

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA



UFAM

ESTUDO DA MICROBIOTA DA RIZOSFERA DO GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana*  
*Kunth var. sorbilis* (Mart.) Ducke) PELO SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rDNA

Manaus-AM  
Junho 2015

ELEN BETHLEEN DE SOUZA CARVALHO

ESTUDO DA MICROBIOTA DA RIZOSFERA DO GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana*  
Kunth *var. sorbilis* (Mart.) Ducke) PELO SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rDNA

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de  
Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade  
Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Doutora em Biotecnologia

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. José Odair Pereira

Manaus-AM

Junho 2015

ELEN BETHLEEN DE SOUZA CARVALHO

ESTUDO DA MICROBIOTA DA RIZOSFERA DO GUARANAZEIRO  
(*Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) PELO SEQUENCIAMENTO  
DO GENE 16S rDNA

---

Dr. José Odair Pereira (Orientador)/ UFAM

---

Dr. João Lúcio de Azevedo ESALQ/UFAM

---

Dr. Carlos Gustavo Nunes da Silva. UFAM

---

Dra. Andréa Ghelfi UFAM

---

Dr. José Ferreira da Silva UFAM

Manaus -AM

Junho 2015

*" O Senhor Deus estabeleceu o fantástico mecanismo Quorum Sensing.*

*Á Ele seja a honra e a glória"*

*Á Deus em primeiro lugar  
Á minha Família  
Á todos que não tiveram esta oportunidade*

*Ofereço*

*Aos Professores Dr. José Odair Pereira e Dr.Spartaco Astolfi Filho  
Vocês são um exemplo de integridade.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Á Deus onde tudo começa e termina.

Ao Prof. Dr. José Odair Pereira pela orientação, amizade e apoio em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho por mais esta oportunidade de aprendizado e "por não desistir de mim".

Ao Prof. Dr. José Ferreira da Silva pelo constante apoio e sugestões.

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pelas sugestões e por aceitar participar da Comissão Avaliadora.

Ao Dr. José das Neves Falcão pela amizade, conselhos e exemplo de integridade.

A Profa. Dra. Andréa Ghelfi com os seus conhecimentos de Bioinformática Á Enedina Nogueira Assunção, amiga em todos os momentos. A próxima doutora é você!

Aos Coordenadores do PPG Biotec: Prof. Dr. Carlos Gustavo e ao Prof. Dr. Edmar Vaz, pelo apoio e amizade.

A Dra. Eliana Fedberg e Dr. Jorge Porto meus primeiros orientadores na Iniciação Científica.

Aos Professores: Dr. Tristão Sócrates e Profa. Leny Louzada por incentivarem o meu retorno ao doutorado.

Á Grande Família: Efraim, meu esposo, um exemplo de paciência e bondade. Á mamãe Cleide, minha companheira incansável. As filhas e genros abençoados, Carlen e Fábio, Bianca e Alberlan. Á Ester, minha caçulinha, "agora terei mais tempo para conversarmos". Ao Esaú, o filho que ama Biologia Molecular e ao Juan, filho-neto, o nosso denguiho. Aos meus irmãos Ann, Perla e Frank, por tudo que passamos juntos. Aos familiares, eu sei que torceram por mim.

Ao grupo do metagenoma: Marelis, Henrique Belo, Rogério, Evelin e Lorena.

Á todos os amigos que fizeram parte desta conquista.

Á Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade na Graduação e Pós-Graduação.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e FAPPEAM pelo apoio para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A produção do guaraná na Região Amazônica enfrenta condições fitossanitárias desfavoráveis devido à presença da antracnose, uma doença causada pelo fungo *Colletotrichum* spp. Levando em consideração a dinâmica existente na interação planta-microrganismos realizou-se este estudo para identificar e verificar a riqueza e diversidade bacteriana associada à rizosfera de guaranazeiros com e sem sintomas da antracnose. Em Abril de 2011, foram coletadas na Fazenda da AMBEV, localizada no município de Maués-AM, rizosferas do guaranazeiro com e sem sintomas da antracnose. Realizou-se a extração do DNA genômico total das bactérias não cultiváveis presentes na rizosfera do guaranazeiro que apresentavam sintomas da doença e das assintomáticas. As bactérias foram identificadas por meio do sequenciamento do gene 16S rDNA utilizando-se como ferramenta molecular o pirosequenciamento e os recursos da bioinformática. Os resultados obtidos indicam que a rizosfera do guaranazeiro sadio é mais rica e diversa em relação ao guaranazeiro doente. O filo predominante foi o Bacteroidetes nas duas condições fisiológicas do guaranazeiro, seguido das Proteobactérias, Acidobactérias e Actinobactérias. Os gêneros predominantes acessados na rizosfera do guaranazeiro doente foram as *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Sphingobacterium* e em plantas sadias foram representados pelos *Rhizomicrobium*, *Acidicaldus*, *Sphingomonas* e *Rhodoplanes*. Os gêneros comuns à rizosfera do guaranazeiro doente e sadio foram representadas pelas *Pseudomonas*, *Taibaiella*, *Mucilaginibacter*, *Candidatus Koribacter*, *Granulicella* e *Acidothermus*. A presença do fungo *Colletotrichum* spp parece influenciar na composição da microbiota da rizosfera do guaranazeiro.

**Palavras-Chaves:** 16S rDNA, pirosequenciamento, guaranazeiro, antracnose, rizosfera

## ABSTRACT

The production of guarana in the Amazon region faces unfavorable phytosanitary conditions due to the presence of anthracnose, a disease caused by *Colletotrichum* spp. Taking into account the existing dynamics in plant-microorganism interaction took place this study to identify and verify the wealth and bacterial diversity associated with the rhizosphere of guarana with and without symptoms of anthracnose. April 2011 were collected at the Fazenda da AMBEV located in Maués-AM district, guarana the rhizospheres with and without symptoms of anthracnose. To extraction of genomic total DNA of bacteria uncultured present in the rhizosphere of guarana with symptoms of the disease and asymptomatic. The bacteria were identified by sequencing the 16S rDNA gene using as molecular tool the pyrosequencing and bioinformatics resources. The results indicate that the rhizosphere Sound guarana is richer and diverse in relation to the patient guarana. The predominant Filo was the *Bacteroidetes* in both physiological conditions of guarana, followed by *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Acidobactérias*. The predominant genera accessed in the rhizosphere of the patient guarana were *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Sphingobacterium* and healthy plants were represented by *Rhizomicrobium*, *Acidicaldus*, *Sphingomonas* and *Rhodoplanes*. Os common genres will rhizosphere of sick and healthy guarana were represented by *Pseudomonas*, *Taibaiella*, *Mucilaginibacter*, *Candidatus Koribacter*, *Granulicella* and *Acidothermus*. The presence of *Colletotrichum* spp appears to influence the composition of the microbiota rhizosphere of guarana.

**Key Words:** 16S rDNA, pyrosequencing, guarana, anthracnose, rhizosphera

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
2.1 GUARANAZEIRO .....	16
2.2 ANTRACNOSE .....	18
2.3 COMUNIDADES BACTERIANAS.....	20
2.4 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS UTILIZANDO-SE O GENE 16S rDNA COMO MARCADOR MOLECULAR.....	22
2.5 DIVERSIDADE E RIQUEZA.....	26
2.5.1 Ferramentas computacionais para análise da diversidade e riqueza utilizando-se o gene 16S rDNA.....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	32
4.1 COLETA DO MATERIAL.....	33
4.1.1 Local da Coleta.....	33
4.1.2 Coleta das amostras.....	33
4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SOLO.....	34
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO TOTAL.....	34
4.4 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S RDNA VIA PIROSSEQUENCIAMENTO.....	35
4.5 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA, ALINHAMENTO E FORMAÇÃO DAS UNIDADES TAXONÔMICAS DOS FRAGMENTOS DO GENE 16S rDNA.....	36
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS BASEADAS NAS UTOS.....	37
<b>5 RESULTADOS</b> .....	38
5.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO TOTAL.....	38
5.2 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S RDNA VIA PIROSSEQUENCIAMENTO.....	39
5.3. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA.....	41
5.3.1 Filos, Classes, Ordens .....	41
5.3.2 Famílias.....	44
5.3.3 Gêneros predominantes.....	46
5.3.3.1 Gêneros exclusivos em plantas doentes.....	46
5.3.3.2 Gêneros exclusivos em plantas saudáveis.....	48
5.3.3.3 Gêneros comuns aos dois tratamentos.....	48
5.4 DIVERSIDADE, RIQUEZA E RAREFAÇÃO.....	49
5.4.1 Análise da Riqueza.....	49
5.4.2 Curvas de rarefação.....	50
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64

## LISTA DE FIGURAS

NOME	PÁGINA
FIGURA 01	23
Árvore Filogenética Universal construída a partir da análise comparativa das sequências do gene 16S rDNA (WOESE, 2000).....	
FIGURA 02	24
Representação das regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA a partir do alinhamento de 4.383 sequências de estirpes tipo de bactérias (ASHELFORD et al., 2005).....	
FIGURA 03	25
(A) Frequência relativa dos filos e domínios utilizando quatro pares de primers diferentes (27F338R, 515F-806R, 804F-1392R, 926F-1392R) (B) agrupamento hierárquico (PEIFFER et al. 2013).....	
FIGURA 04	32
Desenho esquemático das etapas desenvolvidas.....	
FIGURA 05	33
Coleta das Rizosferas do guaranazeiro doente e sadio.....	
FIGURA 06	33
A) Guaranazeiro com antracnose (B) Guaranazeiro sem antracnose.....	
FIGURA 07	36
Desenho esquemático demonstrando as regiões V3-V4 do gene 16S rDNA e a região de anelamento dos oligonucleotídeos específicos.....	
FIGURA 08	38
Perfil eletroforético em gel de agarose 1%. Amostras 1 a 10- DNA total da rizosfera do guaranazeiro doente e 11 a 20- DNA total da rizosfera do guaranazeiro sadio.....	
FIGURA 09.	39
Eletroforese em gel de agarose 0,8% da purificação das amostras para o pirosequenciamento. Amostras: 1 – Marcador molecular 1kb. 2 e 3- Fragmento amplificado da região 16S rDNA da rizosfera do guaranazeiro doente e sadio. ....	
FIGURA 10	39
Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da amplificação do gene 16S rDNA. Amostras 1 a 5- rizosferas do guaranazeiro doente. Amostras 7 a 11 rizosferas do guaranazeiro sadio. Amostras 6 Marcador molecular de 1kb.....	

FIGURA 11	Qualidade das sequências geradas pelo programa FastQC. (A) Rizosfera de plantas sintomáticas. (B) Rizosfera plantas assintomática.....	40
FIGURA 12	Proporção dos Filos bacterianos encontrados em rizosfera de plantas saudas e doentes.....	41
FIGURA 13	Proporção das classes de bactérias encontradas na rizosfera do guaranazeiro doente e sadio.....	42
FIGURA 14	Proporção das Ordens de bactérias encontradas na rizosfera do guaranazeiro doente e sadio.....	43
FIGURA 15	Famílias predominantes em rizosfera do guaranazeiro doente e sadio.....	44
FIGURA 16	Famílias predominantes com seus respectivos gêneros em rizosfera do guaranazeiro doente e sadio.....	46
FIGURA 17	Gêneros predominantes nas rizosferas do guaranazeiro doente e sadio.....	47
FIGURA 18	Gêneros com frequência relativa $\leq 5\%$ .....	47
FIGURA 19	Diagrama de Venn para o índice de similaridade de 97%.....	50
FIGURA 20	Curvas de rarefação das amostras bacterianas da rizosfera do guaranazeiro doente e sadio.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>NOME</b>		<b>PÁGINA</b>
TABELA 01	Sequência dos oligonucleotídeos.....	35
TABELA 02	Gêneros presentes somente na rizosfera do guaranazeiro doente.....	48
TABELA 03	Gêneros presentes somente na rizosfera do guaranazeiro sadio.....	48
TABELA 04.	Gêneros comuns á rizosfera do guaranazeiro doente e sadio e suas respectivas Famílias e Filos.....	49
TABELA 05	Índices de riqueza e diversidade em rizosfera de guaranazeiro doente e sadio.....	59

## 1 INTRODUÇÃO

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) é uma planta nativa da Amazônia, utilizada em refrigerantes, produtos alimentícios, xarope, farmacêuticos e cosméticos. O Brasil é praticamente o único produtor de guaraná e atende ao mercado internacional e nacional.

No Amazonas o município de Maués é o principal produtor do guaraná. Estima-se que no referido município aproximadamente 2500 famílias cultivam o guaraná em 3.120 hectares. Entretanto, a cultura do guaranazeiro enfrenta condições fitossanitárias desfavoráveis e a produção tem diminuído significativamente devido a presença da antracnose, uma doença causada pelo fungo *Colletotrichum* spp.

A antracnose pode levar à redução de até 88% das plantações em condições de cultivo tradicional, o que inviabiliza aos produtores, a exploração do guaranazeiro como alternativa econômica (MILÉO et al., 2007).

Estudos relacionados com a interação *Colletotrichum*-hospedeiros são comuns na literatura, porém, sobre o patossistema *Colletotrichum* - guaranazeiro envolvendo os seus microrganismos endofíticos é incipiente (EMBRAPA, 2006).

Estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos e observa-se a existência de uma lacuna de conhecimento a ser preenchida em estudos de biodiversidade (PROSSER et al, 2007).

As observações realizadas com a comunidade microbiana da rizosfera demonstram que pode ocorrer variação em estrutura e composição de espécies em função do tipo de solo, espécie de plantas, estado nutricional, idade, estresse, doenças, dentre outros fatores ambientais (MAHAFEE; KLOPPER, 1997; GRIFFITHS et al., 1999). As interações raiz-microrganismos podem ocorrer em níveis que variam desde associações puramente comensais, passando pelas associações protooperativas e amensais, até as simbioses, que podem ser mutualísticas ou parasíticas.

