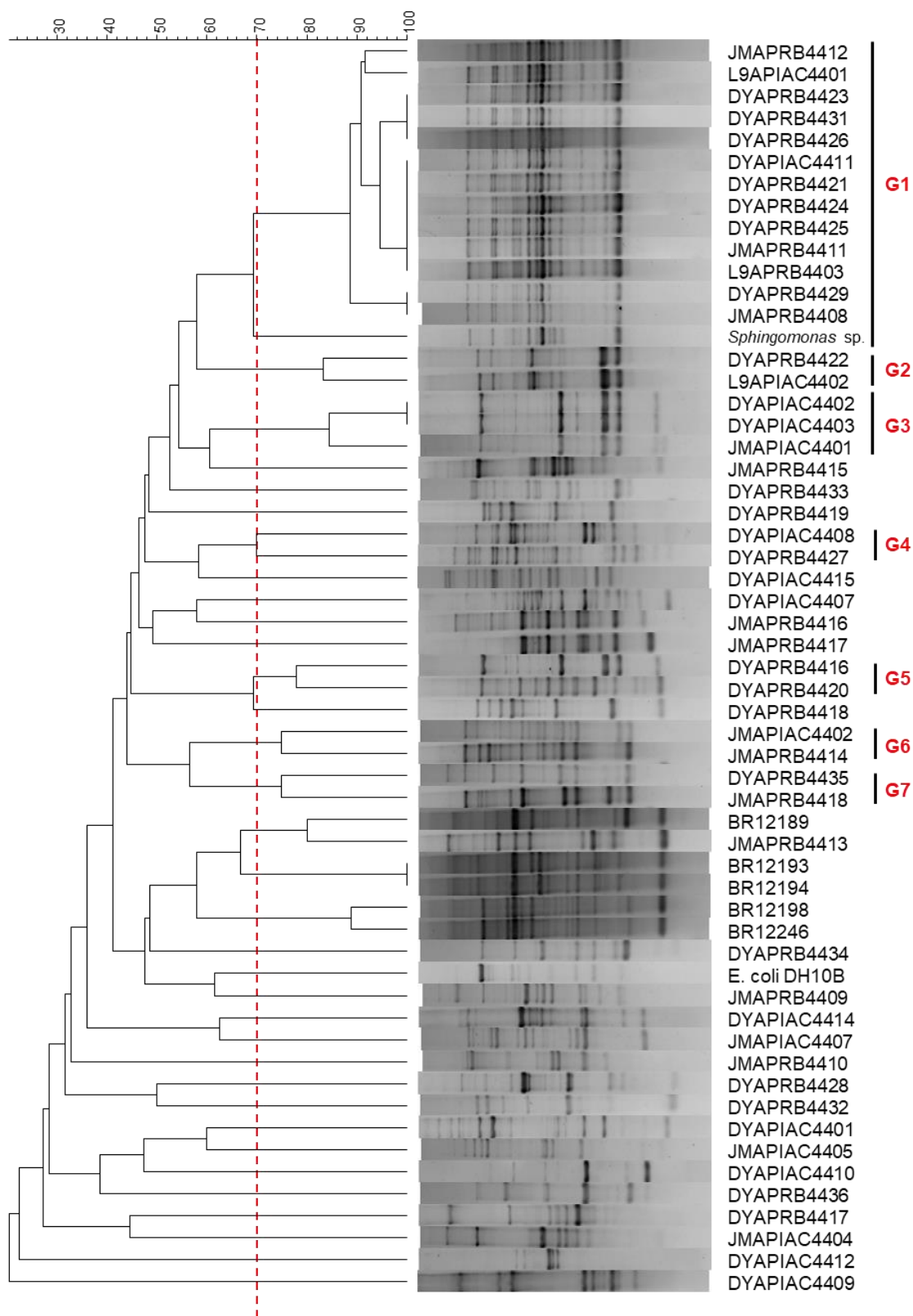


Figura 21: Perfis de BOX-PCR dos isolados *spt*-positivos. Os códigos de isolamento representam primeiro o meio de isolamento (DYGS = DY, JMV = JM, L9 = L9), o tecido / material original (Apoplasto = AP), a variedade de cana-de-açúcar (RB867515 = RB, IACSP5000 = IAC), a data do estoque (44 = 4 de abril) e o número de cada isolado. A linha vermelha tracejada indica similaridade de $\geq 70\%$ entre os perfis.

6.5.3 Caracterização filogenética dos isolados

O sequenciamento dos genes 16S rRNA deu origem a sequências contíguas de aproximadamente 1,370 pb. Os isolados DYAPRB4432 e DYAPRB4434 não apresentaram sequências de boa qualidade com o iniciador reverso amp2, sendo só possível obter sequências de boa qualidade e formação de contigs quando foram utilizados os iniciadores 1492R e 1062R. O isolado representativo dos que deram resultado negativo da PCR-*spt*, quando comparadas com o banco de dados SILVA e o EzBioCloud, revelou a confiabilidade da seleção dos isolados *Sphingomonas*-tipo por meio desta PCR. O mesmo foi classificado como pertencente ao gênero *Burkholderia-Paraburkholderia* (SILVA) e espécie *B. gladioli* (EzBioCloud), com identidade/similaridade, respectivamente, de 100 e 99,50 % (Anexo E).

A determinação do modelo estatístico mais adequado para a análise de filogenia dos isolados indicou como sendo melhor método de distância evolutiva o “Tamura 3-parameter”, modelada com distribuição Gama (forma = 5) e assumindo que uma certa fração é evolutivamente invariável. Sendo assim, foram utilizados estes parâmetros para o cálculo da árvore filogenética utilizando o método Neighbor-Joining, com 1000 repetições (Figura 22).

O sequenciamento dos genes 16S rRNA e classificação taxonômica na árvore filogenética reconstruída também revelou similaridades dos isolados *Sphingomonas*-tipo das duas variedades e meios de cultivo. Para alguns isolados foi possível obter a posição taxonômica de espécie (considerando bootstrap ≥ 97 %), como por exemplo, os isolados DYAPRB4428 e DYAPRB4432 obtiveram bootstrap de 100 % para a estirpe *S. kyungheensis* THG-B283. O isolado DYAPIAC4415 obteve bootstrap de 100 % para *S. polyaromaticivorans* B2-7. DYAPIAC4407, DYAPIAC4409 e JMAPRB4413 foram de 99 % para *S. abaci* C42. DYAPIAC4412 99 % para *S. panacis* DCY99. O grupo 1 (G1) e os isolados JMAPRB4409 e DYAPRB4433 deram similaridade de 99 % para *S. paucimobilis* NBRC 13935. Para alguns isolados não foi possível obter uma única estirpe mais próxima, como foi o caso: do grupo 7 (G7), que está próximo (com bootstrap de 100 %) do clado formado pelas estirpes *S. aquatilis* JSS7 e *S. melonis* DAPP-PG 224; DYAPRB4436 obteve bootstrap de 99 % para as estirpes *S. echinoides* ATCC 14820, *S. oligophenolica* JCM 12082, *S. mali* NBRC 15500 e *S. pruni* NBRC 15498. Os demais grupos/isolados que apresentaram bootstrap menor que 97 %, podem ser candidatos a novas espécies de *Sphingomonas*, como no caso: o clado formado pelos isolados JMAPIAC4415, JMAPIAC4404 e JMAPIAC4405 que obtiveram bootstrap de 96 % com o clado formado por *S. kyungheensis* THG-B283, *S. aquatilis* JSS7 e *S. melonis* DAPP-PG 224. Para o mesmo clado de estirpes já descritas, o grupo G4 e os isolados JMAPRB4416 e JMAPRB4417 tiveram bootstrap < 50 %. O isolado DYAPIAC4410 teve bootstrap de 84 % para *S. spermidinifaciens* 9NM-10. O clado formado por DYAPRB4418, DYAPRB4419 e DYIAC4401 tiveram bootstrap de 68 % para o grupo formado por *S. yunnanensis* YIM 003, *S. endophytica* YIM 65583 e *S. phyllosphaerae* FA2. Os isolados DYAPIAC4415, DYAPRB4417 obtiveram um bootstrap de 56 % ao grupo que continha *S. pituitosa* EDIV, *S. azotifigens* NBRC e *S. trueperi* LMG 2142, enquanto que o DYAPRB4434 com bootstrap de 77 % à *S. trueperi* LMG 2142.

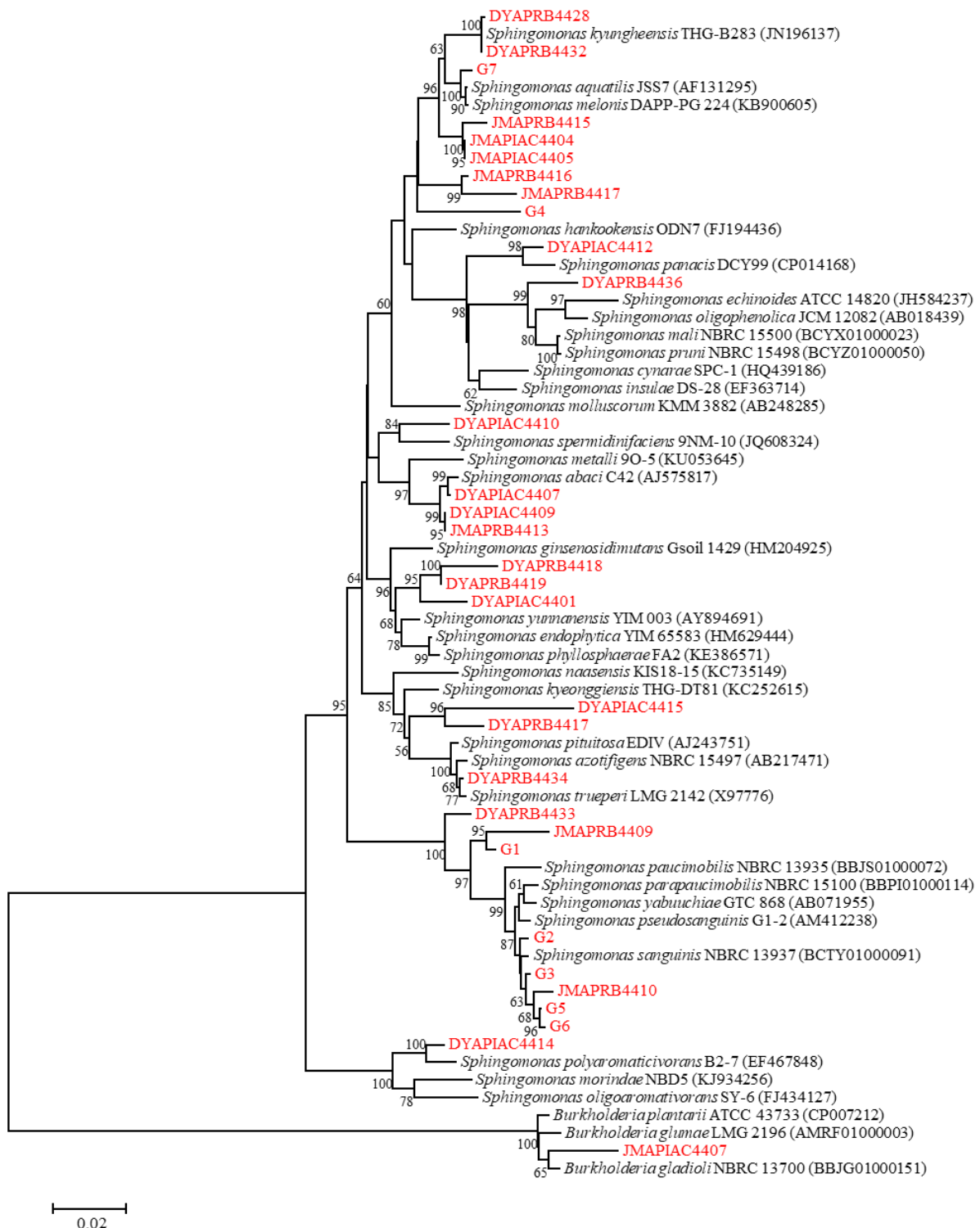


Figura 22: Árvore filogenética construída das sequências dos isolados em comparação às estirpes tipo mais similares de acordo com a classificação taxonômica do EzBioCloud. Foi utilizado o programa MEGA7, método Neighbor-Joining, com distância evolutiva calculada com o método Tamura 3-parameter, modelagem Gama e teste de bootstrap com 1000 repetições. As porcentagens do teste bootstrap estão representadas ao lado dos ramos e foram ocultados valores < 50 %. Em vermelho estão destacados os grupos formados na BOX-PCR e os demais isolados com similaridade menor que 70 % na BOX-PCR.

6.6 DISCUSSÃO

O gênero bacteriano *Sphingomonas* atualmente possui 111 espécies com nomes válidos (PARTE, 2013) de isolados provenientes de diversos habitats (LEYS et al., 2004; VIDEIRA et al., 2009; YIM et al., 2010; ZHOU et al., 2012). Em associação com plantas, este gênero tem demonstrado funções benéficas para o desenvolvimento de seu hospedeiro, como por exemplo a fixação biológica de nitrogênio (MUANGTHONG; YOUPENSUK; RERKASEM, 2015; VIDEIRA et al., 2009; XIE; YOKOTA, 2006) e a produção de fitohormônios (TSAVKELOVA; CHERDYNTSEVA; NETRUSOV, 2005). A sua diversidade em associação com plantas tem sido pouco explorada, principalmente na cana-de-açúcar. Recentes estudos detectaram um grande número de sequências/isolados deste gênero em amostras de cana-de-açúcar (DE SOUZA et al., 2016; DOS-SANTOS et al., 2017; YEOH et al., 2016). Entender o porquê deste fato poderia trazer avanços na compreensão do papel deste gênero bacteriano para a cana-de-açúcar, visto as suas características benéficas reportadas em estudos da interação bactéria-planta.

O líquido do apoplasto tem sido descrito como um provável local de colonização das bactérias endofíticas (DONG et al., 1994). Na cana-de-açúcar o apoplasto possui algumas características favoráveis para o crescimento de bactérias, como por exemplo quantidade de açúcar de ~10 % e temperatura de ~30 °C (SATTELMACHER, 2001). Devido à grande diversidade de gêneros bacterianos presente no apoplasto torna-se desafiador conseguir isolar/avaliar um único gênero. Uma alternativa para conseguir diminuir o número de gêneros não-alvos seria a eliminação destes de acordo com suas características biológicas ou morfológicas, por exemplo utilizando meios semi-seletivos (YIM et al., 2010), antibióticos (VANBROEKHOVEN et al., 2004; YIM et al., 2010) e seleção por morfologia de colônia. No presente trabalho foi utilizada esta metodologia para a seleção dos isolados do gênero *Sphingomonas*, analisando as características morfológicas da colônia e utilizando meios (rico e mínimos) suplementados com antibióticos. Esta metodologia foi primeiramente utilizada em amostras ambientais, onde os autores conseguiram reduzir o número de células não-alvo em seus isolamentos (VANBROEKHOVEN et al., 2004; YIM et al., 2010). Para as amostras do líquido do apoplasto de cana-de-açúcar esta estratégia também foi viável, possibilitando o isolamento e análise da diversidade deste gênero. Os meios de cultivo utilizados neste trabalho são distintos principalmente quanto a seu pH (variando de 5,4 a 7,0) e fontes de carbono. Para o gênero *Sphingomonas* foi descrito como principal fonte de energia a glicose e pH ótimo de crescimento de 7,0 (GLAESER; KÄMPFER, 2014), entretanto os isolados obtidos neste presente estudo demonstraram também a capacidade de assimilar o manitol como fonte de carbono (meio JMV) e tolerantes à pH < 7,0 (5,4 no meio JMV e 6,0 no DYGS), indicando novamente que estes isolados sobreviveriam as condições do apoplasto, que possui pH de ~5,5 (SATTELMACHER, 2001). Os isolados das diferentes variedades e meios demonstraram similaridades entre si na BOX-PCR, de modo que o grupo 1 (G1), formado na BOX-PCR foi representado pelas duas variedades e os diferentes meios, indicando uma possível plasticidade deste gênero em sobreviver em diferentes condições. Outra estratégia utilizada para a seleção dos isolados *Sphingomonas*-tipo foi a triagem por PCR com iniciadores específicos. Para comprovar a especificidade desta técnica, também foi selecionado um isolado que não houve produto de amplificação de PCR (controle negativo). Após o sequenciamento dos genes 16S rRNA, ficou demonstrado que todos aqueles que apresentaram produto de PCR para o gene *spt* foram taxonomicamente relacionados a *Sphingomonas*-tipo enquanto que o representante do negativo foi similar à sequências do gênero de *Burkholderia* (vide resultado de sequenciamento dos genes 16S rRNA), demonstrando assim a confiabilidade da abordagem utilizada para a identificação do gênero *Sphingomonas*.

O sequenciamento dos genes 16S rRNA e a análise de taxonomia indicaram que alguns isolados são similares à espécies já descritas na literatura (com bootstrap de 100) como por exemplo a *S. kyunghensis* THG-B283 e *S. polyaromaticivorans* B2-7. A primeira estirpe foi descrita como sendo um isolado obtido de solo onde foi cultivado ginseng, capaz de converter ginsenosídeo do solo (SON et al., 2013), e a segunda foi isolada de amostras de água contaminadas por óleo e demonstrou ser capaz de degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (LUO et al., 2012). Aqui foi relatado o primeiro caso da presença de isolados dessas duas espécies em plantas de cana-de-açúcar. Aos isolados com bootstrap de 99 foram relacionados às estirpes *S. abaci* C42, *S. paucimobilis* NBRC 13935 e *S. panacis* DCY99; isoladas, respectivamente, de amostras clínica de um hospital veterinário, humano e da rizosfera de ginseng. A espécie *S. paucimobilis* teve sua origem de *Pseudomonas paucimobilis* e foi proposta por YABUUCHI et al. (1990) como sendo a espécie tipo do novo gênero *Sphingomonas*. Estirpes deste gênero também têm sido descritas como sendo capazes de degradar PAHs porém algumas estirpes desta espécie já foram descritas como sendo capazes de promover o crescimento vegetal e a fixação biológica de nitrogênio (YANG et al., 2014). As estirpes *S. aquatilis* JSS7 e *S. melonis* DAPP-PG 224 foram isoladas de plantas de arroz (LEE et al., 2001) e melão (BUONAURO et al., 2002); entretanto a *S. melonis* DAPP-PG 224 foi descrita como sendo patogênica causando a doença da mancha marrom em plantas de melão (BUONAURO et al., 2002). As estirpes *S. mali* NBRC 15500 e *S. pruni* NBRC 15498 foram originadas de uma reclassificação das estirpes isoladas de raízes de plantas de maçã e pêsego (TAKEUCHI et al., 1995). Da mesma forma, a *S. echinoides* ATCC 14820 foi reclassificada de *Pseudomonas echinoides*, que foi isolada de ambiente hospitalar (ROWE et al., 2000). A *S. oligophenolica* JCM 12082 é um isolado de amostras de solo capaz de degradar ácidos fenólicos (OHTA et al., 2004). O grupo formado por estas estirpes foram próximas à alguns isolados (com bootstrap de 99) e o clado formado por estes isolados sugere uma nova espécie próxima a um destes supracitados. As estirpes *S. endophytica* YIM 65583 e *S. phyllosphaerae* FA2 foram isoladas a partir de tecidos vegetais, a primeira teve origem da endosfera da planta Artemisia (HUANG et al., 2012) e a segunda na filosfera de Acácia (RIVAS et al., 2004). Também foram detectados isolados próximos às estirpes capazes de realizar o processo de fixação biológica de nitrogênio, como é o caso de *S. azotifigens* NBRC (isolada de plantas de arroz) (XIE; YOKOTA, 2006) e *S. trueperi* LMG 2142 (reclassificada de *Pseudomonas azotocolligans*) (KÄMPFER et al., 1997). Para os isolados do presente trabalho, não foi possível determinar uma estirpe tipo mais próxima (com exceção do isolado DYAPRB4434 com bootstrap de 77 %) para *S. trueperi* LMG 2142, sugerindo possíveis novas espécies/estirpes diazotróficas.

Além das características funcionais supracitadas, as estirpes 170, IMPCA190 e ZJSH1 de *S. paucimobilis* foram relatadas como sendo promotoras do crescimento vegetal através dos processos de produção de fitohormônios (como o ácido salicílico, ácido indolacético e a zeatina), solubilização de fosfato e fixação biológica de nitrogênio (GONZÁLEZ; VICTORIA; MERINO, 2015; YANG et al., 2014). Espécies não identificadas de *Sphingomonas* têm também demonstrado a capacidade da produção de auxinas em plantas de Orquídea (TSAVKELOVA; CHERDYNTSEVA; NETRUSOV, 2005). Estirpes de *Sphingomonas* também demonstram a capacidade de proteção contra patógeno ao amenizar os sintomas e a proliferação da doença causada por *Pseudomonas syringae* em *Arabidopsis thaliana* (INNEREBNER; KNIEF; VORHOLT, 2011).