O crescimento e atividade microbianos são intensos na rizosfera porque os compostos orgânicos liberados pelas raízes podem ser utilizados como fonte de energia e carbono. Aproximadamente cerca de 7 a 15% da superfície total das raízes é ocupada por estas células microbianas. As bactérias do solo formam um grupo de microrganismos que apresentam maior abundância e diversidade entre as espécies (BAREA et al., 2005).

Em meados da década de 1980 os estudos para classificação taxonômica bacteriana adotaram o gene 16S rDNA como marcador filogenético. No ano de 2002 o comitê de sistemática bacteriana sugeriu e incentivou a adoção de técnicas que utilizam o gene 16S rDNA para identificar e até mesmo classificar uma bactéria.

O método do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA permite avaliar a comunidade bacteriana em solo, água, sem a necessidade de isolar essas comunidades em cultura, pois utiliza técnicas de extração do DNA total o que favorece a caracterização das bactérias não cultiváveis em meios artificiais. Sendo assim, pretende-se neste estudo por meio das ferramentas moleculares, identificar a comunidade bacteriana presente na rizosfera do guaranazeiro de plantas com sintomas da antracnose e assintomáticas utilizando-se o gene codificador do RNA ribossômico.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 GUARANAZEIRO

O guaranazeiro, *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, é uma dicotiledônea que pertence à família Sapindaceae, com 140 gêneros e 2000 espécies distribuídas pela América tropical e subtropical. O gênero *Paullinia* apresenta 200 espécies. (GENTRY,1991; SOUZA;LORENZI,2008). A real origem e evolução do guaranazeiro ainda são discutidas, porém acredita-se que a guaranicultura tenha se propagado do alto Orenoco e alto Rio Negro (origens) para o baixo Rio Negro, onde se estabeleceu na região de Maués, a maior área de cultivo segundo Ducke, (1937). É uma planta genuinamente nativa do Amazonas, e desde a época pré-Colombiana, vem sendo usada como estimulante, afrodisíaco e tônico. As propriedades medicinais e estimulantes do guaranazeiro estão vinculadas à presença da cafeína natural, que compõe de 2,5 a 5% do peso seco do produto, valor superior ao encontrado no café (1 a 2%), mate (1%) e cacau (0,7%) (SCHIMPL, et al, 2013). Doses diárias de guaraná de 75 mg podem ser benéficas para o consumo humano, pois apresentam efeitos positivos para a memória e cognição, devido aos efeitos psicoativos vinculados à presença de saponinas e taninos que são fortes antioxidantes presentes na planta (CAMPOS et al., 2011).

O guaraná é produzido principalmente nos estados brasileiros do Amazonas e Bahia, e aproximadamente 70% da produção é utilizada pela indústria de bebidas não alcoólicas e de energia. Os outros 30% se torna guaraná em pó para consumo direto em cápsulas ou diluição em água, ou que serve como matéria-prima para as áreas farmacêutica e cosmética. Além da sua propriedade estimulante, o guaraná apresenta propriedades medicinais, é antitérmico, estimulante, analgésico e antigripal (TAVARES et al,2005).

Já havia registros do uso do guaraná por índios saterés-maues no século XVII, os primeiros habitantes do atual município de Maués. Os nativos usavam a semente para preparar uma bebida energética que conferia força e resistência aos índios. O termo guaraná originou da palavra indígena “varaná” ou “wara-ná” que significa “árvore que sobe apoiada em outra” (CAMPOS et al., 2011).

As condições que propiciam o bom desenvolvimento do guaranazeiro são: baixa altitude, clima quente e úmido com 85% de umidade relativa, 26°C de temperatura média anual e precipitação anual entre 1.500 e 2.000 mm (NASCIMENTO FILHO, 2003). Os solos

devem ser de terra firme, profundos, bem drenados, de textura média, topografia levemente ondulada e não sujeito a inundações, mas normalmente são quimicamente pobres. Os solos de baixa fertilidade e elevada acidez na Amazônia, o que limita a utilização para a agricultura (SANCHEZ et al., 1983). No cenário atual, o guaranzeiro pode ser utilizado em sistemas de SAF (sistema agroflorestal) por ser uma cultura de importância, e constituir um componente para cultivos múltiplos na região, podendo ser intercalado com fruteiras semiperenes, como o abacaxi e o maracujá ou perenes como a pupunha durante os três primeiros anos (NASCIMENTO FILHO, 2003).

O Brasil é praticamente o único produtor de guaraná e atende ao mercado internacional e nacional, sendo Maués a principal região produtora do estado do Amazonas. Em Maués existem aproximadamente 2500 famílias cultivando o guaraná em 3.120 hectares, fato que o torna um produto de grande importância, por conta de seu potencial econômico, social e ecológico, e principalmente por ser explorado por pequenas propriedades e também por ser uma atividade típica de agricultura familiar.

A obtenção de sementes manteve-se como atividade essencialmente extrativista até não mais de 40 anos atrás, entretanto, nos últimos anos a área de cultivo do guaranzeiro se expandiu além da fronteira amazônica e vêm apresentando ótimos resultados no cultivo comercial nos estados: Acre, Pará, Rondônia, Roraima, Bahia e Mato Grosso (NASCIMENTO FILHO, 2003).

No ano de 2013, a produção foi de 4,120 mil toneladas de guaraná em grãos no Brasil, sendo que no estado do Amazonas, a produção foi de 1,083 mil toneladas (26,9% da produção brasileira), enquanto que no estado da Bahia, a produção estimada é de 2,772 mil toneladas (66,4% da produção brasileira), superando a produção do guaraná amazonense (IBGE, 2013).

O diferencial da Bahia é devido à união de condições mais propícias ao desenvolvimento da planta, como: boa distribuição de chuvas ao longo do ano, solos com maior fertilidade e baixa incidência da antracnose, e além da utilização de técnicas básicas de cultivo que são pouco exploradas pelos seus concorrentes amazônicos. A principal razão da perda de produtividade da guaranicultura em Maués é devido à incidência da antracnose. Os plantios são feitos com mudas propagadas sexualmente (originárias de sementes de materiais genéticos não selecionados), o que torna o problema alarmante, pois, cerca de 80% das plantas sofrem infestações em níveis graves (NASCIMENTO FILHO, 2003).

Atualmente há indícios de um crescimento sustentável da produção de sementes de guaraná no Amazonas, como distribuição de mudas resistentes a doenças e de alta

produtividade e a implantação de projetos empresariais de cultivo que tendem a adotar padrões agrícolas tecnificados. O estudo realizado por Nascimento Filho, et al, (2009), que determinou parâmetros de adaptabilidade e estabilidade fenotípica aos clones do guaraná no Estado do Amazonas. Para isso, foi avaliado o desempenho produtivo dos clones pré-selecionados e foi observado que alguns apresentam ampla adaptabilidade e elevada estabilidade fenotípica e outros com adaptabilidade específica a ambientes favoráveis e desfavoráveis (NASCIMENTO-FILHO, et al., 2009).

A forma mais antiga de se comercializar o guaraná é em bastão, método desenvolvido pelos índios na região de Maués; após torrado, elimina-se o casquilho do grão e este é triturado e pilado ou somente pilado (artesanal) misturando-se com água, formando uma pasta consistente que é moldada na forma de bastão, conhecida por panificação. O bastão passa por um processo de desidratação, conhecido por defumação prolongada, o que consolidará o formato comercial. Na região, o bastão normalmente é ralado para ser transformado em pó e então é consumido (EMBRAPA, 2006). A comercialização do guaraná em rama (sementes torradas) é a maneira mais comum, utilizada na produção de xaropes e extratos de guaraná, mas também a de menor valor agregado.

Os produtores de guaraná em rama de Maués encaminham sua produção atualmente para quatro canais distintos de comercialização, e o principal é a venda para indústrias de bebidas, cujo consumo é de cerca de 70% da produção anual (EMBRAPA, 2006).

As exportações brasileiras do produto giram em torno de US\$ 15 milhões/ano, alcançando 175 países, dentre eles: Portugal, Espanha, Porto Rico e Japão. Acredita-se que 90% da produção total é absorvida pelo mercado interno, de uma produção total de 4 mil toneladas/ano (SANTOS, 2007). A Bahia produz o guaraná orgânico que é muito mais valorizado para a exportação, pesquisadores estimam o preço deste produto em torno de R\$ 20,00/Kg, sendo que o plantio tradicional está no patamar de R\$ 3,00 a R\$ 7,00 o quilo no Amazonas (SANTOS, 2007).

## 2.2 ANTRACNOSE

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloi*, é a doença mais severa do guaranázeiro [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.)], constituindo um dos fatores da baixa produtividade no município de Maués – AM. O gênero *Colletotrichum*, descrito por Albuquerque (1961) engloba espécies causadoras de doenças em diferentes hospedeiros, principalmente em clima tropical como a podridão de pedúnculo e varicela em manga,

abacate e mamão foi encontrado também em cereais, gramíneas, leguminosas, hortaliças e culturas perenes, incluindo as frutíferas como citros, milho, pepino, cajueiro e goiabeira, atacando partes abaixo do solo em todos os estágios de maturidade, de plântulas a árvores adultas até a semente (BAILEY; JEGGER, 1992). Acredita-se que alguns fatores como, a incidência de luz, temperatura e estresse no hospedeiro (causada por outros parasitas) possam estar relacionados ao grau de severidade da doença (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999). Quanto ao conhecimento sobre o patossistema *Colletotrichum* - guaranazeiro envolvendo seus microrganismos endofíticos, ainda é escasso (EMBRAPA, 2006).

As estratégias de invasão utilizadas pelo fungo nos tecidos de plantas são diversas e não apresentam especificidade em relação ao hospedeiro. Existe uma série de estruturas de infecção apresentadas por estes patógenos incluindo, tubos germinativos, apressórios, haustórios, hifas intracelulares necrotróficas secundárias e acérvulos (SILVA et al., 2006).

O processo de infecção ocorre pela germinação dos conídios do fungo dando origem a um apressório globoso de coloração marrom escuro. Há emissão de uma hifa de infecção que penetra na parede celular da epiderme da planta, dando origem a uma vesícula de infecção. A partir desse ponto, é possível a colonização, através da hifa primária de células adjacentes, dando origem às áreas necróticas no tecido (BENTES; MATSUOKA, 2002; SILVA et al., 2006).

O sintoma típico da doença é a presença de lesões arredondadas, necróticas, com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada, inviabilizando a comercialização do produto (SILVA et al., 2006).

O fungo *Colletotrichum* spp. pode ser encontrado tanto em guaranazeiros doentes assim como sadios, fato que indica a existência de fungos do gênero não danosos à planta ou a influência de condições favoráveis para a manifestação dos sintomas típicos da antracnose na planta (COSTA NETO, 2009).

O Brasil é o único produtor de guaraná em escala comercial no mundo, no estado do Amazonas, a infestação de plantas daninhas tem limitado a expansão do cultivo do guaraná por conta da forte interferência sobre a cultura (MÍLEO et al., 2007). Existe um efeito deletério de ação direta das plantas daninhas na produtividade do guaranazeiro elas hospedam microrganismos patogênicos para a cultura, servindo como hospedeiras secundárias (MÍLEO et al., 2007). A estação chuvosa favorece o aumento de plantas doentes, pois os propágulos do fungo produzidos na estação seca aumentam a quantidade de inóculos, ocasionando a alta incidência da doença (MÍLEO et al., 2007). Os sintomas no campo são variados, dificultando a sua quantificação, e se manifestam nos lançamentos dos ramos novos, cuja emissão

predomina na época chuvosa, que em Maués e municípios vizinhos (maior região produtora do Amazonas) corresponde ao período de março a junho, ocasião mais favorável à disseminação do agente causal da doença. Dessa forma, o período mais adequado para a avaliação da antracnose na região de Maués corresponde aos meses de abril e maio. Para outras regiões, a escolha da época de avaliação da doença fica condicionada à distribuição anual de chuvas (EMBRAPA,2006).

O controle de fungos fitopatogênicos (incluindo o gênero *Colletotrichum*) tem sido feito por meio da seleção de plantas com genótipos resistentes e pela aplicação de fungicidas, no entanto, seu uso indiscriminado pode afetar o equilíbrio entre microrganismos e ainda agravar a doença em certos cultivares, devido à redução da competição entre o patógeno e algum outro grupo ali presente (possivelmente relacionado ao controle da doença, naturalmente) (HEANEY et al., 2000).

### 2.3 COMUNIDADES BACTERIANAS

Os microrganismos são as formas de vida mais antiga, diversas e abundantes sobre a Terra, compreendendo larga porção da diversidade genética presente em diferentes ecossistemas. Apesar da alta diversidade, seu impacto sobre os processos ecológicos ainda é pouco entendido. Por exemplo, estimativas conservadoras sugerem que cerca de 20 mil espécies de plantas são completamente dependentes dos microrganismos simbiotes para o crescimento e sobrevivência em ecossistemas terrestres.

No solo os microrganismos são importantes reguladores da produtividade de plantas, especialmente em ecossistemas pobres em nutrientes, nos quais os simbiotes são responsáveis pela aquisição de micronutrientes para as plantas. Fungos associados a raízes (micorrízicos), bactérias fixadoras de nitrogênio e diferentes espécies de microrganismos de vida livre regulam de forma significativa o desenvolvimento e a produtividade de diferentes grupos de plantas, por meio da mineralização e/ou competição pelos nutrientes presentes no solo (Van Der HEIDJEN et al., 2008).