Baseado nas características de interesse agrônômico já descritas, os isolados obtidos neste trabalho podem ter o potencial de otimizar o cultivo da cana-de-açúcar e/ou outras plantas. Futuras análises das características funcionais destes isolados, como o processo de fixação biológica de nitrogênio e produção de fitohormônios, poderá trazer informações sobre novos insumos para o cultivo da cana-de-açúcar.

6.7 CONCLUSÕES

- ✓ A diversidade do gênero *Sphingomonas* em amostras do líquido do apoplasto de duas variedades cana-de-açúcar pode ser acessada por meio de isolamento por cultivo utilizando antibióticos e seleção do isolados *Sphingomonas*-tipo por PCR gênero específico.
- ✓ A metodologia empregada permitiu a diminuição de bactérias não-alvo, e os isolados obtidos foram confirmados como pertencentes ao gênero *Sphingomonas* em comparação com estirpes tipo já descritas na literatura.
- ✓ A filiação dos isolados variou desde espécies com características funcionais de biorremediação à promoção do crescimento vegetal. Houve ainda a presença de isolados com potencial de pertencerem a novas espécies, que quando comparadas com estirpes mais próximas, poderiam ter novos insumos úteis no cultivo da cana-de-açúcar.

7 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos representam grande avanço na compreensão da comunidade bacteriana endofítica de cana-de-açúcar, graças ao uso de técnicas independentes de cultivo e o sequenciamento de nova-geração.

O Capítulo I traz resultados utilizando-se de valiosa metodologia de enriquecimento celular bacteriano aplicável ao estudo de comunidades bacterianas endofíticas de cana-de-açúcar que poderia ser adaptada a outras plantas. Os resultados obtidos no sequenciamento utilizando esta metodologia demonstraram uma comunidade rica e diversa, contendo gêneros já relatados em outros trabalhos com cana-de-açúcar e ainda gêneros nunca antes descritos, indicando que o enriquecimento não interferiu significativamente na composição da comunidade.

O Capítulo II pode ser considerado um trabalho inédito, visto que foi o primeiro trabalho (até a presente data) que avaliou a comunidade bacteriana do líquido do apoplasto de cana-de-açúcar utilizando uma metodologia independente de cultivo. O resultado obtido também demonstrou uma comunidade diversa, sendo possível detectar a presença de gêneros já relatados em cana-de-açúcar, gêneros não antes reportados e ainda que não puderam ser classificados com a metodologia de classificação utilizada.

No Capítulo III, as funções das principais OTUs encontradas nas análises dos Capítulos I e II puderam ser previstas ao se utilizar uma análise *in silico* e os dados de sequenciamento dos genes 16S rRNA. Os resultados obtidos revelaram a presença de funções de interesse agrícola e biorremediação, dentre estes destacam-se genes relacionados ao ciclo do nitrogênio (como FBN e desnitrificação) e síntese de Flavonoides (como por exemplo Naringenina).

E como forma de complementar o estudo da microbiota endofítica de cana-de-açúcar, no Capítulo IV buscou-se avaliar a diversidade do gênero bacteriano *Sphingomonas* na cana-de-açúcar, visto que este gênero foi uma das OTUs mais predominantes em ambas as análises taxonômicas deste presente trabalho. Foi possível observar a presença de espécies descritas com características funcionais benéficas para a planta e ainda relacionadas a biorremediação. Os resultados de filogenia dos isolados obtidos neste estudo indica a presença de possíveis novas espécies, na qual serão avaliados futuramente visando sua exploração na aplicação de novos insumos no cultivo da cana-de-açúcar.

Sendo assim, o presente trabalho trouxe informações relevantes e inovações que poderão ser aplicáveis na agricultura através de futuros estudos baseados nas funções descritas, assim trazendo avanços nas técnicas para o cultivo da cana-de-açúcar e até mesmo outras plantas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-LATEIF, K.; BOGUSZ, D.; HOCHER, V. The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria. **Plant Signaling and Behavior**, v. 7, n. 6, p. 636–641, 2012.
- AKINSANYA, M. A.; GOH, J. K.; LIM, S. P.; TING, A. S. Y. Metagenomics study of endophytic bacteria in *Aloe vera* using next-generation technology. **Genomics Data**, v. 6, p. 159–163, 2015.
- ALBINO, J. C.; CRESTE, S.; FIGUEIRA, A. Mapeamento genético da Cana-de-açúcar. **Biociência**, v. 16, n. 1, p. 82–91, 2006.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- ÁLVAREZ-ÁLVAREZ, R.; BOTAS, A.; ALBILLOS, S. M.; RUMBERO, A.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. Molecular genetics of naringenin biosynthesis, a typical plant secondary metabolite produced by *Streptomyces clavuligerus*. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 178, 2015.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation**. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 143–169, 1995.
- ANDERSON, R. E.; REVEILLAUD, J.; REDDINGTON, E.; DELMONT, T. O.; EREN, A. M.; MCDERMOTT, J. M.; SEEWALD, J. S.; HUBER, J. A. Genomic variation in microbial populations inhabiting the marine seafloor at deep-sea hydrothermal vents. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1114, 2017.
- ANDO, S.; GOTO, M.; MEUNCHANG, S.; THONGRA-AR, P.; FUJIWARA, T.; HAYASHI, H.; YONEYAMA, T. Detection of *nifH* Sequences in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and Pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.). **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 51, n. 2, p. 303–308, 2005.
- ARMANHI, J. S. L.; DE SOUZA, R. S. C.; DE ARAUJO, L. M.; OKURA, V. K.; MIECZKOWSKI, P.; IMPERIAL, J.; ARRUDA, P. Multiplex amplicon sequencing for microbe identification in community-based culture collections. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–9, 2016.
- ASIS, C. A.; ADACHI, K.; AKAO, S. N₂ fixation in sugarcane and population of N₂-fixing endophytes in stem apoplast solution. **Philippine Journal of Crop Science**, v. 29, n. 2, p. 45–58, 2004.
- ASIS JÚNIOR, C.; ADACHI, K.; SUGIMOTO, A.; UJIHARA, K.; TERAJIMA, Y.; FUKUHARA, S. Population of Diazotrophic Endophytes in Stem Apoplast Solution of Sugarcane and Related Grass Species in Tanegashima, Japan. **Microbes and Environments**, v. 18, n. 3, p. 133–137, 2003.
- ASSHAUE, K. P.; WEMHEUER, B.; DANIEL, R.; MEINICKE, P. Tax4Fun: Predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 17, p. 2882–2884, 2015.
- AZEVEDO, J. L. Microorganismos endofíticos. **Ecologia microbiana**, p. 117–137, 1998.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W.; PEREIRA, J. O.; DE ARAÚJO, W. L. Endophytic

- microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40–65, 2000.
- BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON, D. M.; MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in Maize. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. SUPPL. 2, p. 325–332, maio 2001.
- BAKKEN, L. R. Separation and purification of bacteria from soil. **Appl Environ Microbiol**, v. 49, n. 6, p. 1482–1487, 1985.
- BALDANI, J. I. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz** Tese de Mestrado - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, , 1984.
- 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**, v. 77, n. 3, 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**, v. 29, n. 5–6, p. 911–922, 1997.
- BALDANI, J. I. J.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86–93, 1 jan. 1986.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, n. 1–2, p. 413–431, 2014.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Meios de cultura específicos para o isolamento de bactérias endofíticas que fixam N₂ atmosférico. **Embrapa Agrobiologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 1996.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F.; DOBEREINER, J. Identification and Ecology of *Herbaspirillum Seropedicae* and the Closely Related *Pseudomonas Rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, n. 1–3, p. 65–73, 1992.
- BANERJEE, A.; GHOSHAL, A. K. Bioremediation of petroleum wastewater by hyperphenol tolerant *Bacillus cereus*: Preliminary studies with laboratory-scale batch process. **Bioengineered**, v. 8, n. 5, p. 446–450, 2017.
- BAO, Z.; OKUBO, T.; KUBOTA, K.; KASAHARA, Y.; TSURUMARU, H.; ANDA, M.; IKEDA, S.; MINAMISAWA, K. Metaproteomic identification of diazotrophic methanotrophs and their localization in root tissues of field-grown rice plants. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 16, p. 5043–5052, 2014.
- BARTHOLOMEW, J. W.; MITTWER, T. The gram stain. **Bacteriological reviews**, v. 16, n. 1, p. 1, 1952.
- BARY, A. **Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten**. [s.l.] W. Engelmann, 1866.
- BARZON, L.; LAVEZZO, E.; MILITELLO, V.; TOPPO, S.; PALÙ, G. Applications of next-generation sequencing technologies to diagnostic virology. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 11, p. 7861–7884, 2011.
- BASTOS, E. **Cana-de-açúcar, o verde mar de energia**. [s.l.] Icone, 1987.
- BECKER, S.; BOGER, P.; OEHLMANN, R.; ERNST, A. PCR bias in ecological analysis: A case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities.

- Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4945–4953, 2000.
- BEDMAR, E.; BUENO, E.; CORREA, D.; TORRES, M.; DELGADO, M.; MESA, S. Ecology of Denitrification in Soils and Plant-Associated Bacteria. **Beneficial Plant-microbial Interactions**, p. 165–182, 2013.
- BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P. B.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J. I.; PASSAGLIA, L. M. P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94–104, 2013.
- BENT, E.; CHANWAY, C. P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 980–988, out. 1998.
- BENTLEY, D. R.; BALASUBRAMANIAN, S.; SMITH, A. J. Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry. **nature**, v. 456, n. 7218, p. 1–10, 2014.
- BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1673–1685, nov. 2005.
- BERG, G.; ZACHOW, C.; MÜLLER, H.; PHILIPPS, J.; TILCHER, R. Next-Generation Bio-Products Sowing the Seeds of Success for Sustainable Agriculture. **Agronomy**, v. 3, n. 4, p. 648–656, 2013.
- BERTANI, G. Studies on Lysogenesis I. The mode of phageliberation by lysogenic *Eschericia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 293–300, 1951.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: Present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 139–149, 2003.
- BOSTRÖM, K. H.; SIMU, K.; HAGSTRÖM, Å.; RIEMANN, L. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 2, n. 1988, p. 365–373, 2004.
- BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F.; SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 30–37, jun. 2014.
- BULGARELLI, D.; ROTT, M.; SCHLAEPPI, K.; VER LOREN VAN THEMAAT, E.; AHMADINEJAD, N.; ASSENZA, F.; RAUF, P.; HUETTEL, B.; REINHARDT, R.; SCHMELZER, E.; PEPLIES, J.; GLOECKNER, F. O.; AMANN, R.; EICKHORST, T.; SCHULZE-LEFERT, P. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 91–5, 2012.
- BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VER LOREN VAN THEMAAT, E.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual review of plant biology**, v. 64, p. 807–38, 2013.
- BUONAURIO, R.; STRAVATO, V. M.; KOSAKO, Y.; FUJIWARA, N.; NAKA, T.; KOBAYASHI, K.; CAPPELLI, C.; YABUUCHI, E. *Sphingomonas melonis* sp. nov., a novel pathogen that causes brown spots on yellow Spanish melon fruits. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2081–2087, 2002.
- BURBANO, C. S.; LIU, Y.; RÖSNER, K. L.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J.; REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Predominant *nifH* transcript phylotypes related to *Rhizobium rosettiformans* in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 3, p. 383–389, jun. 2011.

- CAPLAN, A. I.; GREENAWALT, J. W. Biochemical and ultrastructural properties of osmotically lysed rat-liver mitochondria. **Journal of Cell Biology**, v. 31, n. 3, p. 455–472, 1966.
- CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; PEÑA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.
- CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement_1, p. 4516–4522, 2011.
- CARLIER, A. L.; EBERL, L. The eroded genome of a *Psychotria* leaf symbiont: Hypotheses about lifestyle and interactions with its plant host. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 2757–2769, 2012.
- CARVALHO, C. **Liquid biofuels in Brazil**. Proceedings of the 12th European Conference on Biomass for Energy, Industry and Climate Protection. **Anais...2002**
- CASE, R. J.; BOUCHER, Y.; DAHLLÖF, I.; HOLMSTRÖM, C.; DOOLITTLE, W. F.; KJELLEBERG, S. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 278–288, 1 jan. 2007.
- CATALÁN, A. I.; FERREIRA, F.; GILL, P. R.; BATISTA, S. Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the *lacZlacY* genes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1352–1357, 2007.
- CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and soil**, v. 108, n. 1, p. 23–31, maio 1988.
- CHANG, Y.-J.; STEPHEN, J. R.; RICHTER, A. P.; VENOSA, A. D.; BRÜGGEMANN, J.; MACNAUGHTON, S. J.; KOWALCHUK, G. A.; HAINES, J. R.; KLINE, E.; WHITE, D. C. Phylogenetic analysis of aerobic freshwater and marine enrichment cultures efficient in hydrocarbon degradation: effect of profiling method. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 1, p. 19–31, mar. 2000.
- CHANWAY, C. P. Growth Promoting Soil Bacteria: An Emerging Technology for Reforestation soil microorganisms are integral of growth. **Forest Science**, v. 43, n. 1, p. 99–112, 1997.
- CHAO, A.; BUNGE, J. Estimating the number of species in a stochastic abundance model. **Biometrics**, v. 58, n. 3, p. 531–9, 2002.
- CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; DE OLIVEIRA FIGUEIRA, A. V.; DE SOUSA FILGUEIRAS, T.; GROSSI-DE-SÁ, M. DE F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; DE ANDRADE LANDELL, M. G.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; DE CASTRO REINACH, F.; ROMANO, E.; DA SILVA, W. J.; DE CASTRO SILVA FILHO, M.; CÉSAR ULIAN, E. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 62–89, mar. 2011.
- CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. Diazotrophic endophytes associated with maize. **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process.**, p. 779–791, 2000.

- CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, v. 41, n. 3, p. 252–263, abr. 2001.
- CHEN, M.; XU, P.; ZENG, G.; YANG, C.; HUANG, D.; ZHANG, J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 745–755, 2015.
- CHO, S.; JUNG, K.; KIM, D.; KWON, J.; IJAZ, U. Z.; SHIN, S. G. Bacterial community analysis in upflow multilayer anaerobic reactor treating high- solids organic wastes. **Biotechnology progress**, v. 33, n. 5, p. 1226–1234, 2017.
- CHUNG, E. J.; JO, E. J.; YOON, H. S.; SONG, G. C.; JEON, C. O.; CHUNG, Y. R. *Sphingomonas oryzae* sp. nov. and *Sphingomonas jinjuensis* sp. nov. isolated from rhizosphere soil of rice (*Oryza sativa* L.). **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY**, v. 61, n. 10, p. 2389–2394, 1 out. 2011.
- CLOONEY, A. G.; FOUHY, F.; SLEATOR, R. D.; O'DRISCOLL, A.; STANTON, C.; COTTER, P. D.; CLAESSEON, M. J. Comparing apples and oranges?: Next generation sequencing and its impact on microbiome analysis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0148028, 2016.
- COHEN, A. C.; TRAVAGLIA, C. N.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. N. Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic *Azospirillum* in the alleviation of drought effects in maize. **Botany**, v. 87, n. 5, p. 455–462, 2009.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669–678, 2010.
- CONAB. ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE CANA-DE-AÇÚCAR - Safra 2017/18. v. 4, n. 2, 2017.
- CONN, V.; FRANCO, C. Endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1787–1794, 2004.
- CORREA-ARAGUNDE, N.; PARÍS, R.; FORESI, N.; TERRILE, C.; CASALONGUÉ, C.; LAMATTINA, L. The Auxin-Nitric Oxide Highway: A Right Direction in Determining the Plant Root System. In: **Gasotransmitters in Plants**. [s.l.] Springer, 2016. p. 117–136.
- CULLIGAN, E. P.; SLEATOR, R. D.; MARCHESI, J. R.; HILL, C. Metagenomics and novel gene discovery. **Virulence**, v. 5, n. 3, p. 399–412, 2014.
- DA SILVA, M. F.; DE OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; REIS, V. M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1437–1443, nov. 2009.
- DAI, Z.; GUO, X.; YIN, H.; LIANG, Y.; CONG, J.; LIU, X. Identification of nitrogen-fixing genes and gene clusters from metagenomic library of acid mine drainage. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e87976, jan. 2014.
- DAWE, D. The potential role of biological nitrogen fixation in meeting future demand for rice and fertilizer. **The quest for nitrogen fixation in rice Philippines International Rice Research Institute**, p. 0–1, 2000.
- DE GREGORIS, T. B.; ALDRED, N.; CLARE, A. S.; BURGESS, J. G. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. **Journal of microbiological methods**, v. 86, n. 3, p. 351–356, 2011.
- DEAN, F. B.; NELSON, J. R.; GIESLER, T. L.; LASKEN, R. S.; DEAN, F. B.; NELSON, J.

- R.; GIESLER, T. L.; LASKEN, R. S. Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification from Colonies or Plaques. **Genome research**, v. 11, n. 6, p. 1095–1099, 2001.
- DE NOGUEIRA, E. M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H. P.; VARGAS, C.; DE PÁDUA, V. L. M.; SILVA, F. R. DA; DOS SANTOS, R. V.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 1–4, p. 199–206, 2001.
- DE SANTI FERRARA, F. I.; OLIVEIRA, Z. M.; GONZALES, H. H. S.; FLOH, E. I. S.; BARBOSA, H. R. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant and Soil**, v. 353, n. 1–2, p. 409–417, 2012.
- DE SOUZA, R. S. C.; OKURA, V. K.; ARMANHI, J. S. L.; JORRÍN, B.; LOZANO, N.; SILVA, M. J. DA; GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; ARAÚJO, L. M. DE; FERREIRA, N. V.; BAGHERI, H. C.; IMPERIAL, J.; ARRUDA, P. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Nature Scientific Reports**, n. June, p. 1–15, 2016.
- DEDYSH, S. N.; RICKE, P.; LIESACK, W. *NifH* and *NifD* phylogenies: An evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. **Microbiology**, v. 150, n. 5, p. 1301–1313, 1 maio 2004.
- DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v. 6216, n. 10, p. 5–16, 2009.
- DHARIWAL, A.; CHONG, J.; HABIB, S.; KING, I. L.; AGELLON, L. B.; XIA, J. MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. April, p. 1–9, 2017.
- DI FIORE, S.; DEL GALLO, M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plant. In: ***Azospirillum VI and Related Microorganisms***. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1995. p. 169–187.
- DILLEWIJN, C. VAN. Botany of sugarcane. **Waltham: Chronica Botanica**, p. 371 p, 1952.
- DILLON, S. L.; SHAPTER, F. M.; HENRY, R. J.; CORDEIRO, G.; IZQUIERDO, L.; LEE, L. S. Domestication to Crop Improvement: Genetic Resources for Sorghum and *Saccharum* (*Andropogoneae*). **Annals of Botany**, v. 100, n. 5, p. 975–989, 28 jul. 2007.
- DINSDALE, E. A.; EDWARDS, R. A.; HALL, D.; ANGLY, F.; BREITBART, M.; BRULC, J. M.; FURLAN, M.; DESNUES, C.; HAYNES, M.; LI, L.; MCDANIEL, L.; MORAN, M. A.; NELSON, K. E.; NILSSON, C.; OLSON, R.; PAUL, J.; BRITO, B. R.; RUAN, Y.; SWAN, B. K.; STEVENS, R.; VALENTINE, D. L.; THURBER, R. V.; WEGLEY, L.; WHITE, B. A.; ROHWER, F. Functional metagenomic profiling of nine biomes. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 629–632, 3 abr. 2008.
- DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economical contributions. **Soil Bid. Biochem**, v. 29, n. 36, p. 771–774, 1997.
- DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugarcane. **Plant and Soil**, v. 15, n. 3, p. 211–216, 1961.
- DÖBEREINER, J. Isolation and identification of aerobic nitrogen fixing bacteria from soil and plants. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**, p. 134–141, 1988.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N2

- fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, n. 5, p. 310–313, 1992.
- DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5, p. 771–774, 1997.
- DOBEREINER, J.; BODDEY, R. M. Nitrogen fixation in association with *Gramineae*. **Current perspectives in nitrogen fixation**, p. 305–312, 1981.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J. M.; DART, P. J. Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugar cane and some other tropical grasses. **Plant and Soil**, v. 37, n. 1, p. 191–196, 1972.
- DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 8, p. 539–548, 2010.
- DONG, Z.; CANNY, M. J.; MCCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. R.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R.; CANADA, Z. D.; DE, D.; RODES, R. A Nitrogen-Fixing Endophyte of Sugarcane Stems (A New Role for the Apoplast). **Plant physiology**, v. 105, n. 4, p. 1139–1147, 1994.
- DONG, Z.; MCCULLY, M. E.; CANNY, M. J. Does *Acetobacter diazotrophicus* Live and Move in the Xylem of Sugarcane Stems? Anatomical and Physiological Data. **Annals of Botany**, v. 80, n. 2, p. 147–158, ago. 1997.
- DOS-SANTOS, C. M.; DE SOUZA, D. G.; BALSANELLI, E.; CRUZ, L. M.; DE SOUZA, E. M.; BALDANI, J. I.; SCHWAB, S. A Culture-Independent Approach to Enrich Endophytic Bacterial Cells from Sugarcane Stems for Community Characterization. **Microbial Ecology**, p. 1–13, 3 fev. 2017.
- DOYLE, J.; DOYLE, J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.
- DRESSMAN, D.; YAN, H.; TRAVERSO, G.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 15, p. 8817–8822, 2003.
- DUIJFF, B. J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; LEMANCEAU, P. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. **New Phytologist**, v. 135, n. 2, p. 325–334, 1997.
- EID, J.; FEHR, A.; GRAY, J.; LUONG, K.; LYLE, J.; OTTO, G.; PELUSO, P.; RANK, D.; BAYBAYAN, P.; BETTMAN, B.; BIBILLO, A.; BJORNSON, K.; CHAUDHURI, B.; CHRISTIANS, F.; CICERO, R.; CLARK, S.; DALAL, R.; DEWINTER, A.; DIXON, J.; FOQUET, M.; GAERTNER, A.; HARDENBOL, P.; HEINER, C.; HESTER, K.; HOLDEN, D.; KEARNS, G.; KONG, X.; KUSE, R.; LACROIX, Y.; LIN, S.; LUNDQUIST, P.; MA, C.; MARKS, P.; MAXHAM, M.; MURPHY, D.; PARK, I.; PHAM, T.; PHILLIPS, M.; ROY, J.; SEBRA, R.; SHEN, G.; SORENSON, J.; TOMANEY, A.; TRAVERS, K.; TRULSON, M.; VIECELI, J.; WEGENER, J.; WU, D.; YANG, A.; ZACCARIN, D.; ZHAO, P.; ZHONG, F.; KORLACH, J.; TURNER, S. Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. **Science**, v. 323, n. 5910, p. 133–138, 2009.
- ENGELHARD, M.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. **Environmental Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 131–141, abr. 2000.
- FAHEY, J. W. Endophytic Bacteria for the Delivery of Agrochemicals to Plants. In: [s.l.: s.n.], p. 120–128.
- FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; REIS, V. M.; PEREIRA, W.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HAI, B.; HOFMANN, A.; SCHLOTTER, M.;

- MARTINEZ-ROMERO, E.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 83–99, 27 maio 2012.
- FONSECA, S.; CHINI, A.; HAMBERG, M.; ADIE, B.; PORZEL, A.; KRAMELL, R.; MIERSCH, O.; WASTERNAACK, C.; SOLANO, R. (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. **Nature chemical biology**, v. 5, n. 5, p. 344–350, 2009.
- GAO, J.; SUN, P.; WANG, X.; CHENG, S.; LV, F.; QIU, T.; YUAN, M.; SUN, J. *Sphingomonas zeicaulis* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from maize root. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3755–3760, 1 set. 2016.
- GARRITY, G. M.; BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two, The Proteobacteria, Part C, The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria**. [s.l.: s.n.].
- GIGLIUCCI, F.; BRAMBILLA, G.; TOZZOLI, R.; MICHELACCI, V.; MORABITO, S. Comparative analysis of metagenomes of Italian top soil improvers. **Environmental Research**, v. 155, n. February, p. 108–115, 2017.
- GIHRING, T. M.; GREEN, S. J.; SCHADT, C. W. Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 285–290, 2012.
- GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DOBEREINER, J.; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Acetic Acid Bacterium Associated with Sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, n. 3, p. 361–364, 1 jul. 1989.
- GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. The family *Sphingomonadaceae*. In: **The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria**. [s.l.: s.n.]. v. 9783642301p. 641–707.
- GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 1, p. 1–7, 2005.
- GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012.
- GOMES, A. A.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1105–1113, 2005.
- GOMES, F. P.; LIMA, U. A cana-de-açúcar no mundo. **Cultura e adubação da cana-de-açúcar. Instituto Brasileiro de Potassa, São Paulo**, p. 11–26, 1964.
- GONG, B.-L.; MAO, R.-Q.; XIAO, Y.; JIA, M.-L.; ZHONG, X.-L.; LIU, Y.; XU, P.-L.; LI, G. Improvement of enzyme activity and soluble expression of an alkaline protease isolated from oil-polluted mud flat metagenome by random mutagenesis. **Enzyme and microbial technology**, v. 106, p. 97–105, 2017.
- GONZÁLEZ, A. M.; VICTORIA, D. E.; MERINO, F. C. G. Efficiency of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (Pgpr). **Terra Latinoamericana**, v. 33, n. 4, p. 321–330, 2015.
- GOUGH, C.; GALERA, C.; VASSE, J.; WEBSTER, G.; COCKING, E. C.; DÉNARIÉ, J. Specific flavonoids promote intercellular root colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 10, n. 5, p. 560–570, 1997.
- GRICE, E. A.; KONG, H. H.; CONLAN, S.; DEMING, C. B.; DAVIS, J.; YOUNG, A. C.; BOUFFARD, G. G.; BLAKESLEY, R. W.; MURRAY, P. R.; GREEN, E. D. Topographical

- and temporal diversity of the human skin microbiome. **science**, v. 324, n. 5931, p. 1190–1192, 2009.
- GURGUI, C.; PIEL, J. Metagenomic approaches to identify and isolate bioactive natural products from microbiota of marine sponges. **Methods in molecular biology (Clifton, NJ)**, v. 668, p. 247–64, 2010.
- GUTTMAN, D. S.; MCHARDY, A. C.; SCHULZE-LEFERT, P. Microbial genome-enabled insights into plant–microorganism interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 12, p. 797–813, 2014.
- HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPFER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895–914, 1997.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPFER, J. W. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 7, p. 925–937, 1998.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669–685, 2004.
- HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. R245–R249, 1998.
- HANSON, R. S.; HANSON, T. E. Methanotrophic bacteria. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 2, p. 439–471, 1996.
- HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A. M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 2015.
- HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. VAN. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463–471, out. 2008.
- HASEGAWA, K.; STEWART, C. J.; MANSBACH, J. M.; LINNEMANN, R. W.; AJAMI, N. J.; PETROSINO, J. F.; CAMARGO, C. A. Sphingolipid metabolism potential in fecal microbiome and bronchiolitis in infants: a case–control study. **BMC research notes**, v. 10, n. 1, p. 325, 2017.
- HASLAM, R. P.; DOWNIE, A. L.; RAVETON, M.; GALLARDO, K.; JOB, D.; PALLETT, K. E.; JOHN, P.; PARRY, M. A. J.; COLEMAN, J. O. D. The assessment of enriched apoplast extracts using proteomic approaches. **Annals of Applied Biology**, v. 143, n. 1, p. 81–91, ago. 2003.
- HAVEN, N. (12) United States Patent Lizardi. v. 1, n. 12, 2001.
- HESS, M.; SCZYRBA, A.; EGAN, R.; KIM, T.-W.; CHOKHAWALA, H.; SCHROTH, G.; LUO, S.; CLARK, D. S.; CHEN, F.; ZHANG, T.; MACKIE, R. I.; PENNACCHIO, L. A.; TRINGE, S. G.; VISEL, A.; WOYKE, T.; WANG, Z.; RUBIN, E. M. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. **Science (New York, N.Y.)**, v. 331, n. 6016, p. 463–7, 28 jan. 2011.
- HOLLIDAY, P. **A dictionary of plant pathology**. [s.l.] Cambridge University Press, 1989.
- HUANG, H.-Y.; LI, J.; ZHAO, G.-Z.; ZHU, W.-Y.; YANG, L.-L.; TANG, H.-Y.; XU, L.-H.;

- LI, W.-J. *Sphingomonas endophytica* sp. nov., isolated from *Artemisia annua* L. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. 7, p. 1576–1580, 2012.
- HUANG, X. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. **Genomics**, 1992.
- HUSE, S. M.; YE, Y.; ZHOU, Y.; FODOR, A. A. A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e34242, 2012.
- IKEDA, S.; KANEKO, T.; OKUBO, T.; RALLOS, L. E. E.; EDA, S.; MITSUI, H.; SATO, S.; NAKAMURA, Y.; TABATA, S.; MINAMISAWA, K. Development of a Bacterial Cell Enrichment Method and its Application to the Community Analysis in Soybean Stems. **Microbial Ecology**, v. 58, n. 4, p. 703–714, 2009.
- IKEDA, S.; OKUBO, T.; ANDA, M.; NAKASHITA, H.; YASUDA, M.; SATO, S.; KANEKO, T.; TABATA, S.; EDA, S.; MOMIYAMA, A.; TERASAWA, K.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Community- and genome-based views of plant-associated bacteria: Plant-bacterial interactions in soybean and rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 9, p. 1398–1410, 2010.
- INNEREBNER, G.; KNIEF, C.; VORHOLT, J. A. Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3202–3210, 15 maio 2011.
- JACQUIOD, S.; FRANQUEVILLE, L.; CÉCILLON, S.; VOGEL, T. M.; SIMONET, P. Soil bacterial community shifts after Chitin enrichment: An integrative metagenomic approach. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79699, jan. 2013.
- JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2–3, p. 197–209, 2000.
- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue *Sorghum bicolor* L. Moench. **J. Exp. Bot.**, v. 48, n. 3, p. 785–798, 1997.
- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; DE OLIVEIRA, A. L. M.; DOS REIS, F. B.; DA SILVA, L. G.; REIS, V. M. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 357, p. 747–760, 15 abr. 2001.
- JIAO, J. Y.; WANG, H. X.; ZENG, Y.; SHEN, Y. M. Enrichment for microbes living in association with plant tissues. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 4, p. 830–837, 2006.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–9, 2006.
- JOVEL, J.; PATTERSON, J.; WANG, W.; HOTTE, N.; O'KEEFE, S.; MITCHEL, T.; PERRY, T.; KAO, D.; MASON, A. L.; MADSEN, K. L.; WONG, G. K.-S. Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 459, 20 abr. 2016.
- KAISER, K.; WEMHEUER, B.; KOROLKOW, V.; WEMHEUER, F.; NACKE, H.; SCHÖNING, I.; SCHRUMPF, M.; DANIEL, R. Driving forces of soil bacterial community structure, diversity, and function in temperate grasslands and forests. **Scientific reports**, v. 6, 2016.
- KALIA, V. C.; CHAUHAN, A.; BHATTACHARYYA, G. Genomic databases yield novel bioplastic producers. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 8, p. 845–846, 2003.

- KALIA, V. C. V. C.; RANI, A.; LAL, S.; CHEEMA, S.; RAUT, C. P. P. Combing databases reveals potential antibiotic producers. **Expert opinion on drug discovery**, v. 2, n. 2, p. 211–224, 2007.
- KÄMPFER, P.; DENNER, E. B. M.; MEYER, S.; MOORE, E. R. B.; BUSSE, H.-J. Classification of “*Pseudomonas azotocolligans*” Anderson 1955, 132, in the Genus *Sphingomonas* as *Sphingomonas trueperi* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 577–583, 1997.
- KANEHISA, M.; SATO, Y.; KAWASHIMA, M.; FURUMICHI, M.; TANABE, M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. **Nucleic acids research**, v. 44, n. D1, p. D457–D462, 2016.
- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S. S.; CAMPO, R. J. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 32, n. 2, p. 210–220, jun. 2006.
- KEMBEL, S. W.; WU, M.; EISEN, J. A.; GREEN, J. L. Incorporating 16S gene copy number information improves estimates of microbial diversity and abundance. **PLoS computational biology**, v. 8, n. 10, p. e1002743, 2012.
- KIM, Y. J.; CHOI, G. S.; KIM, S. B.; YOON, G. S.; KIM, Y. S.; RYU, Y. W. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. **Protein Expression and Purification**, v. 45, n. 2, p. 315–323, 2006.
- KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular Microbial Ecology Approaches Applied To Diazotrophs Associated With Non- Legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5, p. 853–862, 1997.
- KNIEF, C.; DELMOTTE, N.; CHAFFRON, S.; STARK, M.; INNEREBNER, G.; WASSMANN, R.; VON MERING, C.; VORHOLT, J. A. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. **The ISME Journal**, v. 6, n. 7, p. 1378–1390, 2012.
- KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 7, p. 2567–2572, 2005.
- KORDBACHEH, H.; EFTEKHAR, F.; EBRAHIMI, S. N. Anti-*quorum sensing* activity of *Pistacia atlantica* against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and identification of its bioactive compounds. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 390–398, 2017.
- KRISHNAMURTHY, K.; GNANAMANICKAM, S. S. Biological control of sheath blight of rice: Induction of systemic resistance in rice by plant-associated *Pseudomonas* spp. **Current Science (Bangalore)**, v. 72, n. 5, p. 331–334, 1997.
- KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244–1251, 2004.
- KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, v. 273, n. 1–2, p. 91–99, jun. 2005.
- KUMAR, S.; NEI, M.; DUDLEY, J.; TAMURA, K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics**, v. 9, n. 4, p. 299–306, 27 mar. 2008.

- KUNIN, V.; COPELAND, A.; LAPIDUS, A.; MAVROMATIS, K.; HUGENHOLTZ, P. A bioinformatician's guide to metagenomics. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 72, n. 4, p. 557–78, Table of Contents, dez. 2008.
- LACKNER, G.; MOEBIUS, N.; PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; BOLAND, S.; HERTWECK, C. Evolution of an endofungal lifestyle: Deductions from the *Burkholderia rhizoxinica* genome. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 210, 2011.
- LACKNER, G.; PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; HERTWECK, C. Endofungal bacteria as producers of mycotoxins. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 570–576, 2009.
- LACOMBE, S.; ROUGON-CARDOSO, A.; SHERWOOD, E.; PEETERS, N.; DAHLBECK, D.; VAN ESSE, H. P.; SMOKER, M.; RALLAPALLI, G.; THOMMA, B. P. H. J.; STASKAWICZ, B.; JONES, J. D. G.; ZIPFEL, C. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 365–369, 2010.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA Sequencing. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, p. 115–175, 1991.
- LANGILLE, M. G. I.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J. G.; MCDONALD, D.; KNIGHTS, D.; REYES, J. A.; CLEMENTE, J. C.; BURKEPILE, D. E.; VEGA THURBER, R. L.; KNIGHT, R.; BEIKO, R. G.; HUTTENHOWER, C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 814–21, 2013.
- LASKEN, R. S. Single-cell genomic sequencing using Multiple Displacement Amplification. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 510–516, 2007.
- LEE, J.-S.; SHIN, Y. K.; YOON, J.-H.; TAKEUCHI, M.; PYUN, Y.-R.; PARK, Y.-H. *Sphingomonas aquatilis* sp. nov., *Sphingomonas koreensis* sp. nov., and *Sphingomonas taejonensis* sp. nov., yellow-pigmented bacteria isolated from natural mineral water. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1491–1498, 2001.
- LEE, S.; FLORES-ENCARNACIÓN, M.; CONTRERAS-ZENTELLA, M.; GARCIA-FLORES, L.; ESCAMILLA, J. E.; KENNEDY, C. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 16, p. 5384–91, ago. 2004.
- LEE, S.; ISHIGA, Y.; CLERMONT, K.; MYSORE, K. S. Coronatine inhibits stomatal closure and delays hypersensitive response cell death induced by nonhost bacterial pathogens. **PeerJ**, v. 1, p. e34, 2013.
- LEMOIGNE, M. Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acide β -oxybutyrique. **Bull Soc Chim Biol**, v. 8, p. 770–782, 1926.
- LEYS, N. M. E. J.; RYNGAERT, A.; BASTIAENS, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E. M.; SPRINGAEL, D. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 4, p. 1944–55, abr. 2004.
- LI, J.; ZHAO, G. Z.; VARMA, A.; QIN, S.; XIONG, Z.; HUANG, H. Y.; ZHU, W. Y.; ZHAO, L. X.; XU, L. H.; ZHANG, S.; LI, W. J. An Endophytic *Pseudonocardia* Species Induces the Production of Artemisinin in *Artemisia annua*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51410, 2012.
- LI, Y.; HUANG, F.; LU, Y.; SHI, Y.; ZHANG, M.; FAN, J.; WANG, W. Mechanism of plant-microbe interaction and its utilization in disease-resistance breeding for modern agriculture. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 83, p. 51–58, 2013.

- LIGI, T.; OOPKAUP, K.; TRUU, M.; PREEM, J.-K.; NÕLVAK, H.; MITSCH, W. J.; MANDER, Ü.; TRUU, J. Characterization of bacterial communities in soil and sediment of a created riverine wetland complex using high-throughput 16S rRNA amplicon sequencing. **Ecological Engineering**, v. 72, p. 56–66, 2014.
- LILES, M. R.; WILLIAMSON, L. L.; RODBUMRER, J.; TORSVIK, V.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Recovery, purification and cloning of high molecular weight DNA from soil microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n. 10, p. AEM.02630-07, 2008.
- LIRAS, P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, n. 1–2, p. 109–124, 1999.
- LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HU, N.; HE, Y.; PONG, R.; LIN, D.; LU, L.; LAW, M.; LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HU, N.; HE, Y.; PONG, R.; LIN, D.; LU, L.; LAW, M. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–11, 2012.
- LOACES, I.; AMARELLE, V.; MUÑOZ-GUTIERREZ, I.; FABIANO, E.; MARTINEZ, A.; NOYA, F. Improved ethanol production from biomass by a rumen metagenomic DNA fragment expressed in *Escherichia coli* MS04 during fermentation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 21, p. 9049–9060, 2015.
- LOIRET, F. G.; ORTEGA, E.; KLEINER, D.; ORTEGA-RODÉS, P.; RODÉS, R.; DONG, Z. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 504–511, 2004.
- LÓPEZ, M. A.; BANNENBERG, G.; CASTRESANA, C. Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 4, p. 420–427, 2008.
- LUDWIG, J. A.; REYNOLDS, J. F. **Statistical ecology: a primer in methods and computing**. [s.l.] John Wiley & Sons, 1988. v. 1
- LUNDBERG, D. S.; LEBEIS, S. L.; PAREDES, S. H.; YOURSTONE, S.; GEHRING, J.; MALFATTI, S.; TREMBLAY, J.; ENGELBREKTSON, A.; KUNIN, V.; DEL RIO, T. G.; EDGAR, R. C.; EICKHORST, T.; LEY, R. E.; HUGENHOLTZ, P.; TRINGE, S. G.; DANGL, J. L. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 86–90, 2013.
- LUO, Y.-R.; TIAN, Y.; HUANG, X.; KWON, K.; YANG, S.-H.; SEO, H.-S.; KIM, S.-J.; ZHENG, T.-L. *Sphingomonas polyaromaticivorans* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from an oil port water sample. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1223–1227, 2012.
- LUVIZOTTO, D. M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F. D.; 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 and Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1829–1836, 3 out. 2010.
- LV, X.; YU, J.; FU, Y.; MA, B.; QU, F.; NING, K.; WU, H. A meta-analysis of the bacterial and archaeal diversity observed in wetland soils. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- MAGNANI, G. D. E. S. Diversidade de bactérias endofíticas em cana- de-açúcar. 2005.
- MAGNANI, G. S.; CRUZ, L. M.; WEBER, H.; BESPALHOK, J. C.; DAROS, E.; BAURA, V.; YATES, M. G.; MONTEIRO, R. A.; FAORO, H.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Culture-independent analysis of endophytic bacterial communities associated with Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4549–4558, jan. 2013.
- MAGNANI, G. S.; DIDONET, C. M. C. M.; CRUZ, L. M. L. M.; PICHETH, C. F. C.; PEDROSA, F. O. F. O.; SOUZA, E. M. E. M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian

- sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 250–258, 2010.
- MAHMUD, T. The C 7 N aminocyclitol family of natural products. **Natural product reports**, v. 20, n. 1, p. 137–166, 2003.
- MARDIS, E. R. Next-generation DNA sequencing methods. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 9, p. 387–402, 2008.
- MAREQUE, C.; TAULÉ, C.; BERACOCHEA, M.; BATTISTONI, F. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 1057–1067, 2014.
- MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M. S.; CHEN, Y.-J.; CHEN, Z.; DEWELL, S. B.; DU, L.; FIERRO, J. M.; GOMES, X. V.; GODWIN, B. C.; HE, W.; HELGESEN, S.; HO, C. H.; HO, C. H.; IRZYK, G. P.; JANDO, S. C.; ALENQUER, M. L. I.; JARVIE, T. P.; JIRAGE, K. B.; KIM, J.-B.; KNIGHT, J. R.; LANZA, J. R.; LEAMON, J. H.; LEFKOWITZ, S. M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, K. L.; LU, H.; MAKHIJANI, V. B.; MCDADE, K. E.; MCKENNA, M. P.; MYERS, E. W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J. R.; PLANT, R.; PUC, B. P.; RONAN, M. T.; ROTH, G. T.; SARKIS, G. J.; SIMONS, J. F.; SIMPSON, J. W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K. R.; TOMASZ, A.; VOGT, K. A.; VOLKMER, G. A.; WANG, S. H.; WANG, Y.; WEINER, M. P.; YU, P.; BEGLEY, R. F.; ROTHBERG, J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376–80, 2005.
- MAROPOLA, M. K. A.; RAMOND, J. B.; TRINDADE, M. Impact of metagenomic DNA extraction procedures on the identifiable endophytic bacterial diversity in *Sorghum bicolor* (L. Moench). **Journal of Microbiological Methods**, v. 112, p. 104–117, 2015.
- MARTIN, J. P. The anatomy of the sugar cane plant. **Sugarcane Diseases of the World. Elsevier Amsterdam**, v. 1, p. 3–52, 1961.
- MARTINY, A. C.; TRESEDER, K.; PUSCH, G. Phylogenetic conservatism of functional traits in microorganisms. **The ISME journal**, v. 7, n. 4, p. 830–838, 2013.
- MCDONALD, D.; CLEMENTE, J. C.; KUCZYNSKI, J.; RIDEOUT, J. R.; STOMBAUGH, J.; WENDEL, D.; WILKE, A.; HUSE, S.; HUFNAGLE, J.; MEYER, F. The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. **GigaScience**, v. 1, n. 1, p. 7, 2012.
- MCWILLIAM, H.; LI, W.; ULUDAG, M.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y. M.; BUSO, N.; COWLEY, A. P.; LOPEZ, R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Web Server issue, p. W597-600, 1 jul. 2013.
- MEHNAZ, S.; BAIG, D. N.; LAZAROVITS, G. Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 1614–1623, dez. 2010.
- MEINICKE, P. UProC: tools for ultra-fast protein domain classification. **Bioinformatics**, v. 31, n. 9, p. 1382–1388, 2014.
- MELCHER, U.; VERMA, R.; SCHNEIDER, W. L. Metagenomic search strategies for interactions among plants and multiple microbes. **Frontiers in plant science**, v. 5, n. June, p. 268, 2014.
- MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; HE, S. Y. Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 969–980, 2006.
- 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**, v. 73, n. 22, p. 7259–7267, nov. 2007.