A comunidade de bactérias pode variar de acordo com o habitat em que se encontra: os gêneros de bactérias podem ser diferentes na rizosfera, solo e rizoplano (interface do solo com a epiderme da raiz). A colonização da rizosfera irá depender da habilidade da bactéria em utilizar os diferentes exsudatos radiculares; dessa forma, a variedade de compostos orgânicos

liberados pela planta é considerada por muitos autores como o principal fator responsável pela diversidade de microrganismos na rizosfera (COELHO, 2006).

A rizosfera desempenha importante papel nos ciclos dos nutrientes assim como na manutenção da saúde e estímulo do crescimento da planta. É uma região rica em nutrientes que incluem os exsudatos, as secreções e fragmentos celulares advindos da raiz, água, ácidos orgânicos, ácidos graxos, esteróis, fatores de crescimento, nucleosídeos, açúcares, aminoácidos e vitaminas. É a zona ao redor da raiz que se encontra sob influência do sistema radicular iniciando na superfície até uma distância de 1 a 3 mm (BAIS et al., 2006; BERG et al., 2005; FREITAS, 2007; KNOX, 2006; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; NEHL; SILVEIRA).

A ocorrência de grandes e rápidas variações, tais como: umidade, temperatura e disponibilidade de nutrientes podem ocasionar sensíveis alterações nas populações microbianas patogênicas e epifíticas da superfície foliar.

Os microrganismos epifíticos são definidos como aqueles que vivem e se reproduzem na superfície foliar, sendo que as bactérias são os habitantes mais abundantes dessa região. (LINDOW; BRANDL, 2003).

Os endófitos podem ser definidos como microrganismos que colonizam os tecidos internos da planta, sem causar danos aparentes ao hospedeiro e sem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO et al., 2000). Porém, essa definição excluía os rizóbios e micorrizas, sendo, portanto, redefinido este conceito com a separação dos endófitos em dois tipos: Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta, incluindo assim, rizóbios e micorrizas (MENDES; AZEVEDO, 2007). Além disso, vários estudos destacam as características benéficas que os microrganismos endofíticos conferem às plantas hospedeiras, como resistência às condições de estresse; alteração em propriedades fisiológicas; produção de fitohormônios e de outros componentes de interesse biológico (AZEVEDO et al., 2000; STROBEL et al., 2004).

A diversidade dos grupos microbianos presentes nos diferentes ecossistemas, principalmente nos tropicais, é praticamente desconhecida e, portanto, merece maior atenção e incentivo no que se refere aos estudos de biodiversidade, importância ecológica e aplicação biotecnológica.

Os microrganismos são considerados uma grande fonte de diversidade genética, porém pouco compreendida e explorada (PROSSER et al., 2007). Em uma mesma planta, a diversidade varia entre as populações microbianas, mesmo considerando-se uma pequena diferença de localização e/ou tempo (LINDOW; BRANDL, 2003).

Quanto aos microrganismos endofíticos, estima-se que das aproximadamente 300.000 espécies de plantas existentes no planeta, cada indivíduo destas espécies contenha um ou mais microrganismos endofíticos (STROBEL et al., 2004). Como poucas plantas já foram estudadas em relação à diversidade das comunidades bacterianas presentes, existem uma grande possibilidade de se encontrar microrganismos com potencial biotecnológico nunca antes explorado (RYAN et al., 2008).

Assim, a fração de diversidade dos grupos microbianos conhecidos e descritos representa uma pequena porção daquela existente na natureza (AZEVEDO, 1998). Entretanto, a evolução da biologia molecular aplicada ao estudo do meio ambiente tem contribuído significativamente no conhecimento da diversidade microbiana.

#### 2.4 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS UTILIZANDO-SE O GENE 16S rDNA COMO MARCADOR MOLECULAR

Nas últimas décadas, o campo da ecologia microbiana apresentou um progresso significativo graças ao desenvolvimento das técnicas de biologia molecular que permitem descrever e caracterizar a diversidade filogenética e funcional dos microrganismos. O acesso à diversidade da comunidade pode ser estudada por meio das técnicas de sequenciamento a partir das bactérias cultiváveis, sendo esta uma metodologia rotineira, mas de limitada aplicação, uma vez que são influenciadas por muitos fatores e subestimam a diversidade bacteriana (RASCHE et al, 2006; ANDREOTE et al., 2009).

A comparação das sequências de 16S rDNA é uma ferramenta eficiente para relações filogenéticas e evolutivas entre bactérias, arqueobactérias, e organismos eucarióticos (WOESE, 2000) (Figura 01).

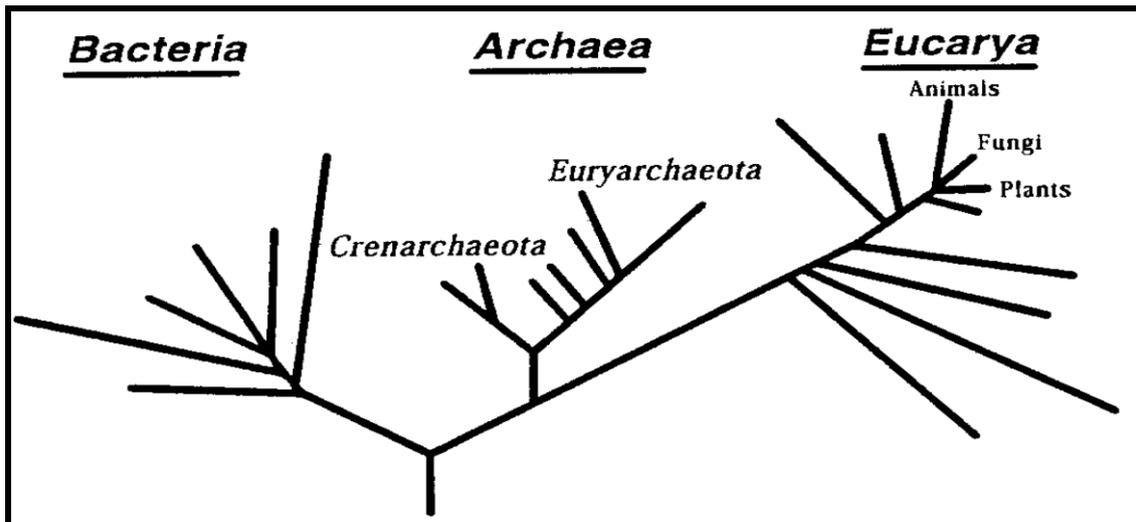


FIGURA 01. Árvore Filogenética Universal construída a partir da análise comparativa das sequências do gene 16S rDNA (WOESE, 2000).

O sequenciamento de genes 16S rDNA das comunidades bacterianas não cultiváveis, indicam que estudos para o conhecimento da diversidade microbiana ainda é incipiente devido a alta representatividade destes microrganismos nos ecossistemas (TRINGE; HUGENHOLTZ, 2008; PACE, 1997).

Um dos potenciais do gene 16S rRNA é fornecer identificação em nível de gênero e espécie para isolados de bactérias. Alguns resultados indicam que a sequência do gene 16S rRNA fornece identificação em nível de gênero na maioria dos casos (>90%), mas em nível menor para espécies (65 a 83%) (JANDA & ABBOTT, 2007)

As características peculiares do gene 16S rRNA o tornam como um marcador molecular ideal para caracterização das comunidades bacterianas. Primeiro, ele está presente em todos os procariotos. Em segundo lugar, o seu tamanho e elevado grau de conservação da sequência ao longo da evolução procariótica. Em terceiro lugar, e mais importante, o gene de rRNA 16S inclui tanto as regiões conservadas, bem como nove regiões hipervariáveis (V1-V9) conforme demonstrado na Figura 02, onde os picos são regiões conservadas e os vales regiões hipervariáveis e que podem ser eficazmente utilizado para a taxonomia bacteriana (HUGENHOLTZ, 2002).

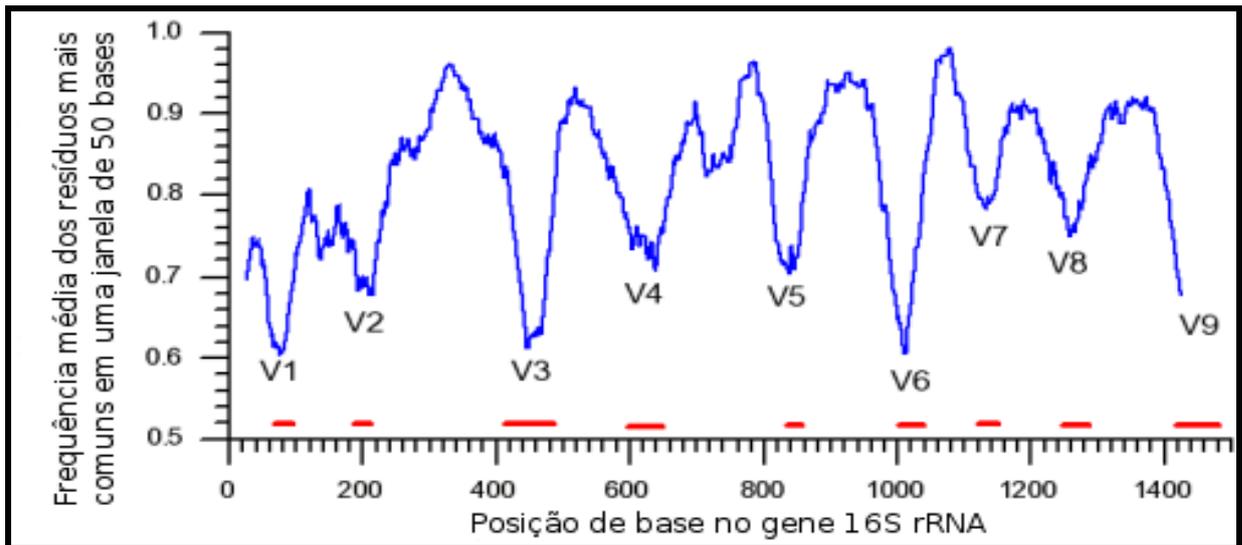


FIGURA 02. Representação das regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA a partir do alinhamento de 4.383 seqüências de estirpes tipo de bactérias (ASHELFORD et al., 2005).

Para a identificação de comunidades bacterianas utilizando-se o sequenciamento do gene 16S rDNA ocorra, é necessário que os oligonucleotídeos iniciadores desenhados sejam complementares a regiões conservadas dos grupos presentes na árvore filogenética não necessariamente complementares a todos aqueles que são representados nos bancos de dados (BAKER et al., 2003). Igualmente os oligonucleotídeos iniciadores universais devem ser específicos para o domínio em questão e complementares as seqüências de todos os organismos pertencentes a este domínio (BAKER et al., 2003).

O desenho de oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação deve ser feito considerando regiões conservadas. Baker e colaboradores (2003) propuseram que cerca de 10% das bases do gene 16S rRNA é conservada, considerando uma amostra de 500 seqüências de bactérias, mas a maior parte destas regiões não é contínua em todos os organismos, apresentando espaços (*gaps*) quando as seqüências são alinhadas. Desta forma, nenhum oligonucleotídeo iniciador possui homologia total com todas as bactérias (BAKER et al., 2003).

Os estudos realizados por PEIFFER e colaboradores (2013), utilizando quatro pares de iniciadores (oligonucleotídicos), que reconhecem e amplificam por PCR as regiões V1-V2, V3-V4, V5-V8 e V6-V8 do gene 16S rDNA dos microrganismos, presentes na rizosfera do milho e solo demonstraram que as regiões V3-V4 amplificadas com o par de primers 515F-806R proporcionam uma maior diversidade de filos quando comparada com as demais regiões hipervariáveis (Figura 03).

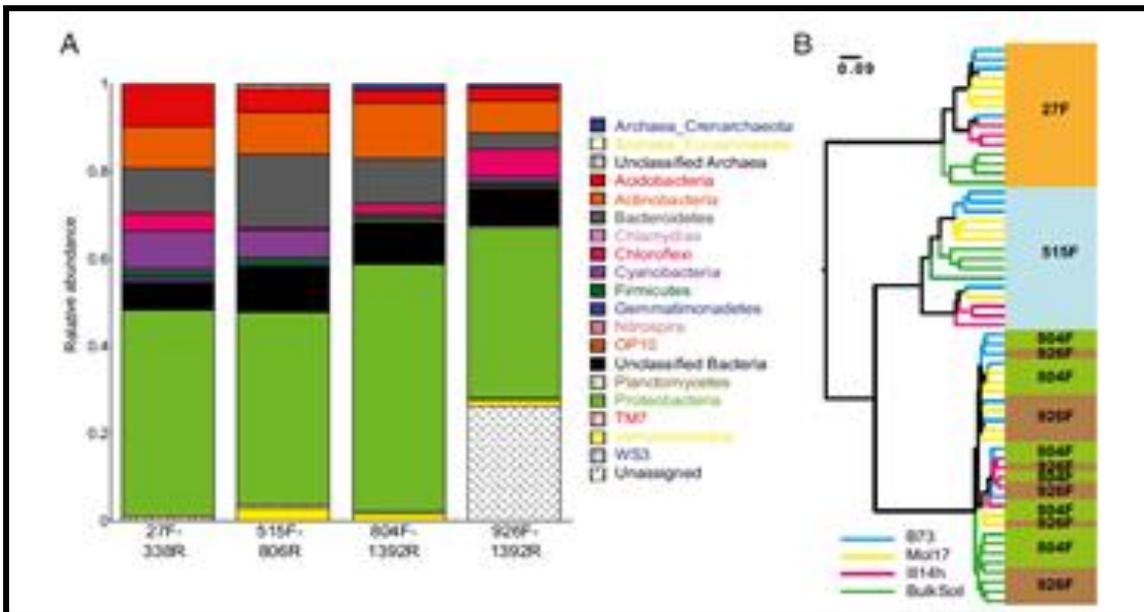


FIGURA 03. (A) Frequência relativa dos filos e domínios utilizando quatro pares de primers diferentes (27F338R, 515F-806R, 804F-1392R, 926F-1392R) (B) agrupamento hierárquico (PEIFFER et al. 2013)

Atualmente, técnicas mais sofisticadas e com grande poder de amostragem têm sido utilizadas para estudos de diversidade microbiana, como o pirosequenciamento. Esta técnica consiste na adição, em cada ciclo, de uma espécie de nucleotídeo, seguida da adição de substrato (luciferin, adenosina 5'-fosfosulfato) que geram luz onde houve incorporação do nucleotídeo, por último a apyrase remove os nucleotídeos que não foram incorporado e outro ciclo pode ser iniciado (SCHENDURE, 2008). Produtos de PCR do gene 16S são submetidos ao sequenciamento em larga escala em equipamentos 454 GS FLX. Dessa forma é possível 300.000 leituras (*reads*) de tamanhos de 200 a 300 pb com apenas uma corrida (SHENDURE; HANLEE, 2008). O avanço desses aparelhos é tão rápido que, atualmente é possível fazer mais de um milhão de *reads* de alta qualidade com tamanho médio de 1000 pb em apenas uma corrida (TEILING et al., 2012).