METZKER, M. L. Sequencing technologies—the next generation. **Nature reviews genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, 2010.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E.; KUBAL, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R.; VENTER, J.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J.; HALPERN, A.; RUSCH, D.; EISEN, J.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K.; NELSON, W.; TYSON, G.; CHAPMAN, J.; HUGENHOLTZ, P.; ALLEN, E.; RAM, R.; RICHARDSON, P.; SOLOVYEV, V.; RUBIN, E.; ROKHSAR, D.; BANFIELD, J.; HUSE, S.; HUBER, J.; MORRISON, H.; SOGIN, M.; WELCH, D.; OVERBEEK, R.; BEGLEY, T.; BUTLER, R.; CHOUDHURI, J.; DIAZ, N.; CHUANG, H.-Y.; COHOON, M.; CRÉCY-LAGARD, V. DE; DISZ, T.; EDWARDS, R.; MCNEIL, L.; REICH, C.; AZIZ, R.; BARTELS, D.; COHOON, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R.; GERDES, S.; HWANG, K.; KUBAL, M.; MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W.; ATTIYA, S.; BADER, J.; BEMBEN, L.; BERKA, J.; BRAVERMAN, M.; CHEN, Y.; CHEN, Z.; AZIZ, R.; BARTELS, D.; BEST, A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E.; KUBAL, M.; FIELD, D.; MORRISON, N.; SELENGUT, J.; STERK, P.; ALTSCHUL, SF.; MADDEN, T.; SCHAFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.; JARVIE, T.; DESANTIS, T.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVIL, D.; HU, P.; ANDERSEN, G.; COLE, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.; WANG, Q.; WUYTS, J.; PEER, YV. DE; WINKELMANS, T.; WACHTER, R. DE; LEPLAE, R.; HEBRANT, A.; WODAK, S.; TOUSSAINT, A.; MEYER, F.; OVERBEEK, R.; RODRIQUEZ, A.; TRINGE, S.; MERING, C. VON; KOBAYASHI, A.; SALAMOV, A.; CHEN, K.; CHANG, H.; PODAR, M.; SHORT, J.; MATHUR, E.; DETTER, J.; RODRIGUEZ-BRITO, B.; ROHWER, F.; EDWARDS, R.; MCHARDY, A.; MARTIN, H.; TSIRIGOS, A.; HUGENHOLTZ, P.; RIGOUTSOS, I.; EDWARDS, R.; RODRIGUEZ-BRITO, B.; WEGLEY, L.; HAYNES, M.; BREITBART, M.; PETERSON, D.; SAAR, M.; ALEXANDER, S.; ALEXANDER, E.; ROHWER, F.; FIERER, N.; BREITBART, M.; NULTON, J.; SALAMON, P.; LOZUPONE, C.; JONES, R.; ROBESON, M.; EDWARDS, R.; FELTS, B.; RAYHAWK, S.; WEGLEY, L.; EDWARDS, R.; RODRIGUEZ-BRITO, B.; LIU, H.; ROHWER, F.; MOU, X.; EDWARDS, R.; HODSON, R.; MORAN, M.; DINSDALE, E.; EDWARDS, R.; HALL, D.; ANGLY, F.; BREITBART, M.; BRULC, J.; FURLAN, M.; DESNUES, C.; HAYNES, M.; LI, L.; KRAUSE, L.; DIAZ, N.; BARTELS, D.; EDWARDS, R.; PUHLER, A.; ROHWER, F.; MEYER, F.; STOYE, J.; LIANG, F.; HOLT, I.; PERTEA, G.; KARAMYCHEVA, S.; SALZBERG, S.; QUACKENBUSH, J.; ROHWER, F. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 386, jan. 2008.

MILLER; MILLER; GARTON-KENNY; REDGRAVE; SEARS; CONDRON; TEPLow; STROBEL. Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 6, p. 937–944, jun. 1998.

MITRA, R. D.; SHENDURE, J.; OLEJNIK, J.; EDYTA, K. O.; CHURCH, G. M. Fluorescent in situ sequencing on polymerase colonies.[erratum appears in Anal Biochem. 2004 May 15;328(2):245]. **Analytical Biochemistry**, v. 320, n. 1, p. 55–65, 2003.

MIYAMOTO, T.; KAWAHARA, M.; MINAMISAWA, K. Novel endophytic nitrogen-fixing clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6580–6, nov. 2004.

- MONGELARD, J. C. effect of different water regimes on the growth of two sugarcane varieties. **Int Soc Sugar Cane Technol Proc Congr**, 1969.
- MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.; BADOSA, E.; FRANCÉS, J.; ALEMANY, J.; LLORENTE, I.; MORAGREGA, C. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. **International Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 169–175, 2002.
- MOORE, B. S.; HERTWECK, C.; HOPKE, J. N.; IZUMIKAWA, M.; KALAITZIS, J. A.; NILSEN, G.; O'HARE, T.; PIEL, J.; SHIPLEY, P. R.; XIANG, L. Plant-like biosynthetic pathways in bacteria: from benzoic acid to chalcone 1. **Journal of natural products**, v. 65, n. 12, p. 1956–1962, 2002.
- MOORE, P. H. Anatomy and morphology. **Sugarcane improvement through breeding**, p. 85–142, 1987.
- MOORE, P. H.; NUSS, K. J. Flowering and flower synchronization. **Developments in Crop Science**, v. 11, n. C, p. 273–311, 1987.
- MUANGTHONG, A.; YOUPENSUK, S.; RERKASEM, B. Isolation and characterisation of endophytic nitrogen fixing bacteria in sugarcane. **Tropical Life Sciences Research**, v. 26, n. 1, p. 41–51, abr. 2015.
- NAMBIAR, P. T.; MA, S. W.; IYER, V. N. Limiting an Insect Infestation of Nitrogen-Fixing Root Nodules of the Pigeon Pea (*Cajanus cajan*) by Engineering the Expression of an Entomocidal Gene in Its Root Nodules. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 9, p. 2866–9, set. 1990.
- NASOPOULOU, C.; POHJANEN, J.; KOSKIMÄKI, J. J.; ZABETAKIS, I.; PIRTILÄ, A. M. Localization of strawberry (*Fragaria x ananassa*) and *Methylobacterium extorquens* genes of strawberry flavor biosynthesis in strawberry tissue by in situ hybridization. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 13, p. 1099–1105, 2014.
- NETO, P. A. D. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos Endofíticos. **Biociência**, v. 29, p. 62–77, 2002.
- NIEDRINGHAUS, T. P.; MILANOVA, D.; KERBY, M. B.; SNYDER, M. P.; BARRON, A. E. Landscape of next-generation sequencing technologies. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 12, p. 4327–4341, 2011.
- NIKOLIC, B.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Metagenomic analysis of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene (*acdS*) operon of an uncultured bacterial endophyte colonizing *Solanum tuberosum* L. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 9, p. 665–676, 2011.
- NUNEZ, W. J.; COLMER, A. R. Differentiation of *Aerobacter-Klebsiella* isolated from sugarcane. **Applied microbiology**, v. 16, n. 12, p. 1875–8, dez. 1968.
- OHTA, H.; HATTORI, R.; USHIBA, Y.; MITSUI, H.; ITO, M.; WATANABE, H.; TONOSAKI, A.; HATTORI, T. *Sphingomonas oligophenolica* sp. nov., a halo- and organo-sensitive oligotrophic bacterium from paddy soil that degrades phenolic acids at low concentrations. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2185–2190, 2004.
- OKUBO, T.; IKEDA, S.; SASAKI, K.; OHSHIMA, K.; HATTORI, M.; SATO, T.; MINAMISAWA, K. Phylogeny and Functions of Bacterial Communities Associated with Field-Grown Rice Shoots. **Microbes and Environments**, v. 29, n. 3, p. 329–332, 2014.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of *Gramineae*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 3, p. 197–200, fev. 1996.

- OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 106–113, 2009.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, n. 2, p. 205–215, 2002.
- OULAS, A.; PAVLOUDI, C.; POLYMENAKOU, P.; PAVLOPOULOS, G. A.; PAPANIKOLAOU, N.; KOTOULAS, G.; ARVANITIDIS, C.; ILIOPOULOS, I. Metagenomics: Tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 9, p. 75–88, 2015.
- OUYANG, Y.; DAI, S.; XIE, L.; KUMAR, M. S. R.; SUN, W.; SUN, H.; TANG, D.; LI, X. Isolation of high molecular weight DNA from marine sponge bacteria for BAC library construction. **Marine Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 318–325, 2010.
- PAGNUSSAT, G. C.; LANTERI, M. L.; LAMATTINA, L. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. **Plant Physiology**, v. 132, n. 3, p. 1241–1248, 2003.
- PANDEY, V. C.; SINGH, J. S.; SINGH, D. P.; SINGH, R. P. Methanotrophs: promising bacteria for environmental remediation. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 241–250, 2014.
- PARTE, A. C. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D613–D616, 2013.
- PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; HERTWECK, C. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. **Nature**, v. 437, n. 7060, p. 884–8, 2005.
- PATIL, N. Blocks of Limited Haplotype Diversity Revealed by High-Resolution Scanning of Human Chromosome 21. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1719–1723, 2001.
- PAUNGFUO-LONHIENNE, C.; LONHIENNE, T. G. A.; YEOH, Y. K.; WEBB, R. I.; LAKSHMANAN, P.; CHAN, C. X.; LIM, P. E.; RAGAN, M. A.; SCHMIDT, S.; HUGENHOLTZ, P. A new species of *Burkholderia* isolated from sugarcane roots promotes plant growth. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 142–154, 2014.
- PECHANOVA, O.; HSU, C.-Y.; ADAMS, J. P.; PECHAN, T.; VANDERVELDE, L.; DRNEVICH, J.; JAWDY, S.; ADELI, A.; SUTTLE, J. C.; LAWRENCE, A. M.; TSCHAPLINSKI, T. J.; SÉGUIN, A.; YUCEER, C. Apoplast proteome reveals that extracellular matrix contributes to multistress response in poplar. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 674, 2010.
- PEREIRA, W.; REIS, V. M. Produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Instituto de Agronomia**, v. MS, p. 70, 2011.
- PII, Y.; MIMMO, T.; TOMASI, N.; TERZANO, R.; CESCO, S.; CRECCHIO, C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 4, p. 403–415, 2015.
- PRUESSE, E.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. **Bioinformatics**, v. 28, n. 14, p. 1823–1829, 15 jul. 2012.
- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P. The SILVA ribosomal RNA gene data base project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Res**, v. 41, p. gks1219, 2013.
- RAAIJMAKERS, J. M.; VLAMI, M.; DE SOUZA, J. T. Antibiotic production by bacterial

- biocontrol agents. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 81, n. 1–4, p. 537–547, 2002.
- REDDY, P. M.; RENDÓN-ANAYA, M.; SOTO DEL RÍO, M. D.; KHANDUAL, S. Flavonoids as signaling molecules and regulators of root nodule development. **Dyn Soil Dyn Plant**, v. 1, p. 83–94, 2007.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of Gramineous Plants with *Azoarcus* spp. and Other Diazotrophs: Identification, Localization, and Perspectives to Study their Function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 1, p. 29–54, 1 jan. 1998.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: Bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 435–443, 2011.
- REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Biological Dinitrogen Fixation in *Gramineae* and Palm Trees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n. 3, p. 227–247, 1 maio 2000.
- REIS, V. M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2155–2162, 2004.
- REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 401–5, 1994.
- REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; PEREIRA, W.; SILVA, M. F.; HIPÓLITO, G.; OLIVEIRA, R. P.; MORAES, R. F.; LEITE, J. M.; SCHULTZ, N.; BAPTISTA, R. B. Eficiência agronômica do inoculante de cana-de-açúcar aplicado em três ensaios conduzidos no Estado do Rio de Janeiro durante o primeiro ano de cultivo. **Boletim de Pesquisa - CNPAB**, p. 1–22, 2009.
- REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2261–8, maio 2002.
- REUTER, J. A.; SPACEK, D. V.; SNYDER, M. P. High-Throughput Sequencing Technologies. **Molecular Cell**, v. 58, n. 4, p. 586–597, 2015.
- REYES-DUARTE, D.; FERRER, M.; GARCÍA-ARELLANO, H. Functional-based screening methods for lipases, esterases, and phospholipases in metagenomic libraries. **Methods in Molecular Biology**, v. 861, p. 101–113, 2012.
- RINCON-FLOREZ, V. A.; CARVALHAIS, L. C.; SCHENK, P. M. Culture-independent molecular tools for soil and rhizosphere microbiology. **Diversity**, v. 5, n. 3, p. 581–612, 2 ago. 2013.
- RIVAS, R.; ABRIL, A.; TRUJILLO, M. E.; VELÁZQUEZ, E. *Sphingomonas phyllosphaerae* sp. nov., from the phyllosphere of *Acacia caven* in Argentina. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2147–2150, 2004.
- ROBERTS, R. J.; CARNEIRO, M. O.; SCHATZ, M. C. The advantages of SMRT sequencing. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, p. 405, 2013.
- ROBINSON, R. J.; FRAAIJE, B. A.; CLARK, I. M.; JACKSON, R. W.; HIRSCH, P. R.; MAUCLINE, T. H. Endophytic bacterial community composition in wheat (*Triticum aestivum*) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability. **Plant and Soil**, v. 405, n. 1–2, p. 381–396, 2016.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o

- isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopatológica**, v. 32 (12), n. 1–2, p. 1–2, 1986.
- ROESCH, L. F. W.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant and Soil**, v. 302, n. 1–2, p. 91–104, 2008.
- RONAGHI, M.; KARAMOHAMED, S.; PETTERSSON, B.; UHLÉN, M.; NYRÉN, P. L. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. **Analytical Biochemistry**, v. 242, n. 1, p. 84–89, 1996.
- ROSCONI, F.; DAVYT, D.; MARTÍNEZ, V.; MARTÍNEZ, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; ZANE, H.; BUTLER, A.; DE SOUZA, E. M.; FABIANO, E. Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 916–927, 2013.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 19, n. 8, p. 827–837, ago. 2006.
- ROSS, M. G.; RUSS, C.; COSTELLO, M.; HOLLINGER, A.; LENNON, N. J.; HEGARTY, R.; NUSBAUM, C.; JAFFE, D. B. Characterizing and measuring bias in sequence data. **Genome biology**, v. 14, n. 5, p. R51, 2013.
- ROUWS, L. F. M.; LEITE, J.; DE MATOS, G. F.; ZILLI, J. E.; COELHO, M. R. R.; XAVIER, G. R.; FISCHER, D.; HARTMANN, A.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Endophytic *Bradyrhizobium* spp. isolates from sugarcane obtained through different culture strategies. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 4, p. 354–363, 2014.
- ROWE, N. J.; TUNSTALL, J.; GALBRAITH, L.; WILKINSON, S. G. Lipid composition and taxonomy of [*Pseudomonas*] *echinoides*: transfer to the genus *Sphingomonas*. **Microbiology**, v. 146, n. 11, p. 3007–3012, 2000.
- RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: Recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1–9, jan. 2008.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, jul. 1987.
- SAJJAD MIRZA, M.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, v. 237, n. 1, p. 47–54, 2001.
- SALAS, M.; MOSKOWITZ, P. E. United States Patent [191. n. 1986, p. 103–110, 1993.
- SALONEN, A.; NIKKILÄ, J.; JALANKA-TUOVINEN, J.; IMMONEN, O.; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M.; KEKKONEN, R. A.; PALVA, A.; DE VOS, W. M. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: Effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, n. 2, p. 127–134, 2010.
- SATTELMACHER, B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. **New Phytologist**, v. 149, n. 2, p. 167–192, 2001.
- SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for

describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, dez. 2009.

SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; HYTEN, D. L.; SONG, Q.; THELEN, J. J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G. D.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYYA, M. K.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X.-C.; SHINOZAKI, K.; NGUYEN, H. T.; WING, R. A.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R. C.; JACKSON, S. A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v. 463, n. 7278, p. 178–83, 2010.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. What are Endophytes? In: **Microbial Root Endophytes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 1–13.

SCHWAB, S. .; DOS-SANTOS, C. M. .; BALDANI, J. I. Análise de restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA) para uma distinção rápida entre DNA bacteriano e de cana-de-açúcar. **Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 95, p. 22 p., 2014.

SCHWARZ, G. Estimating the dimension of a model. **The annals of statistics**, v. 6, n. 2, p. 461–464, 1978.

SEGATA, N.; HUTTENHOWER, C. Toward an efficient method of identifying core genes for evolutionary and functional microbial phylogenies. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24704, 2011.

SESSITSCH, A.; HARDOIM, P.; DÖRING, J.; WEILHARTER, A.; KRAUSE, A.; WOYKE, T.; MITTER, B.; HAUBERG-LOTTE, L.; FRIEDRICH, F.; RAHALKAR, M.; HUREK, T.; SARKAR, A.; BODROSSY, L.; VAN OVERBEEK, L.; BRAR, D.; VAN ELSAS, J. D.; REINHOLD-HUREK, B. Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 1, p. 28–36, 2012.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; PFEIFER, U.; WILHELM, E.; N.A, B.; S, M.; P, DE L.; B, D. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39, n. 1, p. 23–32, jan. 2002.

SHANNON, C. E. The Mathematical Theory of Information. **MD computing: computers in medical practice**, v. 14, n. 4, p. 306–317, 1949.

SHAW, J. L. A.; MONIS, P.; WEYRICH, L. S.; SAWADE, E.; DRIKAS, M.; COOPER, A. J. Using amplicon sequencing to characterize and monitor bacterial diversity in drinking water distribution systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 18, p. 6463–6473, 2015.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135–1145, 2008.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. Fast, scalable generation of high- quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems**, 2011.

SILVA FERREIRA, J.; IVO BALDANI, J.; DIVAN BALDANI, V. L. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 1, 2010.

SIMPSON, E. H. Measurement of Diversity. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 688–688, 30 abr. 1949.

- SINCLAIR, L.; OSMAN, O. A.; BERTILSSON, S.; SINCLAIR, L.; OSMAN, O. A.; BERTILSSON, S.; EILER, A. Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons : evaluating the Illumina platform Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons : evaluating the Illumina platform. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. 0–25, 2014.
- SIPOS, R.; SZÉKELY, A. J.; PALATINSZKY, M.; RÉVÉSZ, S.; MÁRIALIGETI, K.; NIKOLAUSZ, M. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 60, n. 2, p. 341–350, 2007.
- SNEATH, P.; SOKAL, R. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. 1973.
- SNEL, B.; BORK, P.; HUYNEN, M. A. Genome phylogeny based on gene content. **Nature genetics**, v. 21, n. 1, p. 108–110, 1999.
- SOLOVYEV, V.; SALAMOV, A. Metagenomics and its Applications in Agriculture; Biomedicine and Environmental Studies. **Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences**, n. March, p. 61–78, 2011.
- SON, H.-M.; YANG, J.-E.; PARK, Y.; HAN, C.-K.; KIM, S.-G.; KOOK, M.; YI, T.-H. *Sphingomonas kyungheensis* sp. nov., a bacterium with ginsenoside-converting activity isolated from soil of a ginseng field. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3848–3853, 2013.
- SRINIVASAN, S.; BATRA, J. Next Generation: Sequencing & Applications Four Generations of Sequencing- Is it Ready for the Clinic Yet? **Next Generation: Sequencing & Applications**, v. 1, n. 1, p. 1–7, 2014.
- STEUDLE, E.; FRENCH, J. Water transport in plants: Role of the apoplast. In: **Plant Roots - From Cells to Systems**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997. p. 67–79.
- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257–268, 2004.
- STROBEL, G.; STIERLE, A.; STIERLE, D.; HESS, W. M. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew (*Taxus brevifolia*). **Mycotaxon**, v. 47, p. 71–80, 1993.
- STURZ, A. V.; MATHESON, B. G. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. **Plant and Soil**, v. 184, n. 2, p. 265–271, 1996.
- STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Critical Reviews in Plant Sciences Bacterial Endophytes : Potential Role in Developing Sustainable Systems of Crop Production Bacterial Endophytes : Potential Role in Developing. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n. November 2013, p. 37–41, 2000.
- SU, J. Q.; WEI, B.; XU, C. Y.; QIAO, M.; ZHU, Y. G. Functional metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in agricultural soils from China. **Environment International**, v. 65, p. 9–15, 2014.
- SUN, L.; QIU, F.; ZHANG, X.; DAI, X.; DONG, X.; SONG, W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology**, v. 55, n. 3, p. 415–424, abr. 2008.
- SUN, X.; LIU, D.; ZHANG, X.; LI, W.; LIU, H.; HONG, W.; JIANG, C.; GUAN, N.; MA, C.; ZENG, H.; XU, C.; SONG, J.; HUANG, L.; WANG, C.; SHI, J.; WANG, R.; ZHENG, X.; LU, C.; WANG, X.; ZHENG, H. SLAF-seq: An Efficient Method of Large-Scale De Novo SNP Discovery and Genotyping Using High-Throughput Sequencing. **PLoS ONE**, v. 8,

n. 3, p. e58700, 2013.

SUNAGAWA, S.; COELHO, L. P.; CHAFFRON, S.; KULTIMA, J. R.; LABADIE, K.; SALAZAR, G.; DJAHANSCHIRI, B.; ZELLER, G.; MENDE, D. R.; ALBERTI, A.; CORNEJO-CASTILLO, F. M.; COSTEA, P. I.; CRUAUD, C.; D'OIDIO, F.; ENGELEN, S.; FERRERA, I.; GASOL, J. M.; GUIDI, L.; HILDEBRAND, F.; KOKOSZKA, F.; LEPOIVRE, C.; LIMA-MENDEZ, G.; POULAIN, J.; POULOS, B. T.; ROYO-LLONCH, M.; SARMENTO, H.; VIEIRA-SILVA, S.; DIMIER, C.; PICHERAL, M.; SEARSON, S.; KANDELS-LEWIS, S.; BOWLER, C.; DE VARGAS, C.; GORSKY, G.; GRIMSLEY, N.; HINGAMP, P.; IUDICONE, D.; JAILLON, O.; NOT, F.; OGATA, H.; PESANT, S.; SPEICH, S.; STEMMANN, L.; SULLIVAN, M. B.; WEISSENBAACH, J.; WINCKER, P.; KARSENTI, E.; RAES, J.; ACINAS, S. G.; BORK, P. Ocean plankton. Structure and function of the global ocean microbiome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 348, n. 6237, p. 1261359, 2015.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; IKEDA, A. C.; HUNGRIA, M.; ADAMOSKI, D.; KAVACORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, p. 26, jan. 2014.

SZMRECSÁNYI, T.; MOREIRA, E. P. O desenvolvimento da agroindústria canavieira do Brasil desde a Segunda Guerra Mundial. **Estudos Avançados**, v. 5, n. 11, p. 57–79, abr. 1991.

TADRA-SFEIR, M. Z.; SOUZA, E. M.; FAORO, H.; MÜLLER-SANTOS, M.; BAURA, V. A.; TULESKI, T. R.; RIGO, L. U.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; PEDROSA, F. O. Naringenin regulates expression of genes involved in cell wall synthesis in *Herbaspirillum seropedicae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 6, p. 2180–2183, 2011.

TAKEUCHI, M.; HAMANA, K.; HIRAISHI, A. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1405–1417, 2001.

TAKEUCHI, M.; SAKANE, T.; YANAGI, M.; YAMASATO, K.; HAMANA, K.; YOKOTA, A. Taxonomic Study of Bacteria Isolated from Plants: Proposal of *Sphingomonas rosa* sp. nov., *Sphingomonas pruni* sp. nov., *Sphingomonas asaccharolytica* sp. nov., and *Sphingomonas mali* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 334–341, 1995.

TATTINI, M.; GALARDI, C.; PINELLI, P.; MASSAI, R.; REMORINI, D.; AGATI, G. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. **New Phytologist**, v. 163, n. 3, p. 547–561, 2004.

TATUSOV, R. L.; GALPERIN, M. Y.; NATALE, D. A.; KOONIN, E. V. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 33–36, 2000.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 35–49, 2012.

TAUPP, M.; MEWIS, K.; HALLAM, S. J. The art and design of functional metagenomic screens. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 465–472, 2011.

TEJERA, N.; LLUCH, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M. V.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere.

Plant and Soil, v. 270, n. 1, p. 223–232, mar. 2005.

TEJERA, N.; ORTEGA, E.; RODES, R.; LLUCH, C. Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: Some implications in the association with endophytes. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 1, p. 80–85, 2006.

THAWEENUT, N.; HACHISUKA, Y.; ANDO, S.; YANAGISAWA, S.; YONEYAMA, T. Two seasons' study on *nifH* gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): Expression of *nifH* genes similar to those of rhizobia. **Plant and Soil**, v. 338, n. 1, p. 435–449, 28 set. 2011.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 2, n. 1, p. 3, jan. 2012.

TIMP, W.; MIRSAIDOV, U. M.; WANG, D.; COMER, J.; AKSIMENTIEV, A.; TIMP, G. Nanopore sequencing: Electrical measurements of the code of life. **IEEE Transactions on Nanotechnology**, v. 9, n. 3, p. 281–294, 2010.

TRIBOUSH, S. O.; DANILENKO, N. G.; DAVYDENKO, O. G. A Method for Isolation of Chloroplast DNA and Mitochondrial DNA from Sunflower. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 16, n. 172, p. 183–189, 1998.

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. **Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 46–53, jan. 2005.

TURNBAUGH, P. J.; RIDAURA, V. K.; FAITH, J. J.; REY, F. E.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. **Science translational medicine**, v. 1, n. 6, p. 6ra14–6ra14, 2009.

TYSON, G. W.; CHAPMAN, J.; HUGENHOLTZ, P.; ALLEN, E. E.; RAM, R. J.; RICHARDSON, P. M.; SOLOVYEV, V. V.; RUBIN, E. M.; ROKHSAR, D. S.; BANFIELD, J. F. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, v. 428, n. 6978, p. 37–43, 2004.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 5, p. 1414–1417, 1995.

URETA, A.; ALVAREZ, B.; RAMÓN, A.; VERA, M. A.; MARTINEZ-DRETS, G. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. **Plant and Soil**, v. 172, n. 2, p. 271–277, 1995.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of Nitrogen Fixation to Sugar Cane: Nitrogen-15 and Nitrogen-Balance Estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, n. 1, p. 105, 1992.

VANBROEKHOVEN, K.; RYNGAERT, A.; BASTIAENS, L.; WATTIAU, P.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; DE MOT, R. R.; SPRINGAEL, D. Streptomycin as a selective agent to facilitate recovery and isolation of introduced and indigenous *Sphingomonas* from environmental samples. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 1123–1136, nov. 2004.

VELÁZQUEZ, E.; ROJAS, M.; LORITE, M. J. M.; RIVAS, R.; ZURDO-PIÑEIRO, J. L.; HEYDRICH, M.; BEDMAR, E. J. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be found in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem of healthy sugarcane plants. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 118–124, abr. 2008.

VENTER, J. C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J. F.; HALPERN, A. L.; RUSCH, D.; EISEN, J. A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K. E.; NELSON, W.; FOUTS, D. E.; LEVY, S.; KNAP, A. H.; LOMAS, M. W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.;

- HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKOCH, C.; ROGERS, Y.-H.; SMITH, H. O. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v. 304, n. 5667, 2004.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F. DE. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in molecular**, 1994.
- VERSTRAETE, B.; VAN ELST, D.; STEYN, H.; VAN WYK, B.; LEMAIRE, B.; SMETS, E.; DESSEIN, S. Endophytic bacteria in toxic south african plants: Identification, phylogeny and possible involvement in gousiekte. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. e19265, 2011.
- VIDEIRA, S. S.; DE ARAUJO, J. L. S.; DA SILVA RODRIGUES, L.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 293, n. 1, p. 11–19, 2009.
- VIRUPAKSHI, S.; NAIK, G. R. Purification of DNA from chloroplast and mitochondria of sugarcane. **Current Science**, v. 92, n. 11, p. 1613–1619, 2007.
- WALTERS, W. A.; XU, Z.; KNIGHT, R. Meta-analysis of human gut microbes associated with obesity and IBD. **FEBS Letters**, v. 588, n. 22, p. 4223–4233, 2014.
- WANG, H.; QI, M.; CUTLER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 17, p. 4153–4154, 25 ago. 1993.
- WANG, H. X.; GENG, Z. L.; ZENG, Y.; SHEN, Y. M. Enriching plant microbiota for a metagenomic library construction. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2684–2691, 2008.
- WANG, J.; NAYAK, S.; KOCH, K.; MING, R. Carbon partitioning in sugarcane (*Saccharum* species). **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. June, p. 2005–2010, 2013a.
- WANG, Y.; CHANTREAU, M.; SIBOUT, R.; HAWKINS, S. Plant cell wall lignification and monolignol metabolism. **Frontiers in plant science**, v. 4, 2013b.
- WAYNE, D. **Encyclopedia of Metagenomics**. [s.l.: s.n.]. v. 1
- WEBSTER, G.; JAIN, V.; DAVEY, M. R.; GOUGH, C.; VASSE, J.; DENARIE, J.; COCKING, E. C. The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. **Plant, Cell & Environment**, v. 21, n. 4, p. 373–383, 1998.
- WELBAUM, G. E.; MEINZER, F. C. Compartmentation of solutes and water in developing sugarcane stalk tissue. **Plant physiology**, v. 93, n. 3, p. 1147–1153, 1990.
- WEMHEUER, F.; KAISER, K.; KARLOVSKY, P.; DANIEL, R.; VIDAL, S.; WEMHEUER, B. Bacterial endophyte communities of three agricultural important grass species differ in their response towards management regimes. **Scientific reports**, v. 7, p. 40914, 2017.
- WEYENS, N.; VAN DER LELIE, D.; TAGHAVI, S.; NEWMAN, L.; VANGRONSVELD, J. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 10, p. 591–598, 2009.
- WIDADA, J.; NOJIRI, H.; OMORI, T. Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1, p. 45–59, 2002.
- WILSON, M. C.; PIEL, J. Metagenomic approaches for exploiting uncultivated bacteria as a resource for novel biosynthetic enzymology. **Chemistry and Biology**, v. 20, n. 5, p. 636–647, 23 maio 2013.
- XIAO, S. Gene Technology Protecting Crops from Pathogens : Novel Approaches to An Old

Problem. **Gene Technology**, v. 1, n. 1, p. 1–4, 2012.

XIE, C.-H.; YOKOTA, A. *Sphingomonas azotifigens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. 4, p. 889–893, 2006.

YABUUCHI, E.; YANO, I.; OYAIZU, H. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas*. **Microbiology and**, 1990.

YANG, S.; ZHANG, X.; CAO, Z.; ZHAO, K.; WANG, S.; CHEN, M.; HU, X. Growth-promoting *Sphingomonas paucimobilis* ZJSH1 associated with *Dendrobium officinale* through phytohormone production and nitrogen fixation. **Microbial biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 611–620, 2014.

YASIR, B. K. B.; SALAM PRADEEP, S.; KONWAR. Metagenomics: An Application Based Perspective. **Chinese Journal of Biology**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

YEOH, Y. K.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; DENNIS, P. G.; ROBINSON, N.; RAGAN, M. A.; SCHMIDT, S.; HUGENHOLTZ, P. The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying nitrogen fertilizer application. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1338–1351, 2016.

YILMAZ, S.; ALLGAIER, M.; HUGENHOLTZ, P. Multiple displacement amplification compromises quantitative analysis of metagenomes. **Nature Publishing Group**, v. 7, n. 12, p. 943–944, 2010.

YIM, M. S.; YAU, Y. C. W.; MATLOW, A.; SO, J. S.; ZOU, J.; FLEMMING, C. A.; SCHRAFT, H.; LEUNG, K. T. A novel selective growth medium-PCR assay to isolate and detect *Sphingomonas* in environmental samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, n. 1, p. 19–27, 2010.

YOKOUCHI, H.; FUKUOKA, Y.; MUKOYAMA, D.; CALUGAY, R.; TAKEYAMA, H.; MATSUNAGA, T. Whole-metagenome amplification of a microbial community associated with scleractinian coral by multiple displacement amplification using $\phi 29$ polymerase. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, jul. 2006.

YOON, M. Y.; LEE, K. M.; YOON, Y.; GO, J.; PARK, Y.; CHO, Y. J.; TANNOCK, G. W.; YOON, S. S. Functional screening of a metagenomic library reveals operons responsible for enhanced intestinal colonization by gut commensal microbes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3829–3838, 2013.

YOON, S.-H.; HA, S.-M.; KWON, S.; LIM, J.; KIM, Y.; SEO, H.; CHUN, J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, n. 5, p. 1613–1617, 2017.

ZAKHAROVA, E. A.; SHCHERBAKOV, A. A.; BRUDNIK, V. V.; SKRIPKO, N. G.; BULKHIN, N. S.; IGNATOV, V. V. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. **European Journal of Biochemistry**, v. 259, n. 3, p. 572–576, 25 dez. 2001.

ZHANG, J.; CHIODINI, R.; BADR, A.; ZHANG, G. The impact of next-generation sequencing on genomics. **Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao**, v. 38, n. 3, p. 95–109, 2011.

ZHOU, L.; LI, H.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; HAN, S.; XU, H. Abundance and diversity of *Sphingomonas* in Shenfu petroleum-wastewater irrigation zone, China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 1, p. 282–294, 2012.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A.

K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2198–208, 2002.

9 ANEXOS

Anexo A - Classificação das OTUs identificadas em amostras de colmo, utilizando o protocolo de enriquecimento descrito no Capítulo I

OTUs	Classificação SILVA SEED	Identidade (%)	Melhor hit BLAST (GenBank, nr)	Identidade (%)	Classificação gênero/espécie
Otu0001	<i>Novosphingobium</i>	100	<i>Novosphingobium</i> sp. (KT452772.1)	100	<i>Novosphingobium</i> sp.
Otu0002	<i>Sphingomonas</i>	100	<i>Sphingomonas</i> sp. (KT350484.1)	100	<i>Sphingomonas</i> sp.
Otu0003	<i>Methylobacterium</i>	100	<i>Methylobacterium</i> sp. (CP006992.1)	100	<i>Methylobacterium</i> sp.
Otu0004	<i>Cupriavidus</i>	100	<i>Cupriavidus metallidurans</i> (KJ605846.1)	100	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
Otu0005	<i>Ralstonia</i>	100	<i>Ralstonia</i> sp. (KT387846.1)	100	<i>Ralstonia</i> sp.
Otu0006	<i>Hydrothalea</i>	100	Uncultured <i>Sphingobacteriales</i> (KP901772.1)	100	Uncultured <i>Hydrothalea</i>
Otu0007	<i>Nevskia</i>	100	<i>Nevskia aquatilis</i> (JQ710440.1)	100	<i>Nevskia aquatilis</i>
Otu0008	unclassified <i>Betaproteobacteria</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KP912996.1)	99	Uncultured <i>Betaproteobacteria</i>
Otu0009	unclassified <i>Proteobacteria</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KP925071.1)	99	Uncultured <i>Proteobacteria</i>
Otu0010	unclassified <i>Rhizobiales</i>	100	Uncultured <i>Methylocella</i> sp. (HQ674800.1)	99	Uncultured <i>Methylocella</i> sp.
Otu0011	<i>Bradyrhizobium</i>	99	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (LN876554.1)	100	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
Otu0012	<i>Methylobacterium</i>	100	<i>Methylobacterium radiotolerans</i> (KT390763.1)	100	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
Otu0013	<i>Acinetobacter</i>	100	<i>Acinetobacter schindleri</i> (KR029982.1)	100	<i>Acinetobacter schindleri</i>
Otu0014	<i>Sphingomonas</i>	100	<i>Sphingomonas</i> sp. (JN696650.1)	100	<i>Sphingomonas</i> sp.
Otu0015	unclassified <i>Oxalobacteraceae</i>	100	<i>Janthinobacterium</i> sp. (KT424976.1)	100	<i>Janthinobacterium</i> sp.
Otu0016	unclassified <i>Polyangiaceae</i>	98	Uncultured <i>bacterium</i> (JX095839.1)	100	Uncultured <i>Polyangiaceae</i>
Otu0017	unclassified <i>Sphingomonadales</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KP910937.1)	100	Uncultured <i>Sphingomonadales</i>
Otu0018	<i>Pedobacter</i>	100	<i>Pedobacter</i> sp. (KP899236.1)	100	<i>Pedobacter</i> sp.
Otu0019	<i>Staphylococcus</i>	100	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (LN998078.1)	100	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
Otu0020	<i>Pseudomonas</i>	100	<i>Pseudomonas</i> sp. (KT441044.1)	100	<i>Pseudomonas</i> sp.
Otu0021	unclassified <i>Enterobacteriaceae</i>	100	<i>Yersinia nurmii</i> (KT459767.1)	100	<i>Yersinia nurmii</i>
Otu0022	<i>Rickettsiales/mitochondria</i>	100	<i>Aegilops speltoides</i> (<i>Poaceae</i>) <i>mtDNA</i> (AP013107.1)	100	<i>Mitochondria</i>
Otu0023	<i>Pedobacter</i>	100	<i>Pedobacter jejuensis</i> (KC252614.1)	99	<i>Pedobacter jejuensis</i>
Otu0024	<i>Streptococcus</i>	100	<i>Streptococcus</i> sp. (KT819574.1)	100	<i>Streptococcus</i> sp.
Otu0025	<i>Rhodopseudomonas</i>	100	<i>Rhodopseudomonas</i> sp. (LN886714.1)	100	<i>Rhodopseudomonas</i> sp.
Otu0026	<i>Acinetobacter</i>	100	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (KT387352.1)	100	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
Otu0027	<i>Pedomicrobium</i>	100	Uncultured <i>Pedomicrobium</i> sp. (KR817387.1)	100	Uncultured <i>Pedomicrobium</i> sp.
Otu0028	unclassified <i>Frankiaceae</i>	100	<i>Jatrophihabitans</i> sp. (KR184288.1)	100	<i>Jatrophihabitans</i> sp.
Otu0029	<i>Pseudomonas</i>	96	<i>Pseudomonas</i> sp. (KT597080.1)	100	<i>Pseudomonas</i> sp.
Otu0030	unclassified <i>Actinobacteria</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KT360493.1)	100	Uncultured <i>Actinobacteria</i>
Otu0031	<i>Cyanobacteria/Chloroplast</i>	100	<i>Saccharum Q155 chloroplast</i> (KU214867.1)	100	<i>Chloroplast</i>
Otu0032	unclassified <i>Enterobacteriaceae</i>	100	<i>Salmonella enterica</i> (CP007331.2)	99	<i>Salmonella enterica</i>
Otu0033	<i>Kurthia</i>	100	<i>Kurthia gibsonii</i> (KU234673.1)	100	<i>Kurthia gibsonii</i>