Os estudos realizados por ROSCH e colaboradores (2007), demonstraram que para diferentes solos, usando sequências de 16S rDNA geradas por pirosequenciamento, o número máximo de sequências únicas nunca excedeu 52.000. Entre as tecnologias de sequenciamento de DNA de nova geração, destaque é dado para o método de pirosequenciamento na análise da diversidade, principalmente devido ao comprimento da leitura que, atualmente pode chegar a 400-500pb.

## 2.5 DIVERSIDADE E RIQUEZA

O termo Diversidade Biológica ou Biodiversidade refere-se tanto ao número (riqueza) de diferentes categorias biológicas quanto à abundância relativa (equitabilidade) dessas categorias; e inclui variabilidade ao nível local (alfa diversidade), complementaridade biológica entre habitats (beta diversidade) e variabilidade entre paisagens (gama diversidade) ou seja inclui a totalidade dos recursos vivos, ou biológicos, e dos recursos genéticos, e seus componentes (DIAS, 2004).

O esforço amostral despendido e a própria natureza da comunidade são fatores que influenciam diretamente a riqueza e a diversidade de espécies, uma vez que o número de espécies altera de acordo com o aumento do número de indivíduos amostrados.

As curvas de acumulação de espécies (curvas do coletor) ou de rarefação permitem avaliar o quanto um estudo se aproxima de capturar todas as espécies do local. Quando a curva estabiliza, ou seja, nenhuma espécie nova é adicionada, significa que a riqueza total foi obtida. A partir disso, novas amostragens não são necessárias.

A estabilização da curva é difícil e medidas de riqueza de espécies que permitam estimar a riqueza a partir dos dados obtidos, ou comparar inventários entre diferentes áreas com diferentes unidades amostrais são bastante úteis (BARROS, 2009).

Os estimadores que se baseiam na riqueza das espécies raras compartilhadas entre grupos de amostras fazem também uso de alguns outros conceitos importantes: a) *singletons*, espécies com somente um indivíduo; b) *doubletons*, espécies com somente dois indivíduos; c) *uniques*, espécies que ocorrem em somente uma amostra; e d) *duplicates*, espécies que ocorrem em somente duas amostras (COLWELL, 2004; DIAS, 2004).

Um desafio enfrentado na análise da diversidade de bactérias e arqueas é a ausência de valores pré-determinados que possam ser usados na identificação das espécies. Infelizmente, nenhuma definição universal existe para identificação de espécies através do gene 16S rDNA (JANDA; ABBOTT, 2007).

Nos estudos de diversidade microbiana é utilizado o conceito de *Operational Taxonomic Units* (OTU), ou Unidade Taxonômica Operacional, ou ainda Filotipos (NUBEL et al., 1999; STACH et al., 2003). Estas unidades taxonômicas podem referir-se a qualquer nível taxonômico, requerendo apenas uma definição explícita dos seus limites. Por exemplo, identidade maior ou igual a 97% em um alinhamento de fragmentos do gene 16S rDNA, valor normalmente usado como uma aproximação para espécies. Similaridade maior ou igual a 95%, como uma aproximação para gênero é maior ou igual a 80% como uma aproximação para filo

(SCHLOSS e HANDELSMAN, 2005; BORNEMAM e TRIPLETT, 1997). O uso de OTU é apropriado para comparar a riqueza relativa quando sequências do gene 16S rRNA são avaliadas com a mesma região no gene (STACH et al., 2003).

Métodos paramétricos (assumem uma distribuição normal para os dados) e não-paramétricos (não assumem uma distribuição prévia) são utilizados para se medir a diversidade microbiana e tratam principalmente da riqueza de espécies, porém a abundância relativa deve também ser levada em conta (MAGURRAN, 1988). A topologia de árvores filogenéticas também é utilizada em análises da diversidade para mostrar a proximidade das sequências obtidas a partir de amostras ambientais com grupos taxonômicos conhecidos e também em alguns métodos que permitem comparar a estrutura de diferentes comunidades.

Métodos paramétricos como Lognormal (PRESTON, 1948), por exemplo são capazes de estimar a diversidade bacteriana a partir de pequenas amostras de indivíduos de um determinado ambiente, sendo ideal para estimar a imensa diversidade de microrganismo. Por outro lado, a primeira medida não paramétrica proposta por Simpson, (SIMPSON, 1949) e sugere que a diversidade era inversamente relatada pela probabilidade de que dois indivíduos escolhidos ao acaso pertencessem a mesma espécie de diversidade (KREBS, 1998). A medida mais popular de diversidade de espécies é o índice de Shannon, designado pela letra “H” (SHANNON e WEAVER, 1949). Esta medida é baseada na teoria da informação, sendo considerada uma medida da incerteza de que duas sequências pertençam a mesma OTUs. Quanto maior o valor de H’, maior a incerteza (KREBS, 1998).

Os métodos não paramétricos estimam a riqueza de espécies a partir de uma pequena amostra sem assumir um modelo em particular (HUGHES et al., 2001). A probabilidade de detectar uma OTU mais de uma vez será maior em amostras de comunidades menos diversas e menor em comunidades mais diversas (BOHANNAN e HUGHES, 2003). Um estimador não-paramétrico muito utilizado e o índice Chao1, particularmente apropriado para estimar a diversidade de comunidades microbianas (CHAO, 1987; BREITBART et al., 2002). A maior parte dos dados sobre diversidade microbiana disponíveis atualmente são moleculares, geralmente de genes ribossomais. Uma estimativa que pode ser feita pelo método da rarefação (SANDERS, 1968; SIMBERLOFF, 1972). Outros métodos são utilizados para estimar a riqueza de OTUs na comunidade, tais como o estimador Jackknife baseado na frequência observada de OTUs raras e o estimador Bootstrap definido por sub amostragens aleatórias do conjunto de OTUs, além de outros métodos não paramétricos, como o estimador *Abundance based Coverage Estimator* (ACE).

### 2.5.1 FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS PARA ANÁLISE DA DIVERSIDADE E RIQUEZA UTILIZANDO-SE O GENE 16S rDNA

Atualmente existem ferramentas para análise descritiva e comparativa de comunidades microbianas baseadas em técnicas independentes de cultivo, que usam sequências de DNA do gene 16S rDNA construídas a partir de fragmentos amplificados por PCR.

Usualmente as ferramentas para análise de qualidade e edição das sequências são necessárias, como PHRED (EWING & GREEN, 1998; EWING et al., 1998) e BioEdit (HALL, 1999). Muitas das análises posteriores e testes estatísticos partem das sequências alinhadas ou de matrizes de distância genética. Além disso, alguns métodos de análise utilizam árvores filogenéticas ou estas constituem uma forma de análise *per se*. Vários programas computacionais foram desenvolvidos para este fim, tais como: o Clustal (THOMPSON et al., 1994a; THOMPSON et al., 1994b), Infernal (NAWROCKI et al., 2009), NAST (De SANTIS et al., 2006), PHYLIP (FELSENSTEIN, 2005), ARB (LUDWIG et al., 2004) e MEGA (TAMURA et al., 2007).

Para verificar a formação de quimeras diferentes algoritmos e programas foram desenvolvidos com este propósito, sendo os mais conhecidos: BELLEROPHON (HUBER et al., 2004), CHIMERA CHECK (COLE et al., 2009), Ccode (GONZALEZ et al., 2005) e PINTAIL (ASHELFORD et al., 2005). Entretanto, os programas tem dificuldades em reconhecer quimeras quando as sequências formadoras possuem mais de 85% de homologia. Normalmente as quimeras são geradas a partir de sequências mais próximas, sendo mais difíceis de detectar. A ocorrência de quimeras é melhor detectada por meio da análise filogenética a partir de sequências das pontas opostas do rRNA. Se a sequência é uma quimera, a árvore gerada será incongruente, mas se a sequência é verdadeira, a árvore gerada deverá ser idêntica ou muito similar (ROLING; HEAD, 2005).

Outra importante etapa das análises é o agrupamento das sequências em OTU. Um programa muito usado nesta etapa é o DOTUR, que agrupa sequências de DNA em OTU usando uma matriz de distância genética, calculada entre cada par de sequências, e um algoritmo para agrupamento. Com as sequências agrupadas em OTU, o programa permite criar curvas de rarefação e do coletor para o número de espécies observadas, índices de diversidade e de riqueza. O programa permite o agrupamento das sequências em OTU a partir de diferentes valores de distância, não estando limitado a um único (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005).

A complexidade ecológica e filogenética das comunidades microbianas requer também o desenvolvimento de novos métodos para determinar se duas ou mais comunidades possuem a mesma estrutura, mesmo que não seja possível amostrar as comunidades exaustivamente (SCHLOSS;HANDELSMAN, 2006c). Dentre os métodos disponíveis, temos: análise baseada na estatística de Cramer-von Mises a partir de uma matriz de distância genética, teste de parcimônia e o método de UniFrac. Os dois últimos baseados em árvores filogenéticas. O teste baseado na estatística de Cramer-von Mises foi inicialmente implementado no programa LIBSHUFF (SINGLETON et al., 2001) e posteriormente modificado no programa  $\beta$ -LIBSHUFF (SCHLOSS et al., 2004).

Recentemente, um programa chamado Mothur foi desenvolvido com o objetivo de ter uma única fonte para analisar dados moleculares que são usados em ecologia microbiana (SCHLOSS et al., 2009). A plataforma abriga os algoritmos implementados em ferramentas que eram utilizadas separadamente nos programas DOTUR, SONS, Tree Climber, LIBSHUFF,  $\beta$ -LIBSHUFF e UniFrac. Ao pacote do programa Mothur foram incorporados mais de 25 cálculos para quantificar parâmetros ecológicos para medidas de diversidade alfa e beta; ii) geração de gráficos; iii) funções para varredura de sequências baseada em qualidade; iv) alinhamento baseado em NAST; v) cálculo de distância genética entre pares; vi) ambiente próprio de análise através de comandos específicos (SCHLOSS et al., 2009). A integração destes programas computacional trouxe uma integração necessária para as análises, aumentando sua flexibilidade, facilidade, comodidade e rapidez.

Por outro lado, a identificação taxonômica dos organismos a partir das sequências dependem de comparação com bancos de dados onde ocorre o alinhamento da sequência nucleotídica em questão com as existentes no banco de dados. Geralmente o algoritmo utilizado é, o BLAST e suas variações (ALTSCHUL et al., 1990) e a ferramenta do RDP II, conhecida como CLASSIFIER, que compara fragmentos de 8 bases entre a sequência analisada e aquelas presentes no banco de dados e utiliza uma estatística Bayesiana para determinar a classificação taxonômica (WANG et al., 2007).

Os bancos de dados gerais (*GenBank*) são normalmente utilizados, assim como bancos de dados especializados, que mantêm uma coleção atualizada e curada. Bancos de dados para o gene 16S rRNA são os que contêm o maior número de sequências depositadas. Estes bancos de dados especializados obtêm informação a partir de bancos de dados gerais, mas possuem a vantagem de pré-processar e filtrar os dados, removendo sequências de baixa qualidade e disponibilizam também as sequências em diferentes formatos, necessários para utilização em programas de análise de diversidade e/ou filogenética.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Conhecer a microbiota da rizosfera do guaranazeiro em plantas com sintomas da antracnose e assintomáticas.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar por meio do pirosequenciamento a microbiota da rizosfera do guaranazeiro que apresentam os sintomas da antracnose e os assintomáticos.
- Verificar os índices de riqueza e diversidade das comunidades bacterianas presentes na rizosfera do guaranazeiro.