OTUs	Classificação SILVA SEED	Identidade (%)	Melhor hit BLAST (GenBank, nr)	Identidade (%)	Classificação gênero/espécie
Otu0034	<i>Sediminibacterium</i>	100	<i>Sediminibacterium</i> sp. (KT353085.1)	100	<i>Sediminibacterium</i> sp.
Otu0035	unclassified <i>Comamonadaceae</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (LK024657.2)	99	Uncultured <i>Comamonadaceae</i>
Otu0036	unclassified <i>Caulobacteraceae</i>	100	Uncultured <i>Caulobacter</i> sp. (JN886933.1)	100	Uncultured <i>Caulobacter</i> sp.
Otu0037	<i>Veillonella</i>	100	<i>Veillonella</i> sp. (KC311764.1)	99	<i>Veillonella</i> sp.
Otu0038	unclassified	100	Uncultured <i>bacterium</i> (JX874880.1)	99	Uncultured <i>bacterium</i>
Otu0039	<i>Brevundimonas</i>	100	<i>Brevundimonas</i> sp. (KJ654816.1)	100	<i>Brevundimonas</i> sp.
Otu0040	unclassified <i>Chitinophagaceae</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KP585923.1)	99	Unclassified <i>Chitinophagaceae</i>
Otu0041	<i>Devosia</i>	100	<i>Devosia</i> sp. (KJ649711.1)	99	<i>Devosia</i> sp.
Otu0042	<i>Capnocytophaga</i>	100	<i>Capnocytophaga granulosa</i> (LC037222.1)	100	<i>Capnocytophaga granulosa</i>
Otu0043	<i>Cloacibacterium</i>	100	<i>Cloacibacterium</i> sp. (LC094578.1)	100	<i>Cloacibacterium</i> sp.
Otu0044	<i>Alishewanella</i>	100	<i>Alishewanella jeotgali</i> (KT387342.1)	99	<i>Alishewanella jeotgali</i>
Otu0045	<i>Chryseobacterium</i>	100	<i>Chryseobacterium hispanicum</i> (JF915333.1)	99	<i>Chryseobacterium hispanicum</i>
Otu0046	unclassified <i>Moraxellaceae</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KT787058.1)	100	Uncultured <i>Moraxellaceae</i>
Otu0047	unclassified <i>Comamonadaceae</i>	100	<i>Polaromonas</i> sp. (KR922285.1)	100	<i>Polaromonas</i> sp.
Otu0048	unclassified <i>Betaproteobacteria</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KT360561.1)	100	Uncultured <i>Betaproteobacteria</i>
Otu0049	unclassified <i>Rhizobiaceae</i>	100	<i>Rhizobium</i> sp. (KU218525.1)	100	<i>Rhizobium</i> sp.
Otu0050	<i>Aerococcus</i>	100	<i>Aerococcus viridans</i> (CP014164.1)	100	<i>Aerococcus viridans</i>
Otu0051	<i>Leuconostoc</i>	100	<i>Leuconostoc gelidum</i> (LN890331.1)	100	<i>Leuconostoc gelidum</i>
Otu0052	<i>Escherichia-Shigella</i>	100	<i>Escherichia coli</i> (CP014225.1)	100	<i>Escherichia coli</i>
Otu0053	<i>Chryseobacterium</i>	100	<i>Chryseobacterium</i> sp. (KT767744.1)	100	<i>Chryseobacterium</i>
Otu0054	unclassified <i>Proteobacteria</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KP904445.1)	100	Uncultured <i>Proteobacteria</i>
Otu0055	<i>Alloprevotella</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KT287347.1)	100	Uncultured <i>Alloprevotella</i>
Otu0056	<i>Vibrio</i>	100	<i>Vibrio rumoiensis</i> (KP236319.1)	100	<i>Vibrio rumoiensis</i>
Otu0057	<i>Lactococcus</i>	100	<i>Lactococcus piscium</i> (KT767809.1)	100	<i>Lactococcus piscium</i>
Otu0058	<i>Acinetobacter</i>	100	<i>Acinetobacter septicus</i> (KT387334.1)	100	<i>Acinetobacter septicus</i>
Otu0059	<i>Flavobacterium</i>	100	<i>Flavobacterium</i> sp. (KP899175.1)	100	<i>Flavobacterium</i> sp.
Otu0060	<i>Stenotrophomonas</i>	100	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (KU510059.1)	100	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Otu0061	<i>Peptoniphilus</i>	100	<i>Peptoniphilus</i> sp. (KR232908.1)	99	<i>Peptoniphilus</i> sp.
Otu0062	<i>Sphingopyxis</i>	100	<i>Sphingopyxis</i> sp. (LC090855.1)	99	<i>Sphingopyxis</i> sp.
Otu0063	<i>Gemella</i>	100	Uncultured <i>Gemella</i> sp. (KC676075.1)	99	Uncultured <i>Gemella</i> sp.
Otu0064	<i>Stenotrophomonas</i>	100	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (KM219978.1)	99	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
Otu0065	unclassified <i>Acetobacteraceae</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KC786733.1)	99	Uncultured <i>Acetobacteraceae</i>
Otu0066	<i>Pseudomonas</i>	100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KT329290.1)	100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Otu0067	<i>Sphingomonas</i>	100	<i>Sphingomonas</i> sp. (LN997989.1)	100	<i>Sphingomonas</i> sp.
Otu0068	<i>Lactococcus</i>	100	<i>Lactococcus lactis</i> (KT438166.1)	100	<i>Lactococcus lactis</i>
Otu0069	<i>Ochrobactrum</i>	100	<i>Ochrobactrum</i> sp. (KT261370.1)	100	<i>Ochrobactrum</i> sp.
Otu0070	unclassified <i>Bacillales</i>	100	<i>Bacillus thuringiensis</i> (KT459783.1)	100	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Otu0071	<i>Aeromonas</i>	100	<i>Aeromonas</i> sp. (KU577467.1)	100	<i>Aeromonas</i> sp.
Otu0072	unclassified/unknown	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KT437375.1)	90	Uncultured <i>bacterium</i>
Otu0073	<i>Cyanobacteria/Chloroplast</i>	100	<i>Odontella</i> sp. <i>chloroplast</i> (LN735391.3)	100	<i>Odontella</i> sp.
Otu0074	unclassified <i>Myxococcales</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KP560820.1)	97	Uncultured <i>Myxococcales</i>

OTUs	Classificação SILVA SEED	Identidade (%)	Melhor hit BLAST (GenBank, nr)	Identidade (%)	Classificação gênero/espécie
Otu0075	<i>Desemzia</i>	100	Uncultured <i>Desemzia</i> sp. (LN833478.1)	100	Uncultured <i>Desemzia</i> sp.
Otu0076	<i>Rothia</i>	100	<i>Rothia amarae</i> (KP798848.1)	100	<i>Rothia amarae</i>
Otu0077	<i>Streptococcus</i>	100	<i>Streptococcus salivarius</i> (CP014144.1)	100	<i>Streptococcus salivarius</i>
Otu0078	unclassified <i>Alcaligenaceae</i>	100	<i>Achromobacter</i> sp. (KP663365.1)	98	<i>Achromobacter</i> sp.
Otu0079	<i>Burkholderia</i>	100	<i>Burkholderia</i> sp. (KT387847.1)	100	<i>Burkholderia</i> sp.
Otu0080	unclassified <i>Actinobacteria</i>	100	Uncultured <i>Corynebacterium</i> sp. (LC011366.1)	100	Uncultured <i>Corynebacterium</i> sp.
Otu0081	<i>Lactobacillus</i>	100	<i>Lactobacillus paracasei</i> (KU366368.1)	99	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Otu0082	<i>Nocardioides</i>	100	<i>Nocardioides</i> sp. (KM507698.1)	99	<i>Nocardioides</i> sp.
Otu0083	unclassified <i>Enterococcaceae</i>	100	Uncultured <i>Vagococcus</i> sp. (KP181788.1)	99	Uncultured <i>Vagococcus</i> sp.
Otu0084	<i>Lactobacillus</i>	100	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (KT445882.1)	99	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Otu0085	<i>Paracoccus</i>	100	<i>Paracoccus</i> sp. (KJ191093.1)	100	<i>Paracoccus</i> sp.
Otu0086	unclassified WD272	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KJ407705.1)	99	Uncultured WD272
Otu0087	<i>Arthrobacter</i>	100	<i>Arthrobacter</i> sp. (KU579193.1)	100	<i>Arthrobacter</i> sp.
Otu0088	<i>Algoriphagus</i>	100	Uncultured <i>Sphingobacteria</i> (AY551563.1)	99	Uncultured <i>Algoriphagus</i>
Otu0089	unclassified <i>Rhizobiaceae</i>	100	<i>Neorhizobium</i> sp. (KR002736.1)	99	<i>Neorhizobium</i> sp.
Otu0090	<i>Corynebacterium</i>	100	Uncultured <i>actinobacterium</i> (DQ169541.1)	100	Uncultured <i>Corynebacterium</i>
Otu0091	unclassified/unknown	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KT436931.1)	79	Uncultured <i>bacterium</i>
Otu0092	<i>Phyllobacterium</i>	100	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> (KJ004494.1)	100	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>
Otu0093	<i>Alloiococcus</i>	100	Uncultured <i>Carnobacteriaceae</i> (KP902401.1)	100	Uncultured <i>Alloiococcus</i>
Otu0094	<i>Bosea</i>	100	<i>Bosea</i> sp. (KT888016.1)	99	<i>Bosea</i> sp.
Otu0095	unclassified <i>Pasteurellaceae</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KT926535.1)	99	Uncultured <i>Pasteurellaceae</i>
Otu0096	unclassified <i>Rhizobiales</i>	100	<i>Hyphomicrobium</i> sp. (LN833373.1)	99	<i>Hyphomicrobium</i> sp.
Otu0097	<i>Bacillus</i>	100	<i>Bacillus</i> sp. (AB734889.1)	100	<i>Bacillus</i> sp.
Otu0098	<i>Herbaspirillum</i>	100	<i>Herbaspirillum hiltneri</i> (KU305712.1)	100	<i>Herbaspirillum hiltneri</i>
Otu0099	unclassified <i>Betaproteobacteria</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KJ993908.1)	99	Uncultured <i>Betaproteobacteria</i>
Otu0100	unclassified/unknown	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KT436931.1)	79	Uncultured <i>bacterium</i>
Otu0101	<i>Massilia</i>	100	Uncultured <i>Burkholderiales</i> (HM077428.1)	99	Uncultured <i>Massilia</i>
Otu0102	unclassified <i>Bacillales</i>	100	<i>Brochothrix thermosphacta</i> (KT767854.1)	100	<i>Brochothrix thermosphacta</i>
Otu0103	<i>Cupriavidus</i>	100	<i>Cupriavidus metallidurans</i> (KJ605846.1)	98	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
Otu0104	<i>Clostridiales/Candidatus_Arthromitus</i>	100	<i>Candidatus Arthromitus</i> sp. (AP012210.1)	98	<i>Candidatus Arthromitus</i> sp.
Otu0105	<i>Alloprevotella</i>	100	Uncultured <i>Alloprevotella</i> sp. (KC203063.1)	99	Uncultured <i>Alloprevotella</i> sp.
Otu0106	unclassified <i>Bacteria</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KC917520.1)	91	Uncultured <i>bacterium</i>
Otu0107	<i>Anaerococcus</i>	100	<i>Anaerococcus nagya</i> (KU043522.1)	100	<i>Anaerococcus nagya</i>
Otu0108	unclassified <i>Bacteria</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KP632523.1)	95	Uncultured <i>bacterium</i>
Otu0109	<i>Shewanella</i>	100	<i>Shewanella baltica</i> (KT362724.1)	100	<i>Shewanella baltica</i>
Otu0110	unclassified <i>Enterobacteriaceae</i>	100	<i>Salmonella bongori</i> (KU060294.1)	98	<i>Salmonella bongori</i>
Otu0111	<i>Hydrogenophilus</i>	100	Uncultured <i>Hydrogenophilus</i> sp. (KR704559.1)	100	Uncultured <i>Hydrogenophilus</i> sp.
Otu0112	<i>Fusobacterium</i>	100	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (CP013121.1)	100	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
Otu0113	unclassified <i>Gammaproteobacteria</i>	100	Uncultured <i>gamma proteobacterium</i> (JQ579920.1)	100	Uncultured <i>gamma proteobacterium</i>
Otu0114	<i>Enhydrobacter</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (JF500203.1)	100	Uncultured <i>Enhydrobacter</i>
Otu0115	<i>Duganella</i>	100	<i>Duganella</i> sp. (KT424958.1)	100	<i>Duganella</i> sp.

OTUs	Classificação SILVA SEED	Identidade (%)	Melhor hit BLAST (GenBank, nr)	Identidade (%)	Classificação gênero/espécie
Otu0116	unclassified <i>Lactobacillales</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (JF155514.1)	100	Uncultured <i>Lactobacillales</i>
Otu0117	<i>Rhodanobacter</i>	100	<i>Rhodanobacter</i> sp. (AB991682.1)	100	<i>Rhodanobacter</i> sp.
Otu0118	unclassified <i>Deinococcaceae</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (JN211269.1)	100	Uncultured <i>Deinococcaceae</i>
Otu0119	unclassified <i>Desulfobulbaceae</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (AB305446.1)	98	Uncultured <i>Desulfobulbaceae</i>
Otu0120	unclassified <i>Comamonadaceae</i>	100	<i>Comamonas jiangduensis</i> (KT379965.1)	99	<i>Comamonas jiangduensis</i>
Otu0121	<i>Streptococcus</i>	100	<i>Streptococcus intermedius</i> (CP012718.1)	99	<i>Streptococcus intermedius</i>
Otu0122	unclassified <i>Acidobacteria</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KF599554.1)	99	Uncultured <i>Acidobacteria</i>
Otu0123	unclassified <i>Proteobacteria</i>	100	Uncultured <i>gamma proteobacterium</i> (JF344128.1)	99	Uncultured <i>gamma proteobacterium</i>
Otu0124	<i>Cupriavidus</i>	100	<i>Cupriavidus metallidurans</i> (KJ605846.1)	98	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
Otu0125	unclassified/unknown	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KT436931.1)	79	Uncultured <i>bacterium</i>
Otu0126	<i>Sulfurovum</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KT257809.1)	99	Uncultured <i>Sulfurovum</i>
Otu0127	<i>Sphingomonas</i>	100	<i>Sphingomonas</i> sp. (KU179043.1)	99	<i>Sphingomonas</i> sp.
Otu0128	unclassified <i>Rhizobiales</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KP299850.1)	99	Uncultured <i>Rhizobiales</i>
Otu0129	<i>Janibacter</i>	100	<i>Janibacter</i> sp. (KU560381.1)	99	<i>Janibacter</i> sp.
Otu0130	unclassified/unknown	100	Uncultured <i>organism</i> (JN437167.1)	84	Uncultured <i>organism</i>
Otu0131	unclassified <i>Veillonellaceae</i>	100	<i>Veillonella</i> sp. (KF280301.1)	100	<i>Veillonella</i> sp.
Otu0132	unclassified <i>Chthoniobacterales</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KP904546.1)	97	Uncultured <i>Chthoniobacterales</i>
Otu0133	<i>Labrys</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (KT908718.1)	100	Uncultured <i>Labrys</i>
Otu0134	unclassified <i>Deltaproteobacteria</i>	100	Uncultured <i>delta proteobacterium</i> (FJ949273.1)	98	Uncultured <i>delta proteobacterium</i>
Otu0135	<i>Propionibacterium</i>	100	<i>Propionibacterium acnes</i> (LN998080.1)	100	<i>Propionibacterium acnes</i>
Otu0136	<i>Dietzia</i>	100	<i>Dietzia</i> sp. (KT597059.1)	100	<i>Dietzia</i> sp.
Otu0137	unclassified <i>Alteromonadaceae</i>	100	Uncultured <i>bacterium</i> (FJ644603.1)	100	Uncultured <i>Alteromonadaceae</i>
Otu0138	<i>Sphingomonas</i>	100	<i>Sphingomonas</i> sp. (KU179043.1)	98	<i>Sphingomonas</i> sp.
Otu0139	unclassified/ <i>Candidate_division_OP3</i>	100	Uncultured <i>candidate division OP3</i> (AF424409.1)	95	Uncultured <i>candidate division OP3</i>
Otu0140	unclassified <i>Bacteria</i>	100	Uncultured <i>Verrucomicrobia</i> (HQ462506.1)	99	Uncultured <i>Verrucomicrobia</i>
Otu0141	<i>Rheinheimera</i>	100	Uncultured <i>Rheinheimera</i> sp. (JF826426.1)	99	Uncultured <i>Rheinheimera</i> sp.
Otu0142	unclassified <i>Caulobacteraceae</i>	100	Uncultured <i>Caulobacter</i> sp. (JQ177421.1)	98	Uncultured <i>Caulobacter</i> sp.
Otu0143	<i>Actinomyces</i>	100	Uncultured <i>Actinomyces</i> sp. (FJ976258.1)	100	Uncultured <i>Actinomyces</i> sp.
Otu0144	<i>Actinomyces</i>	100	Uncultured <i>Actinomyces</i> sp. (JQ997181.1)	99	Uncultured <i>Actinomyces</i> sp.

Anexo B - Descrição da importância agrobiotecnológica das OTUs detectadas no Capítulo I de acordo com a literatura consultada

OTUs	Gênero/espécie	Função descrita na literatura	Tecidos de cana-de-açúcar onde já foram reportadas	Referencias
Otu0001	<i>Novosphingobium</i> sp.	FBN; PCP	FA;	1; 2; 3
Otu0002	<i>Sphingomonas</i> sp.	FBN; PCP; PFH	RZ; CO;	1; 4; 5; 6; 7
Otu0003	<i>Methylobacterium</i> sp.	FBN; SFO	CO; FA	1; 8; 9
Otu0004	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	-	CO	1
Otu0005	<i>Ralstonia</i> sp.	-	CO	1
Otu0006	Uncultured <i>Hydrothalea</i>	-	-	-
Otu0007	<i>Nevskia aquatilis</i>	-	N.e.a.	1
Otu0008	Uncultured <i>Betaproteobacteria</i>	-	-	-
Otu0009	Uncultured <i>Proteobacteria</i>	-	-	-
Otu0010	Uncultured <i>Methylocella</i> sp.	FBN;	-	11
Otu0011	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	FBN; PFH; PCP; PSI; SMP	RZ;	1; 12; 13; 14; 15; 16
Otu0012	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	FBN; SFO; ACD	-	8; 9
Otu0013	<i>Acinetobacter schindleri</i>	FBN; ACD; PCP; PFH; SFO; PSI	CO; FA	1; 17; 18; 19;
Otu0014	<i>Sphingomonas</i> sp.	FBN; PCP; PFH	RZ; CO;	1; 4; 5; 6; 7
Otu0015	<i>Janthinobacterium</i> sp.	PFH	N.e.a.	1; 20
Otu0016	Uncultured <i>Polyangiaceae</i>	-	-	-
Otu0017	Uncultured <i>Sphingomonadales</i>	-	-	-
Otu0018	<i>Pedobacter</i> sp.	PFH	CO; FA	1; 21
Otu0019	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	-	N.e.a.	1
Otu0020	<i>Pseudomonas</i> sp.	FBN; PFH; PCP; PSI; SMP;	CO; FA; RZ	1; 4; 7; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28
Otu0021	<i>Yersinia nirmii</i>	-	-	-
Otu0022	<i>Mitochondria</i>	-	-	-
Otu0023	<i>Pedobacter jejuensis</i>	PFH	CO; FA	1; 21
Otu0024	<i>Streptococcus</i> sp.	-	-	1
Otu0025	<i>Rhodopseudomonas</i> sp.	PFH	-	30
Otu0026	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	FBN; ACD; PCP; PFH; SFO; PSI	CO; FA	1; 17; 18; 19;
Otu0027	Uncultured <i>Pedomicrobium</i> sp.	-	N.e.a.	1
Otu0028	<i>Jatrophihabitans</i> sp.	-	-	-
Otu0029	<i>Pseudomonas</i> sp.	FBN; PFH; PCP; PSI; SMP;	CO; FA; RZ	1; 4; 7; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28
Otu0030	Uncultured <i>Actinobacteria</i>	-	-	-
Otu0031	<i>Chloroplast</i>	-	-	-
Otu0032	<i>Salmonella enterica</i>	-	-	-
Otu0033	<i>Kurthia gibsonii</i>	PCP	-	30
Otu0034	<i>Sediminibacterium</i> sp.	-	N.e.a.	1
Otu0035	Uncultured <i>Comamonadaceae</i>	-	-	-
Otu0036	Uncultured <i>Caulobacter</i> sp.	PFH; SFO; ACD; FBN	RZ; CO; FA	1; 32; 33
Otu0037	<i>Veillonella</i> sp.	-	-	-