#### 4 METODOLOGIA

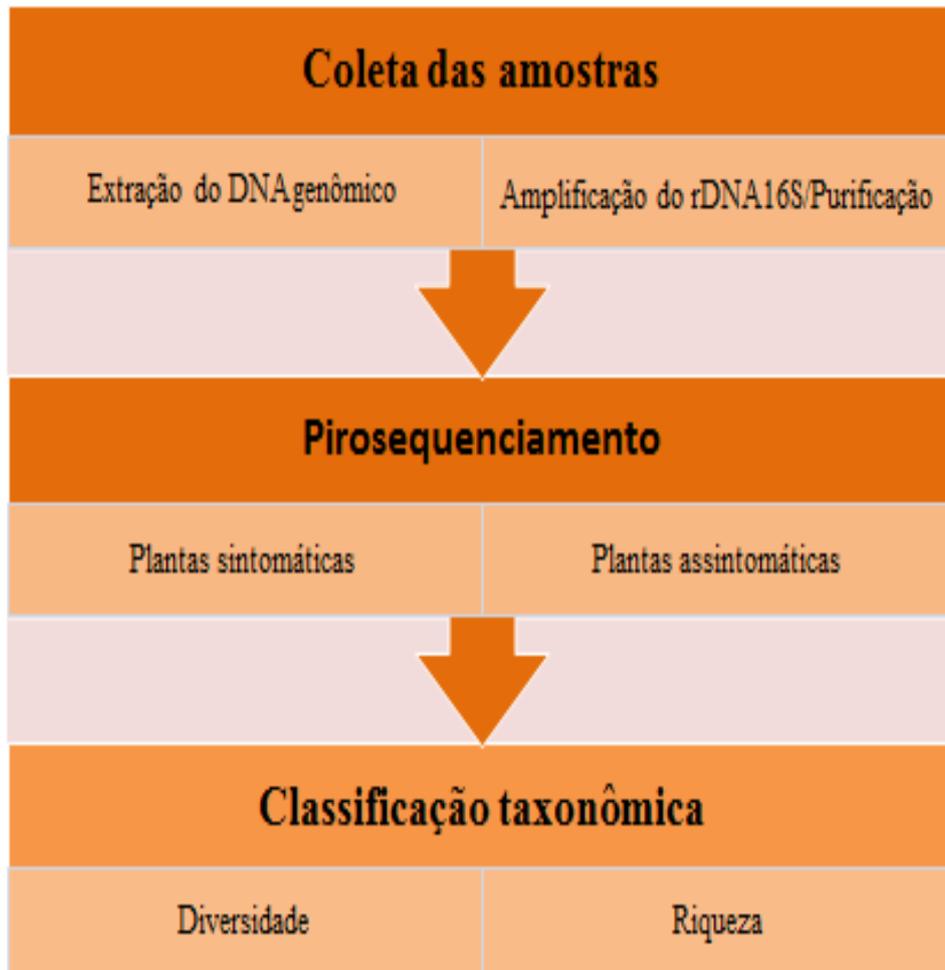


FIGURA 04. Desenho esquemático das etapas desenvolvidas

## 4.1 COLETA DA AMOSTRA

### 4.1.1 Local da Coleta

A coleta das amostras ocorreu em Abril de 2011, na Fazenda Santa Helena que pertence a AMBEV , localizada no município de Maués-AM (3° 32' 44" S e 57° 41' 30" W; altitude média 18m). Os dados pluviométricos para o mês da coleta foi de 516 mm, com temperatura média de 28°C e variações entre 26°C (mínima) e 32°C (máxima) (PREFEITURA DE MAUÉS, 2011).

### 4.1.2 Coleta das amostras

Para a análise da comunidade microbiana presente na rizosfera do guaranazeiro, foram coletadas 10 amostras da rizosfera do guaranazeiro (Figura 5), sendo 5 plantas com os sintomas da antracnose (doentes) e 5 plantas sem antracnose (sadia) (Figura 6) todas pertencentes ao mesmo clone da série 800 e que foram cultivadas no mesmo tipo de solo e sob o mesmo clima. As rizosferas foram conservadas em sacos plásticos e acondicionadas a 4°C e transportadas ao Laboratório de Tecnologia do DNA (UFAM) em Manaus, AM, onde foram imediatamente processadas.



FIGURA 05.(A) Coleta das Rizosferas do guaranazeiro doente e sadio



FIGURA 06.(A) Guaranazeiro com antracnose

(B) Guaranazeiro sem antracnose

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO SOLO

A caracterização química do solo da área de cultivo do guaranazeiro foi realizada no Laboratório de Análise de Solo e Plantas- LASP da EMBRAPA Amazônia Ocidental. Utilizou-se quatro repetições das amostras de solo coletadas a 15cm de profundidade. As características químicas do solo: pH=4,8, Carbono =25,6 g/Kg, Fósforo=17,37 mg/dm<sup>3</sup>, Potássio= 19,5 mg/dm<sup>3</sup>, Sódio=3mg/dm<sup>3</sup>, Cálcio=0,95 mol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>, Magnésio=0,46 cmol<sub>c</sub>, Alumínio= 1,33cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>, Ferro=150mg/dm<sup>3</sup>, Zinco=1,20mg/dm<sup>3</sup>, Manganês=5,59 mg/dm<sup>3</sup>, Cobre=0,15 mg/dm<sup>3</sup>.

## 4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO TOTAL

Para a extração do DNA total da rizosfera do guaranazeiro seguiu-se o procedimento recomendado pelo fabricante do kit PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc. USA).

Para análise da integridade do DNA as amostras foram submetidas a eletroforese e visualizadas em gel de agarose 1%. A quantificação e pureza ocorreu por meio da análise espectrofotométrica utilizando-se o equipamento NanoDrop® ND-1000 Technologies.

O processo da amplificação do gene 16S rDNA foi realizado utilizando-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Na reação da PCR utilizou-se o kit Illustra Pure Taq Ready e adicionou-se 30 ng do DNA, 1 µl do oligonucleotídeo iniciador, 1 µl do oligonucleotídeo reverso e água deionizada para completar o volume final de 25 µl.

Os oligonucleotídeos específicos para as regiões V3-V4 do gene 16S rDNA foram desenhados e amplificam fragmentos de DNA com aproximadamente 465 pb. As amostras de DNA da rizosfera do guaranazeiro doente foram amplificadas utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador 16S-LibL-F-MID2 e para as amostras da rizosfera do guaranazeiro sadio o 16S-LibL-F-MID4 e o oligonucleotídeo reverso foi comum às duas condições fisiológicas do guaranazeiro. As sequências dos oligonucleotídeos estão descritas na tabela 01.

**Tabela 01. Sequência dos oligonucleotídeos**

<b>Sequências do oligonucleotídeo iniciador</b>
16S-LibL-F-MID2 - utilizado para as amostras da rizosfera do guaranazeiro doente 5'CCA TCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACACGTAGTATACTCCTACGGRAGGCAGCA3'
16S-LibL-F-MID4 - utilizado para as amostras da rizosfera do guaranazeiro sadio 5'CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACACGTAGTATACTCCTACGGRAGGCAGCA3'
: (340F) <u>16S-LibL-F-MID5</u> - 5'CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG ACG AGT AGA CTA CTC CTA CGG <b>R</b> AG GCA GCAG- 3';
(340F) <u>16S-LibL-F-MID6</u> - 5'CAT CTC ATC CCT GCG TGT CTC CGA CTC AGA CGC GTC TAG TAC TCC TAC <b>G</b> R AGG CAG CAG- 3'
Sequência do oligonucleotídeo reverso 5'CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC TCAG GGACTACCAGGGTATCTAAT3'

A reação para a amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial de 4 minutos a 95° C, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 95° C; 1 minuto a 59° C; 40 segundos a 72° C, e uma extensão final de 5 minutos a 72° C. Os produtos das reações foram analisados em gel de agarose (0,8% p/v) juntamente com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA (DNA Ladder Promega, Madison W. USA) e purificados utilizando-se o Illustr<sup>TM</sup>GFX PCR DNAGel Band Purification Kit seguindo as recomendações do fabricante.

#### 4.4 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rDNA VIA PIROSSEQUENCIAMENTO

O sequenciamento das amostras foi realizado pela Empresa Helixa (Campinas, São Paulo, Brasil). Para tal, o DNA extraído da rizosfera do guaranazeiro foi submetido a reações de PCR com iniciadores que flanquearam as regiões V3- V4 do gene 16S rDNA (Figura 11).

Em todos os iniciadores foram adicionados adaptadores e uma sequência de oito bases (*tag*) para posterior identificação da origem de cada sequência.

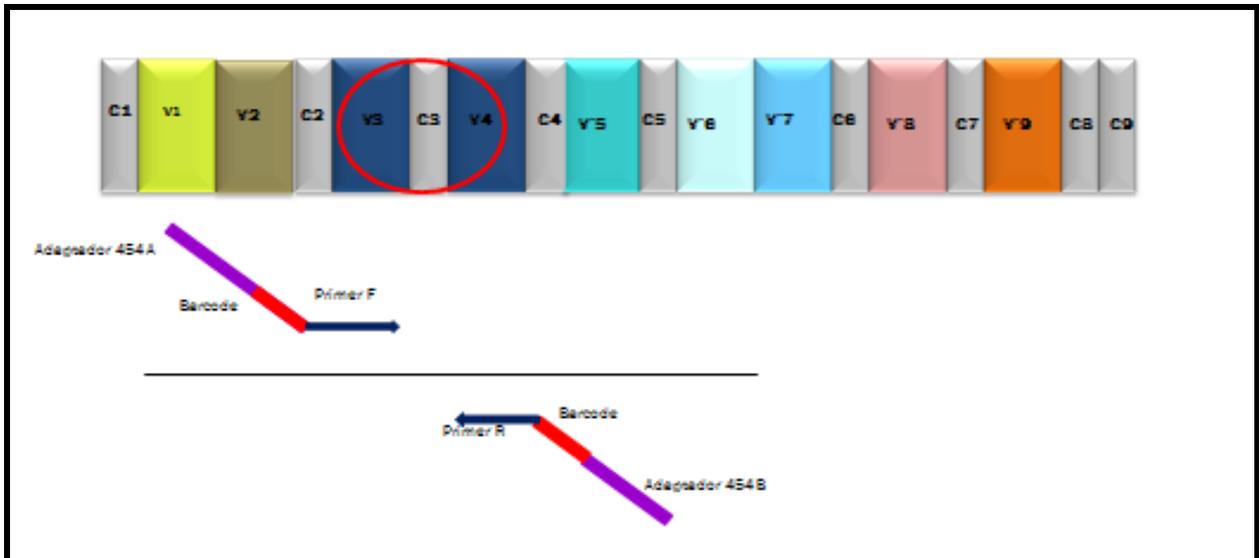


FIGURA 07. Desenho esquemático demonstrando as regiões V3-V4 do gene 16S rDNA e a região de anelamento dos oligonucleotídeos específicos.

#### 4.5. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA, ALINHAMENTO E FORMAÇÃO DAS UNIDADES TAXONÔMICAS DOS FRAGMENTOS DO GENE 16S RDNA.

A análise das sequências nucleotídicas obtidas por pirosequenciamento foi realizada com o auxílio do software *Mothur* (SCHLOSS, 2009).

Primeiramente, os arquivos brutos com extensão específica sff gerados pelo pirosequenciador 454 Roche<sup>®</sup> FLX foram convertidos para a extensão fastq, com o uso do sistema operacional Linux (Ubuntu<sup>®</sup>) e o software livre sff2fast. Posteriormente, utilizou-se o programa fastqc para a conversão dos arquivos fastq em fastqc. Em seguida, procedeu-se a análise de qualidade das sequências segundo o formato Phred e verificou-se a qualidade das sequências geradas pelo pirosequenciador 454 Roche<sup>®</sup>.

Os arquivos brutos das sequências nucleotídicas das amostras da rizosfera do guaranazeiro doente e sadio foram submetidos à suíte do programa *Mothur* (v.1.34.0 – novembro de 2014). Tal programa utiliza os algoritmos *Chris Quince's PyroNoise* e *Amplicon Noise* para a remoção de erros e ruídos de bases, que podem ocorrer durante a reação de amplificação da polimerase inicial, ou no pirosequenciamento. As sequências de 150 a 479 nucleotídeos foram recuperadas após o controle de qualidade e alinhadas com o

programa align.seqs da suíte Mothur. Foi gerada uma matriz de distância entre as sequências alinhadas. Em seguida, ocorreu o agrupamento das sequências em Unidades Taxonômicas Operacionais - OTUs (Schloss & Handelsman, 2005).

Cada um dos dados gerados foi submetido à afiliação taxonômica com o auxílio do *RDP classifier* e também ao *RDP Library Compare* com a finalidade de comparar os táxons presentes nos dois tratamentos (Wang *et al.*, 2007) A análise de sequências de similaridade foi realizada de acordo com as recomendações do sistema (Domínio >0%, Filo >75%, Classe >85%, Ordem > 91%, Família >92%, Gênero >95%, Espécie > 97% e linhagem =100%). Neste estudo utilizou-se uma identidade mínima de 97% para a classificação ao nível de gênero.

#### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS BASEADAS NAS UTOs

A análise da diversidade e riqueza da microbiota bacteriana, a partir da análise das sequências nucleotídicas das amostras da rizosfera do guaranazeiro doente e sadio, foi realizada utilizando os índices de *Shannon*, *Chao1* e *ACE*.

O cálculo da diversidade foi mensurada por meio do índice de *Shannon* que utiliza amostras aleatórias baseados na abundância relativa de espécies de uma comunidade (Dias, 2004). Para o cálculo da riqueza utilizou-se os estimadores estatísticos não paramétricos *Chao1* que utiliza o número de espécies (OTU) raras para estimar a diversidade de um dado ambiente (Bohannan & Hugles, 2003), e o estimador *ACE* que determina a abundância numérica de espécies (sequências) presentes em uma amostra e quantifica a riqueza de espécies.

Os índices mencionados anteriormente foram calculados pelo programa computacional Mothur (SCHLOSS *et al.*, 2009), que também gerou os dados de rarefação e o diagrama de Venn.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO TOTAL

A evolução dos métodos para a extração da molécula de DNA permitem resultados eficientes quanto a integridade, pureza e concentração da molécula. Tais características são pré-requisitos para os procedimentos de amplificação do DNA e sequenciamento dos genes. O método utilizado neste estudo para a extração do DNA genômico da rizosfera do guaranazeiro, proporcionou moléculas íntegras com grau de pureza 1,9, sendo considerado como um DNA puro segundo o padrão estabelecido por SAMBROOK, 1989. Quanto a concentração obteve-se em média 100ng/ $\mu$ L de DNA o (Figura 08).

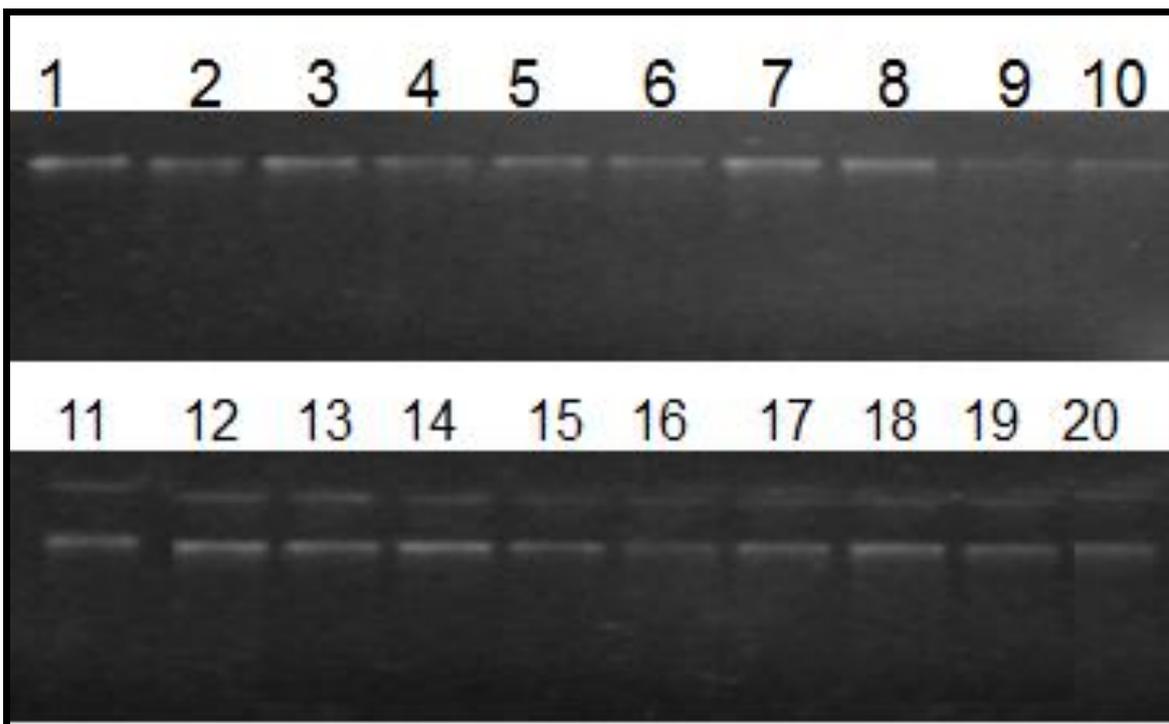


FIGURA 08. Perfil eletroforético em gel de agarose 1%. Amostras 1 a 10- DNA total da rizosfera do guaranazeiro doente e 11 a 20- DNA total da rizosfera do guaranazeiro sadio

Utilizando-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) obteve-se os fragmentos com cerca de 465pb que correspondem a sequência nucleotídica localizada nas regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16S rDNA (Figura 09).

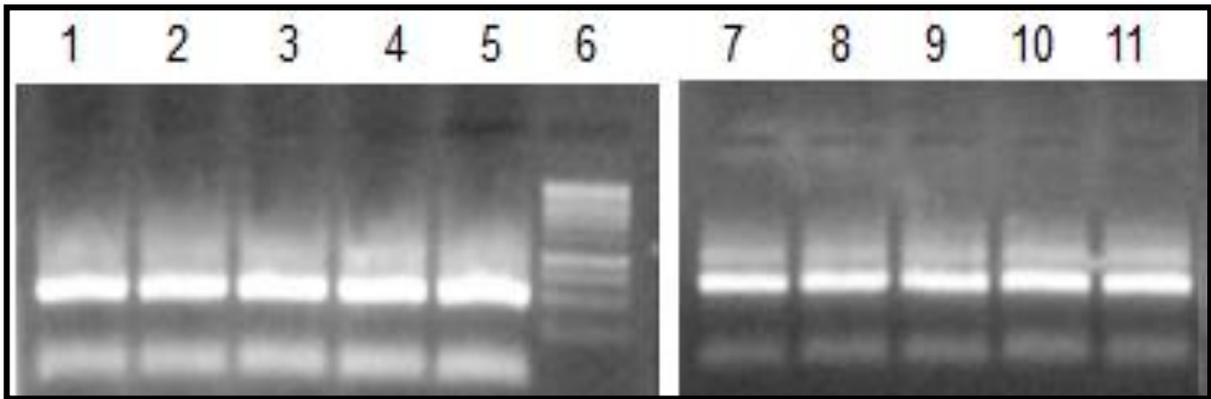


FIGURA 09. Eletroforese em gel de agarose 0,8% da purificação das amostras para o pirosequenciamento. Amostras:1 –Marcador molecular 1kb. 2 e 3-Fragmento amplificado da região 16S rDNA da rizosfera do guaranaizeiro doente e sadio.

O processo de purificação das amostras apresentou concentração em torno de 10ng/μL (Figura 09).

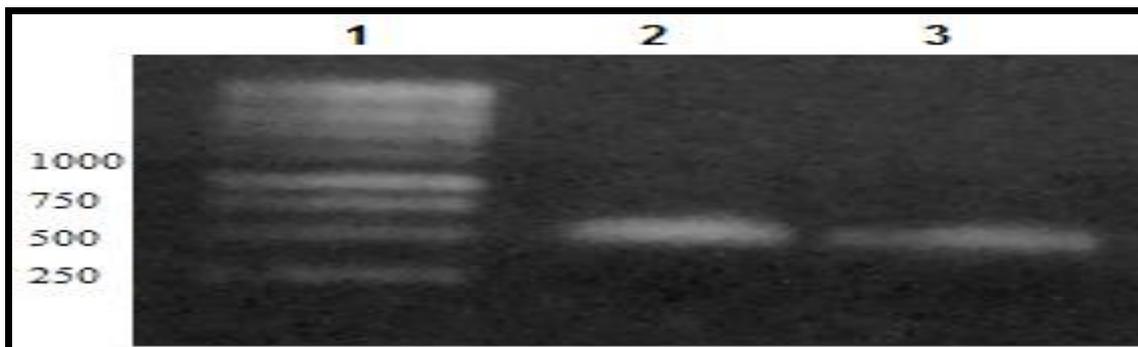


FIGURA 10. Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da amplificação do gene 16S rDNA. Amostras 1 a 5- rizosferas do guaranaizeiro doente. Amostras 7 a 11 rizosferas do guaranaizeiro sadio. Amostras 6 a- Marcador molecular de 1kb.

## 5.2 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rDNA VIA PIROSSEQUENCIAMENTO

O pirosequenciamento da região 16S rDNA totalizou a leitura de 40.778 para as amostras da rizosfera do guaranaizeiro doente e 18.057 sequências para as amostras da rizosfera do guaranaizeiro sadio. Após o processo da filtragem das sequências, os resultados obtidos totalizaram 7523 sequências nucleotídicas acessadas para as amostras da rizosfera do guaranaizeiro doente e 2635 sequências para o sadio. Para a análise taxonômica as sequências foram normalizadas pelo menor numero de sequência, ou seja, 2635.

Quanto a qualidade de todas as bases nucleotídicas, a análise das sequências demonstrou que encontram-se no padrão de alta confiabilidade ou seja, estão com índice de qualidade acima de 20 (Figura 11). As sequências que estão na área verde do gráfico são consideradas com alto padrão de qualidade, na área laranja estão as com qualidade razoável e por último na área vermelha as sequências com má qualidade.

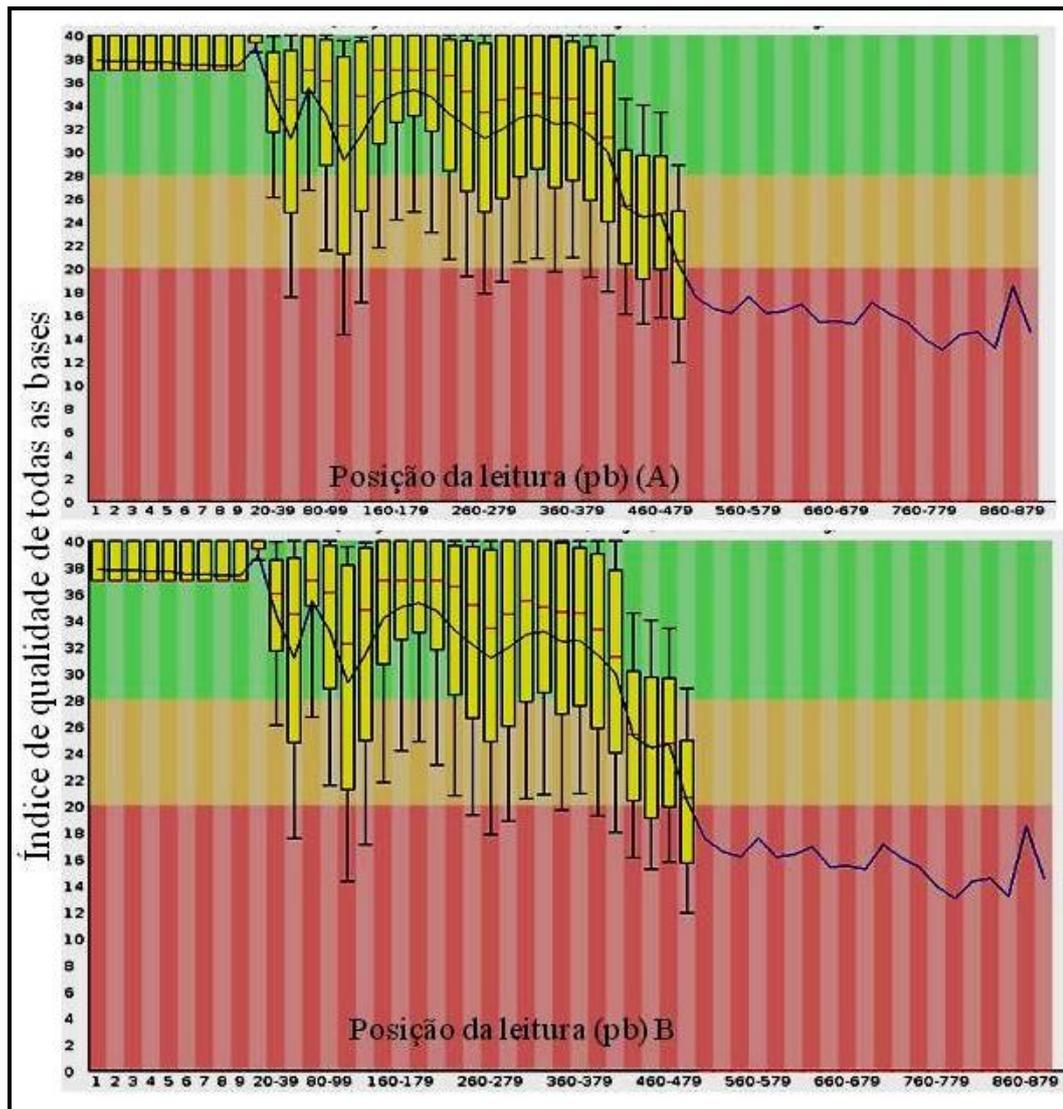


FIGURA 11. Qualidade das sequências geradas pelo programa FastQC. (A) Rizosfera de plantas sintomáticas. (B) Rizosfera plantas assintomática.

### 5.3. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

#### 5.3.1 Filos, Classes, Ordens

Com a análise das sequências do pirosequenciamento e as OTUs geradas foi possível realizar a classificação taxonômica dos Filos, Classes, Ordens, Famílias e Gêneros. Quanto as bactérias que não foram classificadas, a frequência relativa também foi obtida (Figura 12).

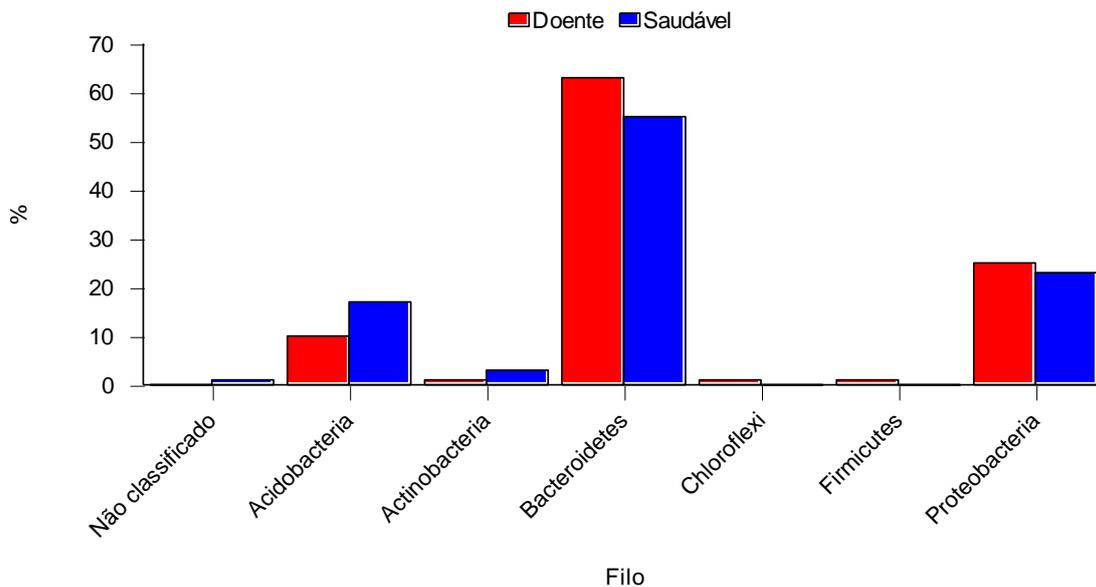


FIGURA 12. Proporção dos Filos bacterianos encontrados em rizosfera de plantas sadias e doentes.