OTUs	Gênero/espécie	Função descrita na literatura	Tecidos de cana-de-açúcar onde já foram reportadas	Referencias
Otu0038	Uncultured <i>bacterium</i>	-	-	-
Otu0039	<i>Brevundimonas</i> sp.	-	-	-
Otu0040	Unclassified <i>Chitinophagaceae</i>	-	-	1
Otu0041	<i>Devosia</i> sp.	-	N.e.a.	1
Otu0042	<i>Capnocytophaga granulosa</i>	-	N.e.a.	1
Otu0043	<i>Cloacibacterium</i> sp.	-	N.e.a.	1
Otu0044	<i>Alishewanella jeotgali</i>	PFH; FBN	-	34
Otu0045	<i>Chryseobacterium hispanicum</i>	SFO;	RZ; CO; FA	1; 35
Otu0046	Uncultured <i>Moraxellaceae</i>	-	-	-
Otu0047	<i>Polaromonas</i> sp.	-	N.e.a.	1
Otu0048	Uncultured <i>Betaproteobacteria</i>	-	-	-
Otu0049	<i>Rhizobium</i> sp.	FBN; PFH; SFO; PSI	RZ; CO	1; 7; 15; 20; 22; 32; 36
Otu0050	<i>Aerococcus viridans</i>	ACD	-	37
Otu0051	<i>Leuconostoc gelidum</i>	-	N.e.a.	1
Otu0052	<i>Escherichia coli</i>	-	RZ	4;
Otu0053	<i>Chryseobacterium</i>	SFO;	RZ; CO; FA	1; 35
Otu0054	Uncultured <i>Proteobacteria</i>	-	-	-
Otu0055	Uncultured <i>Alloprevotella</i>	-	-	-
Otu0056	<i>Vibrio rumoiensis</i>	SFO; PFH; FBN; PSI	-	34; 38; 39; 40
Otu0057	<i>Lactococcus piscium</i>	-	CO	4;
Otu0058	<i>Acinetobacter septicus</i>	FBN; ACD; PCP; PFH; SFO; PSI	CO; FA	1; 17; 18; 19;
Otu0059	<i>Flavobacterium</i> sp.	FBN; PFH; PSI	RZ; CO; FA	1; 21; 41; 42
Otu0060	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	RZ; CO	1; 4;
Otu0061	<i>Peptoniphilus</i> sp.	-	-	-
Otu0062	<i>Sphingopyxis</i> sp.	-	N.e.a.	1
Otu0063	Uncultured <i>Gemella</i> sp.	-	-	-
Otu0064	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	RZ; CO	1; 4;
Otu0065	Uncultured <i>Acetobacteraceae</i>	-	-	-
Otu0066	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	FBN; PFH; PCP; PSI; SMP;	CO; FA; RZ	1; 4; 7; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29
Otu0067	<i>Sphingomonas</i> sp.	FBN; PCP; PFH	RZ; CO;	1; 4; 5; 6; 7
Otu0068	<i>Lactococcus lactis</i>	-	CO	4;
Otu0069	<i>Ochrobactrum</i> sp.	FBN;	FA;	1; 2
Otu0070	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ACD; PCP; PSI; PFH; SFO;	RZ; CO; FA	1; 4; 17; 22; 43; 44; 45; 46
Otu0071	<i>Aeromonas</i> sp.	-	-	-
Otu0072	Uncultured <i>bacterium</i>	-	-	-
Otu0073	<i>Odontella</i> sp.	-	-	-
Otu0074	Uncultured <i>Myxococcales</i>	-	-	-
Otu0075	Uncultured <i>Desemzia</i> sp.	SFO; PFH	-	46
Otu0076	<i>Rothia amarae</i>	-	-	-
Otu0077	<i>Streptococcus salivarius</i>	-	N.e.a.	1
Otu0078	<i>Achromobacter</i> sp.	ACD; BFN; PSI	CO	1; 47; 48; 49

OTUs	Gênero/espécie	Função descrita na literatura	Tecidos de cana-de-açúcar onde já foram reportadas	Referencias
Otu0079	<i>Burkholderia</i> sp.	ACD; SMP; PFH; FBN; SFO; PSI; PCP	CO; FA; RZ	1; 4; 9; 25; 50; 51; 52; 53
Otu0080	Uncultured <i>Corynebacterium</i> sp.	-	N.e.a.	1
Otu0081	<i>Lactobacillus paracasei</i>	-	-	-
Otu0082	<i>Nocardioides</i> sp.	-	N.e.a.	1
Otu0083	Uncultured <i>Vagococcus</i> sp.	-	-	-
Otu0084	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	-
Otu0085	<i>Paracoccus</i> sp.	-	N.e.a.	1
Otu0086	Uncultured WD272	-	-	-
Otu0087	<i>Arthrobacter</i> sp.	SMP; SFO	RZ	4; 54; 55
Otu0088	Uncultured <i>Algoriphagus</i>	-	-	-
Otu0089	<i>Neorhizobium</i> sp.	PFH; SMP	-	56; 57
Otu0090	Uncultured <i>Corynebacterium</i>	-	N.e.a.	1
Otu0091	Uncultured <i>bacterium</i>	-	-	-
Otu0092	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	FBN	-	58; 59
Otu0093	Uncultured <i>Alloiococcus</i>	-	-	-
Otu0094	<i>Bosea</i> sp.	FBN; PFH	CO	1; 4; 60
Otu0095	Uncultured <i>Pasteurellaceae</i>	-	-	-
Otu0096	<i>Hyphomicrobium</i> sp.	-	N.e.a.	1
Otu0097	<i>Bacillus</i> sp.	ACD; PCP; PSI; PFH; SFO;	RZ; CO; FA	1; 4; 17; 22; 43; 44; 45
Otu0098	<i>Herbaspirillum hiltneri</i>	FBN; PFH;	CO; FA; RZ	1; 4; 61; 62; 63; 64
Otu0099	Uncultured <i>Betaproteobacteria</i>	-	-	-
Otu0100	Uncultured <i>bacterium</i>	-	-	-
Otu0101	Uncultured <i>Massilia</i>	-	-	-
Otu0102	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	-	-	-
Otu0103	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	-	N.e.a.	1
Otu0104	<i>Candidatus Arthromitus</i> sp.	-	-	-
Otu0105	Uncultured <i>Alloprevotella</i> sp.	-	-	-
Otu0106	Uncultured <i>bacterium</i>	-	-	-
Otu0107	<i>Anaerococcus nagyae</i>	-	-	-
Otu0108	Uncultured <i>bacterium</i>	-	-	-
Otu0109	<i>Shewanella baltica</i>	PFH	CO	65
Otu0110	<i>Salmonella bongori</i>	-	-	-
Otu0111	Uncultured <i>Hydrogenophilus</i> sp.	-	-	-
Otu0112	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	-	-	-
Otu0113	Uncultured <i>gamma proteobacterium</i>	-	-	-
Otu0114	Uncultured <i>Enhydrobacter</i>	-	N.e.a.	1
Otu0115	<i>Duganella</i> sp.	-	-	-
Otu0116	Uncultured <i>Lactobacillales</i>	-	-	-
Otu0117	<i>Rhodanobacter</i> sp.	-	RZ	4;
Otu0118	Uncultured <i>Deinococcaceae</i>	-	-	-
Otu0119	Uncultured <i>Desulfobulbaceae</i>	-	-	-

OTUs	Gênero/espécie	Função descrita na literatura	Tecidos de cana-de-açúcar onde já foram reportadas	Referencias
Otu0120	<i>Comamonas jiangduensis</i>	-	-	-
Otu0121	<i>Streptococcus intermedius</i>	-	-	1
Otu0122	Uncultured <i>Acidobacteria</i>	-	-	-
Otu0123	Uncultured <i>gamma proteobacterium</i>	-	-	-
Otu0124	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	-	-	1
Otu0125	Uncultured <i>bacterium</i>	-	-	-
Otu0126	Uncultured <i>Sulfurovum</i>	-	-	-
Otu0127	<i>Sphingomonas</i> sp.	FBN; PCP; PFH	RZ; CO;	1; 4; 5; 6; 7
Otu0128	Uncultured <i>Rhizobiales</i>	-	-	-
Otu0129	<i>Janibacter</i> sp.	PCP	-	66
Otu0130	Uncultured <i>organism</i>	-	-	-
Otu0131	<i>Veillonella</i> sp.	-	-	-
Otu0132	Uncultured <i>Chthoniobacterales</i>	-	-	-
Otu0133	Uncultured <i>Labrys</i>	-	N.e.a.	1
Otu0134	Uncultured <i>delta proteobacterium</i>	-	-	-
Otu0135	<i>Propionibacterium acnes</i>	-	N.e.a.	1
Otu0136	<i>Dietzia</i> sp.	-	-	-
Otu0137	Uncultured <i>Alteromonadaceae</i>	-	-	-
Otu0138	<i>Sphingomonas</i> sp.	FBN; PCP; PFH	RZ; CO;	1; 4; 5; 6; 7
Otu0139	Uncultured <i>candidate division OP3</i>	-	-	-
Otu0140	Uncultured <i>Verrucomicrobia</i>	-	-	-
Otu0141	Uncultured <i>Rheinheimera</i> sp.	-	-	-
Otu0142	Uncultured <i>Caulobacter</i> sp.	PFH; SFO; ACD; FBN	RZ; CO; FA	1; 32; 33
Otu0143	Uncultured <i>Actinomyces</i> sp.	-	N.e.a.	1
Otu0144	Uncultured <i>Actinomyces</i> sp.	-	N.e.a.	1

Legendas: FBN = Fixação Biológica de Nitrogênio; PCP = Proteção Contra Patógeno; PFH = Produção de Fitohormônios; SFO = Solubilização de Fosfato; ACD = 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase; PSI = Produção de Sideróforos; SMP = Solubilização de Metais Pesados; N.e.a = Não especificado pelos autores, mas utilizando tecidos de cana-de-açúcar; RZ = Raiz; CO = Colmo; FA = Folha

Referências (Anexo B)

1. Souza RSC de, Okura VK, Armanhi JSL, et al. (2016) Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Sci Rep* 1–15. doi: 10.1038/srep28774
2. Muangthong A, Youpensuk S, Rerkasem B (2015) Isolation and characterisation of endophytic nitrogen fixing bacteria in sugarcane. *Trop Life Sci Res* 26:41–51.
3. Hahm M-S, Sumayo M, Hwang Y-J, et al. (2012) Biological control and plant growth promoting capacity of rhizobacteria on pepper under greenhouse and field conditions. *J Microbiol* 50:380–385. doi: 10.1007/s12275-012-1477-y
4. Beneduzi A, Moreira F, Costa PB, et al. (2013) Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Appl Soil Ecol* 63:94–104. doi: 10.1016/j.apsoil.2012.08.010
5. Innerebner G, Knief C, Vorholt JA (2011) Protection of *Arabidopsis thaliana* against Leaf-Pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* Strains in a Controlled Model System. *Appl Environ Microbiol* 77:3202–3210. doi: 10.1128/AEM.00133-11

6. Videira SS, De Araujo JLSS, Da Silva Rodrigues L, et al. (2009) Occurrence and diversity of nitrogen-fixing Sphingomonas bacteria associated with rice plants grown in Brazil. *FEMS Microbiol Lett* 293:11–19. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01475.x
7. Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Netrusov AI (2005) Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology* 74:46–53. doi: 10.1007/s11021-005-0027-6
8. Ventorino V, Sannino F, Piccolo A, et al. (2014) *Methylobacterium populi* VP2: Plant Growth-Promoting Bacterium Isolated from a Highly Polluted Environment for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Biodegradation. *Sci World J* 2014:1–11. doi: 10.1155/2014/931793
9. Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kang B-G, et al. (2010) Effect of co-inoculation of methylotrophic *Methylobacterium oryzae* with *Azospirillum brasilense* and *Burkholderia pyrrocinia* on the growth and nutrient uptake of tomato, red pepper and rice. *Plant Soil* 328:71–82. doi: 10.1007/s11104-009-0083-1
10. Fedorov DN, Ekimova GA, Doronina N V, et al. (2013) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminases from *Methylobacterium radiotolerans* and *Methylobacterium nodulans* with higher specificity for ACC. *FEMS Microbiol Lett* 343:70–6. doi: 10.1111/1574-6968.12133
11. Dedysh SN, Ricke P, Liesack W (2004) NifH and NifD phylogenies: an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. *Microbiology* 150:1301–1313. doi: 10.1099/mic.0.26585-0
12. Rouws LFM, Leite J, de Matos GF, et al. (2014) Endophytic Bradyrhizobium spp. isolates from sugarcane obtained through different culture strategies. *Environ Microbiol Rep* 6:354–363. doi: 10.1111/1758-2229.12122
13. Abd-Alla MH (1994) Solubilization of rock phosphates by Rhizobium and Bradyrhizobium. *Folia Microbiol (Praha)* 39:53–56. doi: 10.1007/BF02814530
14. Deshwal VK, Pandey P, Kang SC, Maheshwari DK (2003) Rhizobia as a biological control agent against soil borne plant pathogenic fungi. *Indian J Exp Biol* 41:1160–4.
15. Duhan JS, Dudeja SS, Khurana AL (1998) Siderophore production in relation to N₂ fixation and iron uptake in pigeon pea-Rhizobium symbiosis. *Folia Microbiol (Praha)* 43:421–426. doi: 10.1007/BF02818585
16. Dary M, Chamber-Pérez MA, Palomares AJ, Pajuelo E (2010) “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J Hazard Mater* 177:323–330. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.12.035
17. Velázquez E, Rojas M, Lorite MJ, et al. (2008) Genetic diversity of endophytic bacteria which could be found in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem of healthy sugarcane plants. *J Basic Microbiol* 48:118–124. doi: 10.1002/jobm.200700161
18. Farokh RZ, Sachdev D, Pour NK, et al. (2011) Characterization of plant-growth-promoting traits of Acinetobacter species isolated from rhizosphere of Pennisetum glaucum. *J Microbiol Biotechnol* 21:556–566. doi: 10.4014/jmb.1012.12006
19. Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M, Sa TM (2008) Characterization of Plant Growth-Promoting Traits of Bacteria Isolated from Larval Guts of Diamondback Moth Plutella xylostella (Lepidoptera: Plutellidae). *Curr Microbiol* 56:327–333. doi: 10.1007/s00284-007-9086-4
20. Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, et al. (2008) Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil* 304:35–44. doi: 10.1007/s11104-007-9517-9
21. Yuan C-L, Mou C-X, Wu W-L, Guo Y-B (2011) Effect of different fertilization treatments on indole-3-acetic acid producing bacteria in soil. *J Soils Sediments* 11:322–329. doi: 10.1007/s11368-010-0315-2
22. Çakmakçı R, Erat M, Erdoğan Ü, Dönmez MF (2007) The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. *J Plant Nutr Soil Sci* 170:288–295. doi: 10.1002/jpln.200625105
23. Rajkumar M, Nagendran R, Lee KJ, et al. (2006) Influence of plant growth promoting bacteria and Cr⁶⁺ on the growth of Indian mustard. *Chemosphere* 62:741–748. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.04.117
24. Tank N, Saraf M (2003) Phosphate solubilization, exopolysaccharide production and indole acetic acid secretion by rhizobacteria isolated from *Trigonella foenum-graecum*. *Indian J Microbiol* 43:37–40.
25. Van Antwerpen T, Rutherford RS, Vogel JL (2002) Assessment of sugarcane endophytic bacteria and rhizospheric burkholderia species as antifungal agents. *Proc S Afr Sug Technol Ass*
26. Pimentel JP, Olivares F, Pitard RM, et al. (1991) Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil* 137:61–65. doi: 10.1007/BF02187433
27. Pandey A, Trivedi P, Kumar B, Palni LMS (2006) Characterization of a Phosphate Solubilizing and Antagonistic Strain of *Pseudomonas putida* (B0) Isolated from a Sub-Alpine Location in the Indian Central Himalaya. *Curr Microbiol* 53:102–107. doi: 10.1007/s00284-006-4590-5
28. Tripathi M, Munot HP, Shouche Y, et al. (2005) Isolation and functional characterization of siderophore-producing lead- and cadmium-resistant *Pseudomonas putida* KNP9. *Curr Microbiol* 50:233–237. doi: 10.1007/s00284-004-4459-4

29. Bhojiya A, Joshi H (2016) Study of Potential Plant Growth-Promoting Activities and Heavy Metal Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* HMR16 Isolated from Zawar, Udaipur, India. *Curr Trends Biotechnol* 10:161.
30. Lee K-H, Koh R-H, Song H-G (2008) Enhancement of growth and yield of tomato by *Rhodopseudomonas* sp. under greenhouse conditions. *J Microbiol* 46:641–646. doi: 10.1007/s12275-008-0159-2
31. Ali A, Saleem Haider M, Mushtaq S, et al. (2012) In vitro, controlling the establishment of *Xanthomonas campestris* with different bacterial bio-agents. *Glob Adv Res J Microbiol* 1:2315–5116.
32. Mehnaz S, Baig DN, Lazarovits G (2010) Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. *J Microbiol Biotechnol* 20:1614–1623. doi: 10.4014/jmb.1005.05014
33. Pepe O, Venterino V, Blaiotta G (2013) Dynamic of functional microbial groups during mesophilic composting of agro-industrial wastes and free-living (N₂)-fixing bacteria application. *Waste Manag* 33:1616–25. doi: 10.1016/j.wasman.2013.03.025
34. Yadav AN, Sachan SG, Verma P, et al. (2015) Culturable diversity and functional annotation of psychrotrophic bacteria from cold desert of Leh Ladakh (India). *World J Microbiol Biotechnol* 31:95–108. doi: 10.1007/s11274-014-1768-z
35. Singh AV, Chandra R, Goel R (2013) Phosphate solubilization by *Chryseobacterium* sp. and their combined effect with N and P fertilizers on plant growth promotion. *Arch Agron Soil Sci* 59:641–651. doi: 10.1080/03650340.2012.664767
36. Wani PA, Khan MS, Zaidi A (2007) Synergistic effects of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field-grown chickpea. *J Plant Nutr Soil Sci* 170:283–287. doi: 10.1002/jpln.200620602
37. Bangash N, Khalid A, Mahmood T, Siddique MT (2013) Screening rhizobacteria containing acc - deaminase for growth promotion of wheat under water stress. *Pak J Bot* 45:91–96.
38. Griffiths GL, Sigel SP, Payne SM, Neilands JB (1984) Vibriobactin, a siderophore from *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* 259:383–385. doi: VL - 259
39. Murugappan RM, Aravindh A, Karthikeyan M (2011) Chemical and structural characterization of hydroxamate siderophore produced by marine *Vibrio harveyi*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:265–273. doi: 10.1007/s10295-010-0769-7
40. Okuyama H, Owada T, Ichinose N (2006) Root nodule bacteria having enhanced nitrogen-fixation ability. *US Pat. App.* 11/503,954
41. Belimov AA, Hontzeas N, Safronova VI, et al. (2005) Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biol Biochem* 37:241–250. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.07.033
42. Pati BR, Chandra AK (1993) Diazotrophic bacterial population and other associated organisms on the phyllosphere of some crop plants. *Zentralbl Mikrobiol* 148:392–402. doi: 10.1016/s0232-4393(11)80304-5
43. Beneduzi A, Peres D, Vargas LK, et al. (2008) Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Gene*. doi: 10.1016/j.apsoil.2008.01.006
44. Gutierrez-Manero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A n, et al. (2001) The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plant* 111:206–211. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x
45. Cazorla FM, Romero D, Pérez-García A, et al. (2007) Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. *J Appl Microbiol* 103:1950–1959. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03433.x
46. Yadav AN, Sachan SG, Verma P, Saxena AK (2016) Bioprospecting of plant growth promoting psychrotrophic Bacilli from the cold desert of north western Indian Himalayas. *Indian J Exp Biol* 54:142–150.
47. Mayak S, Tirosch T, Glick BR (2004) Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol Biochem* 42:565–572. doi: 10.1016/j.plaphy.2004.05.009
48. Ma Y, Rajkumar M, Freitas H (2009) Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *J Environ Manage* 90:831–837. doi: 10.1016/j.jenvman.2008.01.014
49. Zhou G, Wang Y, Ma Y, et al. (2014) The metabolism of neonicotinoid insecticide thiamethoxam by soil enrichment cultures, and the bacterial diversity and plant growth- promoting properties of the cultured isolates. *J Environ Sci Heal Part B* 49:381–390. doi: 10.1080/03601234.2014.894761
50. de Oliveira ZM, Floh EIS, Ferrara FIS, Barbosa HR (2011) Diazotrophic rhizobacteria isolated from sugarcane can release amino acids in a synthetic culture medium. *Biol Fertil Soils* 47:957–962. doi: 10.1007/s00374-011-0557-1
51. Caballero-Mellado J, Martínez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Santos PE los (2004) *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1165–1172. doi: 10.1099/ijs.0.02951-0

52. Luvizotto DM, Marcon J, Andreote FD, et al. (2010) Genetic diversity and plant-growth related features of Burkholderia spp. from sugarcane roots. *World J Microbiol Biotechnol* 26:1829–1836. doi: 10.1007/s11274-010-0364-0
53. Yu X, Liu X, Zhu T-H, et al. (2012) Co-inoculation with phosphate-solubilizing and nitrogen-fixing bacteria on solubilization of rock phosphate and their effect on growth promotion and nutrient uptake by walnut. *Eur J Soil Biol* 50:112–117. doi: 10.1016/j.ejsobi.2012.01.004
54. Getenga Z, Dörfler U, Iwobi A, et al. (2009) Atrazine and terbuthylazine mineralization by an *Arthrobacter* sp. isolated from a sugarcane-cultivated soil in Kenya. *Chemosphere* 77:534–539. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.07.031
55. Inui-Kishi RN, Kishi LT, Picchi SC, et al. (2012) Phosphorus solubilizing and iaa production activities in plant growth promoting rhizobacteria from brazilian soils under sugarcane cultivation. *ARPJ Eng Appl Sci* 7:1446–1454.
56. Wang Q, Chen L, He L-Y, Sheng X-F (2016) Increased biomass and reduced heavy metal accumulation of edible tissues of vegetable crops in the presence of plant growth-promoting *Neorhizobium huautlense* T1-17 and biochar. *Agric Ecosyst Environ* 228:9–18. doi: 10.1016/j.agee.2016.05.006
57. Chen L, He L, Wang Q, Sheng X (2016) Synergistic effects of plant growth-promoting *Neorhizobium huautlense* T1-17 and immobilizers on the growth and heavy metal accumulation of edible tissues of hot pepper. *J Hazard Mater* 312:123–131. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.03.042
58. Bertrand H, Nalin R, Bally R, Cleyet-Marel J-C (2001) Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biol Fertil Soils* 33:152–156. doi: 10.1007/s003740000305
59. Rojas A, Holguin G, Glick BR, et al. (2001) Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N(2)-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 35:181–187. doi: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00802.x
60. Su-Jin L, Sang-Eun L, Keyung-Jo S, et al. (2006) Plant Growth-Promoting Capabilities of Diazotrophs from Wild Gramineous Crops. *Microbiol Biotechnol Lett* 34:78–82.
61. Bastián F, Cohen A, Piccoli P, et al. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul* 24:7–11. doi: 10.1023/A:1005964031159
62. Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, et al. (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biol Fertil Soils* 21:197–200. doi: 10.1007/BF00335935
63. Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L, Dobereiner J (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 36:86–93. doi: 10.1099/00207713-36-1-86
64. Pedrosa FO, Monteiro RA, Wasseem R, et al. (2011) Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. *PLoS Genet* 7:e1002064. doi: 10.1371/journal.pgen.1002064
65. Morgado González A, Espinosa Victoria D, Gómez Merino FC, et al. (2015) Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in sugarcane. *Terra Latinoam* 33:321–330.
66. Achari GA, Ramesh R, Achari GA, Ramesh R (2014) Diversity, biocontrol, and plant growth promoting abilities of xylem residing bacteria from solanaceous crops. *Int J Microbiol* 2014:296521. doi: 10.1155/2014/296521

Anexo C – Compilação de dados de gêneros isolados/detectados em tecidos de cana-de-Açúcar

Gêneros deste e dos trabalhos anteriores	Frequência	Gêneros com frequência ≥ 3	Número de OTUs presentes neste estudo	Percentagem dos gêneros mais presentes em outros trabalhos detectados neste estudo (%)
<i>Acetobacter</i>	1	<i>Achromobacter</i>	1	16,0
<i>Achromobacter</i>	3	<i>Acinetobacter</i>	3	
<i>Acidisoma</i>	1	<i>Azospirillum</i>	0	
<i>Acidocella</i>	1	<i>Bacillus</i>	2	
<i>Acidovorax</i>	1	<i>Bosea</i>	1	
<i>Acinetobacter</i>	3	<i>Burkholderia</i>	1	
<i>Actinoallomurus</i>	1	<i>Caulobacter</i>	2	
<i>Actinomadura</i>	1	<i>Citrobacter</i>	0	
<i>Actinomyces</i>	1	<i>Dyadobacter</i>	0	
<i>Actinoplanes</i>	1	<i>Enterobacter</i>	0	
<i>Actinopolymorpha</i>	1	<i>Klebsiella</i>	0	
<i>Afifella</i>	1	<i>Microbacterium</i>	0	
<i>Agrobacterium</i>	2	<i>Novosphingobium</i>	1	
<i>Alcaligenes</i>	1	<i>Ochrobactrum</i>	1	
<i>Alicyclobacillus</i>	1	<i>Paenibacillus</i>	0	
<i>Ammoniphilus</i>	1	<i>Pantoea</i>	0	
<i>Amycolatopsis</i>	1	<i>Pseudomonas</i>	3	
<i>Ancylobacter</i>	1	<i>Rhizobium</i>	1	
<i>Aquicella</i>	1	<i>Sphingomonas</i>	5	
<i>Arthrobacter</i>	2	<i>Stenotrophomonas</i>	2	
<i>Arthrospira</i>	1	<i>Streptomyces</i>	0	
<i>Asaia</i>	1	<i>Xanthomonas</i>	0	
<i>Asteroleplasma</i>	1	<i>Total</i>	23	
<i>Asticcacaulis</i>	2			
<i>Azorhizobium</i>	1			
<i>Azospirillum</i>	4			
<i>Azovibrio</i>	1			
<i>Bacillus</i>	3			
<i>Bacteroides</i>	1			
<i>Balneimonas</i>	1			
<i>Bdellovibrio</i>	1			
<i>Beijerinckia</i>	1			
<i>Blastochloris</i>	1			
<i>Blastomonas</i>	1			
<i>Bordetella</i>	1			
<i>Bosea</i>	3			

Gêneros deste e dos trabalhos anteriores	Frequência	Gêneros com frequência ≥ 3	Número de OTUs presentes neste estudo	Percentagem dos gêneros mais presentes em outros trabalhos detectados neste estudo (%)
<i>Bradyrhizobium</i>	2			
<i>Burkholderia</i>	6			
<i>Catellatospora</i>	1			
<i>Caulobacter</i>	3			
<i>Cellvibrio</i>	1			
<i>Chitinophaga</i>	2			
<i>Chondromyces</i>	1			
<i>Chromobacterium</i>	1			
<i>Chryseobacterium</i>	1			
<i>Chthoniobacter</i>	1			
<i>Citrobacter</i>	3			
<i>Cloacibacterium</i>	1			
<i>Clostridium</i>	1			
<i>Cohnella</i>	1			
<i>Collimonas</i>	1			
<i>Corynebacterium</i>	1			
<i>Crocinitomix</i>	1			
<i>Cryocola</i>	1			
<i>Cupriavidus</i>	1			
<i>Curtobacterium</i>	2			
<i>Curvibacter</i>	1			
<i>Cytophaga</i>	1			
<i>DA101</i>	1			
<i>Dactylosporangium</i>	1			
<i>Dechloromonas</i>	1			
<i>Delftia</i>	1			
<i>Devosia</i>	1			
<i>Dokdonella</i>	2			
<i>Dyadobacter</i>	3			
<i>Dyella</i>	2			
<i>Edaphobacter</i>	1			
<i>Emticicia</i>	1			
<i>Enhydrobacter</i>	1			
<i>Ensifer</i>	1			
<i>Enterobacter</i>	7			
<i>Enterobacteriaceae</i>	1			
<i>Erwinia</i>	1			
<i>Escherichia</i>	2			
<i>Filimonas</i>	1			
<i>Fimbriimonas</i>	1			

Gêneros deste e dos trabalhos anteriores	Frequência	Gêneros com frequência ≥ 3	Número de OTUs presentes neste estudo	Percentagem dos gêneros mais presentes em outros trabalhos detectados neste estudo (%)
<i>Flavisolibacter</i>	1			
<i>Flavobacterium</i>	2			
<i>Fluviicola</i>	1			
<i>Gemmata</i>	1			
<i>Geobacter</i>	1			
<i>Geodermatophilus</i>	1			
<i>Geothrix</i>	1			
<i>Gluconacetobacter</i>	2			
<i>Gluconobacter</i>	1			
<i>Glycomyces</i>	1			
<i>Gordonia</i>	1			
<i>Haemophilus</i>	1			
<i>Herbaspirillum</i>	2			
<i>heteroC45_4W</i>	1			
<i>Hylemonella</i>	1			
<i>Hyphomicrobium</i>	2			
<i>Iamia</i>	1			
<i>Inquilingus</i>	2			
<i>Janthinobacterium</i>	1			
<i>Kaistia</i>	2			
<i>Kaistobacter</i>	1			
<i>Kibdelosporangium</i>	1			
<i>Klebsiella</i>	5			
<i>Kribbella</i>	1			
<i>Labrys</i>	1			
<i>Lactococcus</i>	1			
<i>Legionella</i>	1			
<i>Leptothrix</i>	1			
<i>Leuconostoc</i>	1			
<i>Listeria</i>	1			
<i>Luteibacter</i>	1			
<i>Luteimonas</i>	1			
<i>Luteolibacter</i>	1			
<i>Lysobacter</i>	2			
<i>Mesorhizobium</i>	2			
<i>Methylibium</i>	1			
<i>Methylobacterium</i>	2			
<i>Microbacterium</i>	4			
<i>Mucilaginibacter</i>	1			
<i>Mycobacterium</i>	2			

Gêneros deste e dos trabalhos anteriores	Frequência	Gêneros com frequência ≥ 3	Número de OTUs presentes neste estudo	Percentagem dos gêneros mais presentes em outros trabalhos detectados neste estudo (%)
<i>Mycoplana</i>	1			
<i>Mycoplasma</i>	1			
<i>Neisseria</i>	1			
<i>Nevskia</i>	1			
<i>Niastella</i>	1			
<i>Nitrospira</i>	1			
<i>Nocardia</i>	1			
<i>Nocardioides</i>	1			
<i>Novosphingobium</i>	3			
<i>Ochrobactrum</i>	3			
<i>Opitutus</i>	1			
<i>OR-59</i>	1			
<i>Paenibacillus</i>	3			
<i>Pandoraea</i>	1			
<i>Pannonibacter</i>	1			
<i>Pantoea</i>	4			
<i>Paracoccus</i>	1			
<i>Parvibaculum</i>	1			
<i>Pedobacter</i>	2			
<i>Pedomicrobium</i>	1			
<i>Pedosphaera</i>	1			
<i>Phaeospirillum</i>	1			
<i>Phenylobacterium</i>	1			
<i>Pigmentiphaga</i>	1			
<i>Pilimelia</i>	1			
<i>Pimelobacter</i>	1			
<i>Pirellula</i>	1			
<i>Planctomyces</i>	1			
<i>Plesiocystis</i>	1			
<i>Polaromonas</i>	1			
<i>Pontibacter</i>	1			
<i>Promicromonospora</i>	1			
<i>Propionibacterium</i>	1			
<i>Prostheco bacter</i>	1			
<i>Pseudomonas</i>	7			
<i>Pseudonocardia</i>	1			
<i>Pseudoxanthomonas</i>	1			
<i>Rahnella</i>	1			
<i>Ralstonia</i>	1			
<i>Rathayibacter</i>	1			

Gêneros deste e dos trabalhos anteriores	Frequência	Gêneros com frequência ≥ 3	Número de OTUs presentes neste estudo	Percentagem dos gêneros mais presentes em outros trabalhos detectados neste estudo (%)
<i>Rhanelia</i>	1			
<i>Rhizobium</i>	4			
<i>Rhodanobacter</i>	1			
<i>Rhodoferax</i>	1			
<i>Rhodoplanes</i>	1			
<i>Rickettsia</i>	1			
<i>Rickettsiella</i>	1			
<i>Rubrivivax</i>	1			
<i>Rubrobacter</i>	1			
<i>Saccharopolyspora</i>	1			
<i>Salinibacterium</i>	1			
<i>Salinispora</i>	1			
<i>Sediminibacterium</i>	1			
<i>Serratia</i>	1			
<i>Shinella</i>	2			
<i>Sinorhizobium</i>	2			
<i>Solirubrobacter</i>	1			
<i>Sphingobacterium</i>	2			
<i>Sphingobium</i>	2			
<i>Sphingomonas</i>	3			
<i>Sphingopyxis</i>	1			
<i>Spirochaeta</i>	1			
<i>Spirosoma</i>	1			
<i>Sporocytophaga</i>	1			
<i>Sporosarcina</i>	2			
<i>Staphylococcus</i>	2			
<i>Stenotrophomonas</i>	4			
<i>Steroidobacter</i>	1			
<i>Streptococcus</i>	1			
<i>Streptomyces</i>	3			
<i>Swaminathania</i>	1			
<i>Telmatospirillum</i>	1			
<i>Terriglobus</i>	1			
<i>Thermomonas</i>	1			
<i>Turneriella</i>	1			
<i>Uliginosibacterium</i>	1			
<i>Uncultured</i>	1			
<i>Variovorax</i>	2			
<i>Wolbachia</i>	1			
<i>Xanthobacter</i>	1			

Gêneros deste e dos trabalhos anteriores	Frequência	Gêneros com frequência ≥3	Número de OTUs presentes neste estudo	Percentagem dos gêneros mais presentes em outros trabalhos detectados neste estudo (%)
<i>Xanthomonas</i>	3			
<i>Yonghaparkia</i>	1			

Literatura consultada

1. Souza RSC de, Okura VK, Armanhi JSL, et al. (2016) Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Sci Rep* 1–15. doi: 10.1038/srep28774
2. Muangthong A, Youpensuk S, Rerkasem B (2015) Isolation and Characterisation of Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria in Sugarcane. *Trop life Sci Res* 26:41–51.
3. Rouws LFM, Leite J, de Matos GF, et al. (2014) Endophytic Bradyrhizobium spp. isolates from sugarcane obtained through different culture strategies. *Environ Microbiol Rep* 6:354–363. doi: 10.1111/1758-2229.12122
4. Beneduzi A, Moreira F, Costa PB, et al. (2013) Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Appl Soil Ecol* 63:94–104. doi: 10.1016/j.apsoil.2012.08.010
5. Magnani GS, Cruz LM, Weber H, et al. (2013) Culture-independent analysis of endophytic bacterial communities associated with Brazilian sugarcane. *Genet Mol Res* 12:4549–58. doi: 10.4238/2013.October.15.3
6. de Santi Ferrara FI, Oliveira ZM, Gonzales HHS, et al. (2012) Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugarcane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. *Plant Soil* 353:409–417. doi: 10.1007/s11104-011-1042-1
7. Taulé C, Mareque C, Barlocco C, et al. (2012) The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant Soil* 356:35–49. doi: 10.1007/s11104-011-1023-4
8. Mehnaz S, Baig DN, Lazarovits G (2010) Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in pakistan. *J Microbiol Biotechnol* 20:1614–1623. doi: 10.4014/jmb.1005.05014
9. Luvizotto DM, Marcon J, Andreote FD, et al. (2010) Genetic diversity and plant-growth related features of Burkholderia spp. from sugarcane roots. *World J Microbiol Biotechnol* 26:1829–1836. doi: 10.1007/s11274-010-0364-0
10. Mendes R, Pizzirani-Kleiner AA, Araujo WL, Raaijmakers JM (2007) Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of Burkholderia cepacia complex isolates. *Appl Environ Microbiol* 73:7259–67. doi: 10.1128/AEM.01222-07

Anexo D – Composição dos meios de cultivo utilizados

Nome	Composição (para 1000 mL)	pH	Referência
DYGS	2,0 g de glicose 2,0 g de ácido málico 1,5 g de peptona bacteriológica 2,0 g de extrato de levedura 0,5 g K_2HPO_4 0,5 g $MgSO_4 \cdot H_2O$ 1,5 g de ácido glutâmico 15 de Agar	6,0	(RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JR; VICTOR, 1986)
JMV	5,0 g de manitol 6 mL da solução 10 % de K_2HPO_4 18 mL da solução 10 % de KH_2PO_4 2 mL da solução 10 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 mL da solução 10 % de NaCl 2 mL da solução 1 % de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2 mL da solução 0,5 % de azul de bromotimol (0,2 N KOH) 4 mL da solução 1,64 % de FeEDTA 2 mL da sol. de micronutrientes para meio de cultura 1 mL da sol. de vitamina para meio de cultura 100 mg de extrato de levedura 25 g de Agar	5,4	(BALDANI; BALDANI; DÖBEREINER, 1996)
L9	8,8 g de $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ 3,0 g de KH_2PO_4 1,0 g de NH_4Cl 0,5 g de NaCl 0,2 g de $MgSO_4$ 1,0 g de glicose 1,0 g de glutamato de sódio 2,5 mL de solução de elementos traço 15 g de Agar	7,0	(YIM et al., 2010)
Solução de micronutrientes para meio de cultura			(BALDANI; BALDANI; DÖBEREINER, 1996)
200 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 235 mg de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 280 mg de H_3BO_3 , 8 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 24 mg de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ e q.s.p 200 mL de água destilada			
Solução de vitamina para meio de cultura			(BALDANI; BALDANI; DÖBEREINER, 1996)
10 mg de Biotina, 20 mg de Pyridoxol-HCl e q.s.p 100 mL de água destilada			
Solução de elementos traço			(YIM et al., 2010)
23 mg de $MnCl_2 \cdot 2H_2O$, 30 mg de $MnCl_4 \cdot H_2O$, 31 mg de H_3BO_3 , 36mg de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 mg de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 20 mg de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 30 mg de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 50 mg de $ZnCl_2$			

Anexo E – Classificação taxonômica de acordo com a maior similaridade encontrada nos bancos de dados SILVA e EzBioCloud para os genes 16S rRNA

Isolados representativos (código)	Grupos Box (>70%)	Número de Bases (pb)	SILVA (SINA)	Identidade (%)	EzBioCloud	Similaridade (%)
DYAPIAC4411	G1	1385	<i>Sphingomonas</i>	98	<i>Sphingomonas sanguinis</i> NBRC 13937 (BCTY01000091)	99,28
DYAPRB4422	G2	1379	<i>Sphingomonas</i>	99	<i>Sphingomonas sanguinis</i> NBRC 13937 (BCTY01000091)	99,71
DYAPIAC4402	G3	1384	<i>Sphingomonas</i>	99	<i>Sphingomonas sanguinis</i> NBRC 13937 (BCTY01000091)	99,78
DYAPIAC4408	G4	1373	<i>Sphingomonas</i>	99	<i>Sphingomonas aquatilis</i> JSS7 (AF131295)	97,59
DYAPRB4416	G5	1382	<i>Sphingomonas</i>	99	<i>Sphingomonas sanguinis</i> NBRC 13937 (BCTY01000091)	99,78
JMAPIAC4402	G6	1386	<i>Sphingomonas</i>	99	<i>Sphingomonas sanguinis</i> NBRC 13937 (BCTY01000091)	99,64
DYAPRB4435	G7	1383	<i>Sphingomonas</i>	99	<i>Sphingomonas melonis</i> DAPP-PG 224 (KB900605)	99,49
DYAPIAC4401		1389	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas yunnanensis</i> YIM 003 (AY894691)	99,06
DYAPIAC4407		1385	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas abaci</i> C42 (AJ575817)	99,64
DYAPIAC4409		1382	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas abaci</i> C42 (AJ575817)	99,42
DYAPIAC4410		1377	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas spermidinifaciens</i> 9NM-10 (JQ608324)	97,24
DYAPIAC4412		1382	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas panacis</i> DCY99 (CP014168)	98,7
DYAPIAC4414		1389	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas polyaromaticivorans</i> B2-7 (EF467848)	98,63
DYAPIAC4415		1388	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas kyeonggiensis</i> THG-DT81 (KC252615)	97,19
DYAPRB4417		1380	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas kyeonggiensis</i> THG-DT81 (KC252615)	97,71
DYAPRB4418		1391	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas yunnanensis</i> YIM 003 (AY894691)	98,91
DYAPRB4419		1387	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas yunnanensis</i> YIM 003 (AY894691)	98,99
DYAPRB4428		1349	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas kyungheensis</i> THG-B283 (JN196137)	100
DYAPRB4432		1353	<i>Sphingomonas</i>	98	<i>Sphingomonas kyungheensis</i> THG-B283 (JN196137)	100
DYAPRB4433		1393	<i>Sphingomonas</i>	98	<i>Sphingomonas sanguinis</i> NBRC 13937 (BCTY01000091)	99,64
DYAPRB4434		1367	<i>Sphingomonas</i>	99	<i>Sphingomonas trueperi</i> LMG 2142 (X97776)	99,63
DYAPRB4436		1378	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas pruni</i> NBRC 15498 (BCYZ01000050)	97,96
JMAPIAC4404		1379	<i>Sphingomonas</i>	98	<i>Sphingomonas melonis</i> DAPP-PG 224 (KB900605)	98,62
JMAPIAC4405		1371	<i>Sphingomonas</i>	98	<i>Sphingomonas melonis</i> DAPP-PG 224 (KB900605)	98,61
JMAPIAC4407		1418	<i>Burkholderia-Paraburkholderia</i>	100	<i>Burkholderia gladioli</i> NBRC 13700 (BBJG01000151)	99,5
JMAPRB4409		1389	<i>Sphingomonas</i>	98	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> NBRC 13935 (BBJS01000072)	99,06
JMAPRB4410		1385	<i>Sphingomonas</i>	98	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> GTC 868 (AB071955)	99,42
JMAPRB4413		1382	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas abaci</i> C42 (AJ575817)	99,42
JMAPRB4415		1391	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas melonis</i> DAPP-PG 224 (KB900605)	98,34
JMAPRB4416		1381	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas kyungheensis</i> THG-B283 (JN196137)	97,79
JMAPRB4417		1387	<i>Sphingomonas</i>	97	<i>Sphingomonas melonis</i> DAPP-PG 224 (KB900605)	97,61