O Filo Bacteroidetes foi o mais abundante na rizosfera do guaranazeiro doente com 63% e 55% das sequências em rizosfera do guaranazeiro saudável e os representantes pertencem as classes da Flavobacteria (Flavobacteriales) na Família Flavobacteriaceae e Sphingobacteria (Sphingobacteriales) das Famílias Chitinophagaceae e Sphingobacteriaceae.

O Filo Proteobactéria com 25% e 23%, nas rizosferas do guaranazeiro doente e sadio respectivamente. Os membros deste Filo estão distribuídos nas duas Classes Alfaproteobactéria e Gamaproteobactéria. Na Classe das Alfaproteobactéria existem representantes da Ordem Rhizobiales com suas famílias Hyphomicrobiaceae e Rhizobiales\_Incertae, na Ordem Rhodopirillales temos representantes das Acetobacteriaceae e na Sphingomonadales temos membros da Sphingomonodaceae. Na Classe das Gamaproteobactéria somente representantes da Pseudomonadaceae (Pseudomonadales).

Outros filios foram acessados como o Filo Acidobactéria com 10% em rizosfera de plantas sintomáticas e 17% nas assintomáticas. Os representantes deste Filo pertencem a Classe

Acidobactéria (Acidobacteriales) e a Família Acidobacteriaceae. O Filo Actinobactéria representa 10% das sequências acessadas da planta considerada doente e 17% em planta sadia. Os membros acessados pertencem a Classe Acidothermacia (Frankiales) e a Família Acidothermaceae.

Os Filos Chloroflexi e Firmicutes representam 1% das sequências da amostra da rizosfera de plantas sintomáticas e ausente nas assintomáticas. Observou-se que 1% das sequências da amostra da rizosfera de plantas assintomáticas não foram classificadas (Figura 12).

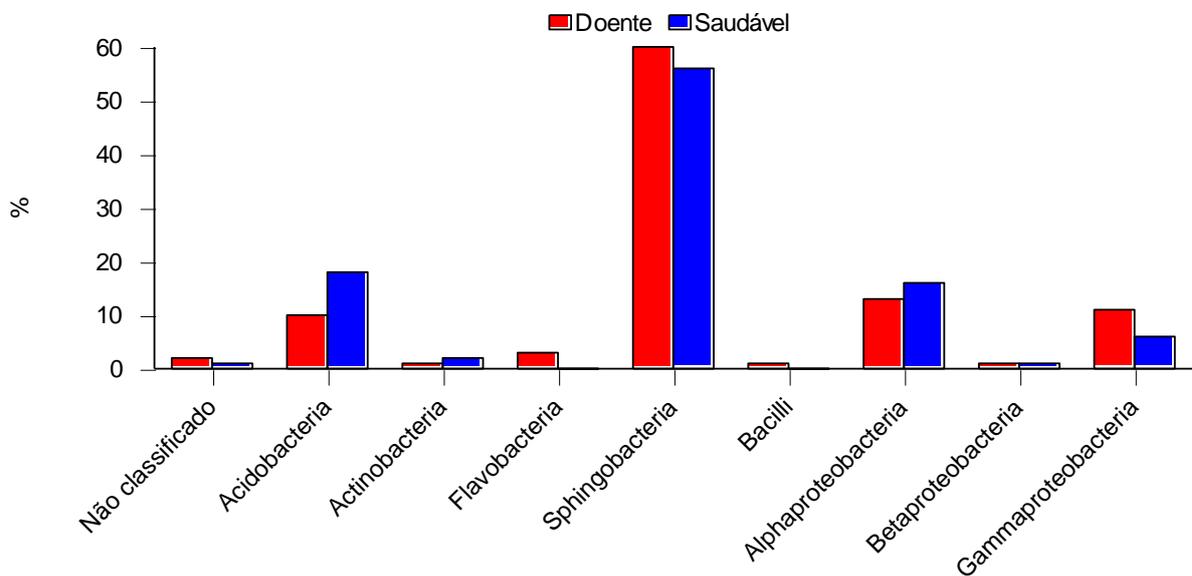


FIGURA 13. Proporção das classes de bactérias encontradas na rizosfera do guaranazeiro doente e sadio.

Observou-se o predomínio da classe Sphingobactéria em rizosfera de plantas sintomáticas (60%) e assintomáticas (56%). A representatividade da Classe Alphaproteobactéria corresponde a 13% em rizosfera do guarazeiro sadio e 17% nas plantas doentes. As sequências acessadas para a Classe Acidobactéria demonstrou que 10% correspondem a rizosfera do guarazeiro doente e 18% ao sadio. Em relação a Classe Actinobactéri, observou-se a proporção de 1% em rizosfera de plantas doentes 2% nas sintomáticas. Os representantes da Classe Flavobactéria foram detectados apenas na rizosfera do guaranazeiro sadio enquanto 1% das sequências da Classe Bacilli estão presentes somente na rizosfera do guaranazeiro sadio. Observou-se igual proporção (1%) para a Classe Betaproteobactéria presentes na rizosfera do guaranazeiro sadio e doente. Quanto a Classe Gamaproteobacteria representam 11% em rizosfera de plantas sintomáticas e 6% em

assintomáticas. Ao nível de Classe, 2% das sequências acessadas na rizosfera do guaranazeiro doente e 1% na sadia, não foram classificadas.

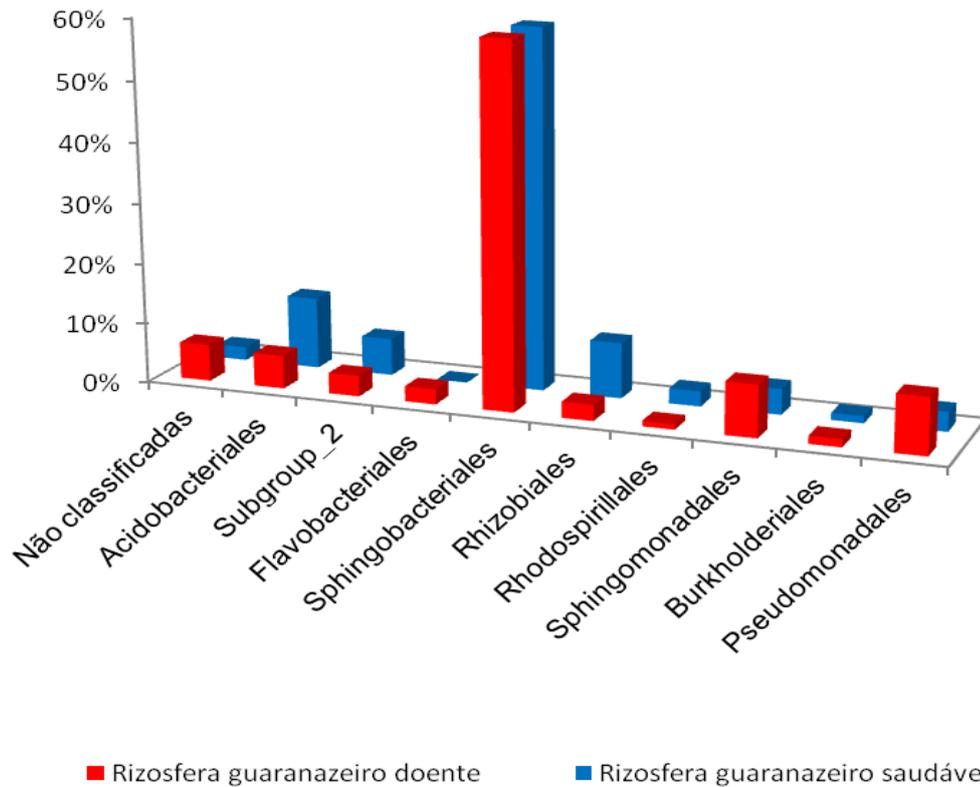


FIGURA 14. Proporção das Ordens de bactérias encontradas na rizosfera do guaranazeiro doente e sadio.

A ordem Spingobacterales apresentou frequência relativa de 60% em amostras da rizosfera do guaranazeiro doente e 59% em sadias. As Acidobactérias representam 5% das amostras acessadas em rizosfera do guaranazeiro doente e 12% em sadios. A ordem denominada Subgroup\_2 apresenta 3% das amostras analisadas em rizosfera do guaranazeiro doente e 6% em plantas saudáveis. Para a ordem Flavobacterales observou-se que a frequência relativa é de 3% em amostras da rizosfera do guaranazeiro doente e ausente no sadio. Quanto a ordem Rhizobiales observou-se que em plantas doentes a frequência relativa é de 3% das sequências acessadas e 9% em plantas sadias. Os representantes da ordem Rhodospirillales representam 1% das sequências acessadas em plantas doentes e 3% nas saudáveis. Quanto a ordem Spingomonadales consta que 9% das sequências amostradas pertencem a rizosfera do guaranazeiro doente e 4% as plantas saudáveis. Para a ordem Burkholderiales a frequência relativa de 1% é pertinente nas duas condições da rizosfera do

guaranazeiro. A ordem Pseudomonadales apresentou como frequência relativa, na condição de planta doente, 9% das sequências acessadas e 3% em plantas saudáveis.

Ao nível de ordem 6% das sequências acessadas em amostras de plantas doentes e 3% em plantas saudáveis não foram classificadas.

### 5.3.2 Famílias

As Famílias com frequência relativa acima de 10% foram: Sphingobacteriaceae, Chitinophagaceae, Acidobacteriaceae e Pseudomonadaceae (Figura 15).

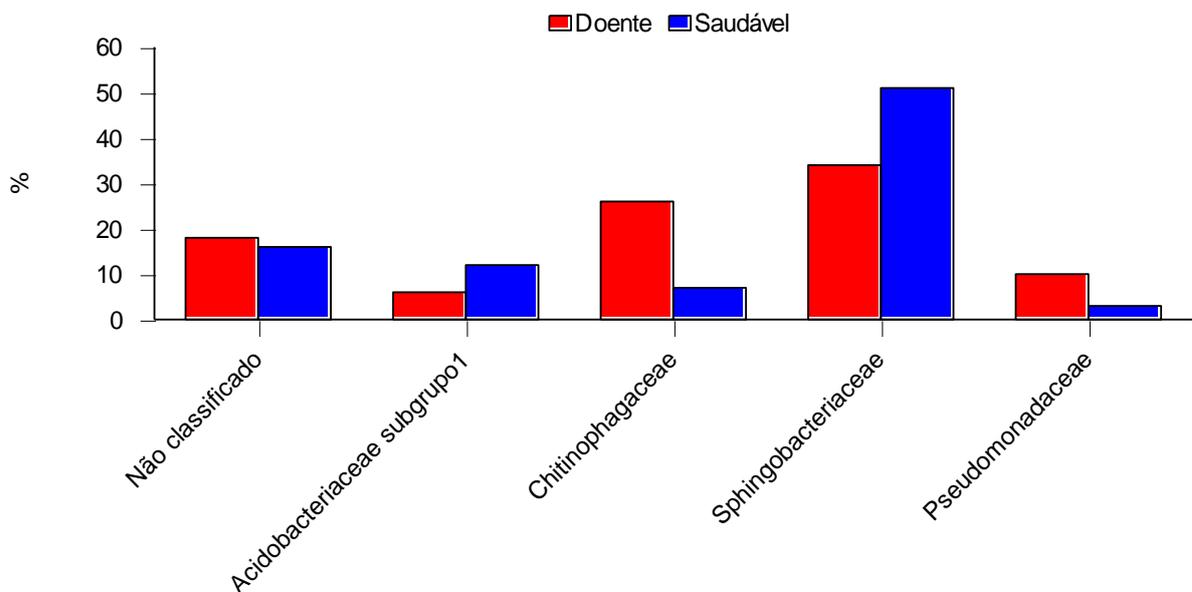


Figura 15. Famílias predominantes em rizosfera do guaranazeiro doente e sadio

Em amostras da rizosfera das plantas saudáveis a Família Sphingobacteriaceae predomina com 52%, enquanto na rizosfera do guaranazeiro de plantas doentes, a frequência relativa foi de 34%. Por outro lado, em plantas doentes a Família Chitinophagaceae apresentou predominância com frequência relativa de 26% e em plantas saudáveis com 7%. A Acidobacteriaceae\_(Subgroup\_1) representa 12% das sequências nucleotídicas acessadas em rizosfera do guaranazeiro sadio e 6% nas doentes. Na Família Pseudomonadaceae 10% das sequências acessadas são das amostras das plantas doentes e 3% em plantas saudáveis. (Figura 13).

A Família Hyphomicrobiaceae apresenta 1% das sequências acessadas em amostras de plantas doentes e 5% em plantas saudáveis. A Família Comamonadacea apresenta 1% das sequências analisadas das amostras de plantas doentes e ausente em plantas saudáveis.

Em plantas sadias observou-se a presença das famílias Rhizobiales\_Incertae\_Sedis (1%), Acetobacteraceae (2%), DA111(1%) e Sphingomanadaceae (1%). Quanto as sequências acessadas que não foram classificadas 18% encontram-se em plantas doentes e 16% em plantas saudáveis.

A frequência relativa dos gêneros classificados e as suas respectivas famílias estão representados na na figura 16.

Na família Sphingobacteriaceae, do total das sequências acessadas, observou-se que nas amostras da rizosfera do guaranazeiro sadio, 98% correspondem ao gênero *Mucilaginibacter* e 51% em plantas doentes. Os gêneros *Pedobacter* (40%) e *Sphingobacterium* (3%) estão presentes somente em rizosferas das plantas doentes. Quanto as sequências acessadas e não classificadas 6% correspondem a rizosferas do guaranazeiro doente e 2% do sadio (Figura 16).

A Família Chitinophagacea apresentou 94% e 91% do gênero *Tabaiella* em guaranazeiro doente e sadio respectivamente. O gênero *Niastella* (2%) foi identificado somente em guaranazeiro sadio.

Na Família Acidobacteriacea\_(Subgroup\_1) os gêneros classificados foram: *Acidobacterium* presentes somente em guaranazeiro sadio (1%), *Candidatus\_Koribacter* com 43% e 39% das sequências acessadas em guaranazeiro doente e sadio respectivamente. Os gêneros *Edaphobacter* (3%) em ambos os tratamentos, *Granulicella* 2% em guaranazeiro doente e 5% em sadio e *Telmatobacter* 1% em guaranazeiro doente e 2% em sadio. As sequências não classificadas em guaranazeiro doente foi 51% e 49% no sadio.

A Família Flavobacteriaceae apresentou o gênero *Flavobacterium* predominante nos dois tratamentos. Os gêneros *Chryseobacterium* (32%), *Cloacibacterium* (5%) e 2% não foram classificadas.

A Família Pseudomonadacea apresentou somente o gênero *Pseudomonas* em ambos os tratamentos, sendo que 2% das sequências acessadas da rizosfera do guaranazeiro doente, não foram classificadas.

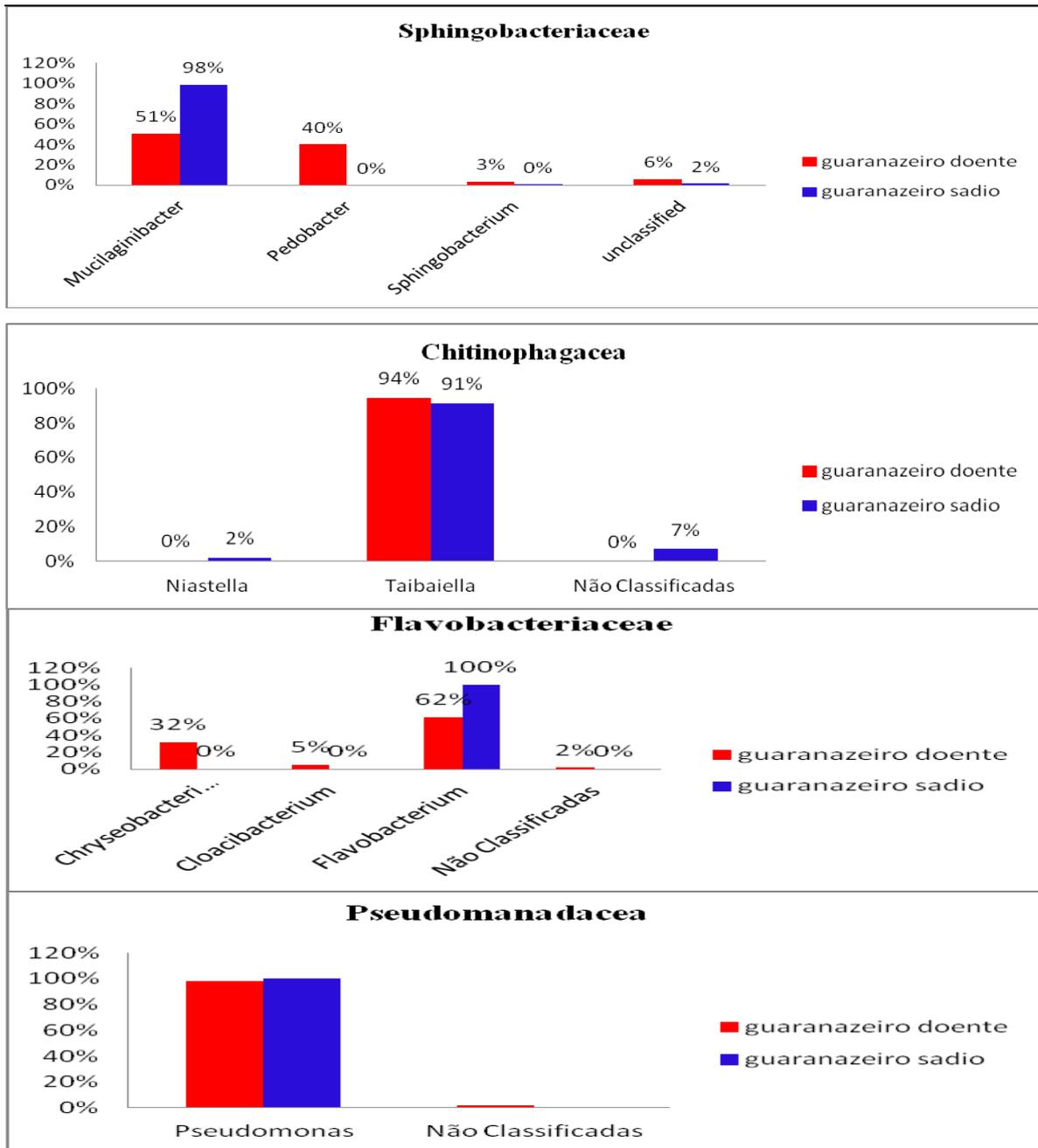


Figura 16. Famílias predominantes com seus respectivos gêneros em rizosfera do guaranazeiro doente e sadio

### 5.3.3 Gêneros predominantes

Com a classificação geral das sequências acessadas observou-se que na microbiota da rizosfera do guaranazeiro doente, ocorre o predomínio do gênero *Tabaiella*, que pertence ao Filo Bacteroidetes (Chitinophagaceae), com frequência relativa de 24%, enquanto que em plantas saudáveis o resultado foi de 7%. Por outro lado, em plantas saudáveis, o gênero *Mucilaginibacter* (Bacteroidetes, Sphingobacteriaceae) é predominante e apresentou como

frequência relativa o total de 51% das sequências acessadas em rizosfera do guaranazeiro sadio e 17% em plantas doentes. Em menor proporção o *Pedobacter* (presente somente em rizosfera do guaranazeiro doente) e *Pseudomonas*. Quanto as sequências não classificadas correspondem a 28% em rizosfera do guaranazeiro doente e 26% no sadio. Na figura 17, estão representados, a partir da classificação geral, os gêneros predominantes em rizosferas do guaranazeiro doente e sadio. Os gêneros com frequência relativa abaixo de 5% estão representados na figura 18.

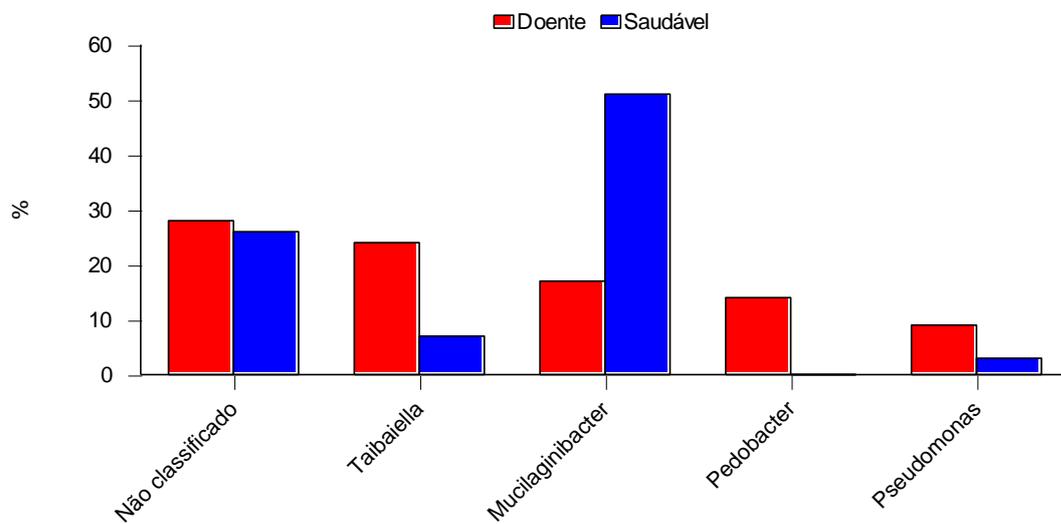


Figura 17. Gêneros predominantes nas rizosferas do guaranazeiro doente e sadio

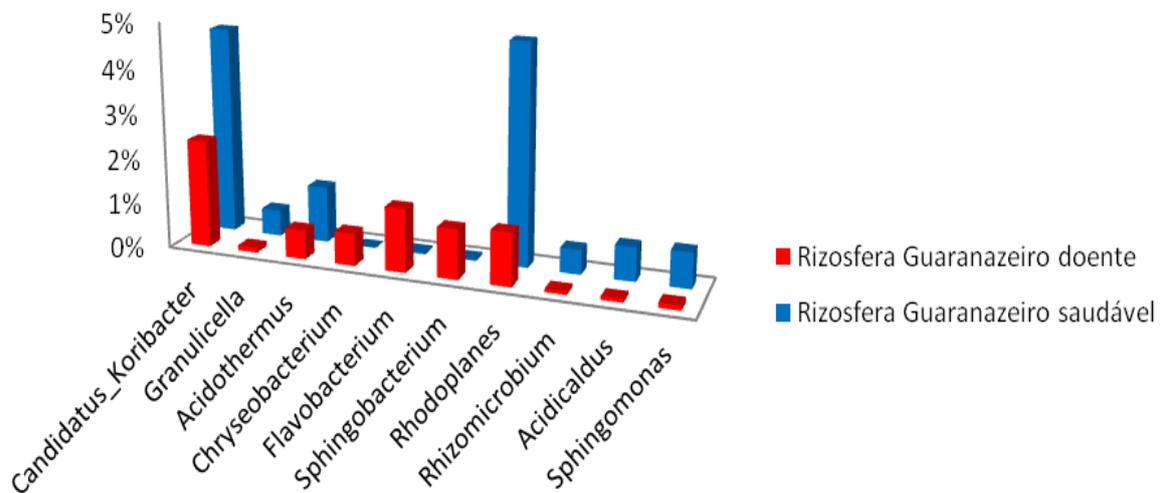


Figura 18. Gêneros com frequência relativa  $\leq 5\%$

### 5.3.3.1 Gêneros exclusivos de plantas doentes

Os gêneros exclusivos de plantas doentes foram: *Chryseobacterium* (1%), *Flavobacterium* (1%), *Pedobacter* (14%) e *Sphingobacterium* (1%), todos pertencentes ao filo Bacteroidetes (Tabela 02).

**Tabela 02. Gêneros presentes somente na rizosfera do guaranazeiro doente**

<b>Gêneros</b>	<b>Família</b>	<b>Filo</b>
<i>Chryseobacterium</i>	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes
<i>Flavobacterium</i>	Flavobacteriaceae	Bacteroidetes
<i>Pedobacter</i>	Sphingobacteriaceae	Bacteroidetes
<i>Sphingobacterium</i>	Sphingobacteriaceae	Bacteroidetes

### 5.3.3.2 Gêneros exclusivos das plantas saudáveis

As sequências acessadas das amostras da rizosfera de plantas sadias também apresentaram gêneros que não ocorrem em plantas doentes, são eles: *Rhizomicrobium* (1%), *Acidicaldus* (1%) e *Sphingomonas* (1%) (Tabela 03).

**Tabela 03- Gêneros presentes somente na rizosfera do guaranazeiro sadio.**

<b>Gêneros Guaranazeiro sadio</b>	<b>Família</b>	<b>Filo</b>
<i>Rhizomicrobium</i>	Rhizobiales_Incertae_Sedis	Proteobacteria
<i>Acidicaldus</i>	Acetobacteraceae	Proteobacteria
<i>Sphingomonas</i>	Sphingomonadaceae	Proteobacteria

### 5.3.3.3 Gêneros comuns aos dois tratamentos

Outros gêneros também foram observados e são comuns aos dois sistemas (Tabela 06). O gênero *Pseudomonas* (9%) em rizosfera de plantas doentes e 3% nas plantas sadias. O gênero *Candidatus\_Koribacter* apresenta 2% da sequência acessada nas amostras da rizosfera

de plantas doentes e 5% das plantas sadias. Os Rhodoplanes . As sequências acessadas e não classificadas correspondem a 28% em plantas doentes e 26% em plantas sadias.

**Tabela 04. Gêneros comuns á rizosfera do guaranazeiro doente e sadio e suas respectivas Famílias e Filos.**

<b>Gêneros comuns aos dois grupos</b>	<b>Família</b>	<b>Filo</b>
<i>Candidatus_Koribacter</i>	Acidobacteriaceae	Acidobacteria
<i>Granulicella</i>	Acidobacteriaceae	Acidobacteria
<i>Acidothermus</i>	Acidothermaceae	Actinobacteria
<i>Taibaiella</i>	Chitinophagaceae	Bacteroidetes
<i>Rhodoplanes</i>	Hyphomicrobiaceae	Proteobactéria
<i>Mucilaginibacter</i>	Sphingobacteriaceae	Bacteroidetes
<i>Pseudomonas</i>	Pseudomonadaceae	Proteobacteria

#### 5.4 DIVERSIDADE, RIQUEZA E RAREFAÇÃO

Utilizando-se o programa computacional Mothur (SCHLOSS et al., 2009) realizou-se a seleção quanto a qualidade e o alinhamento das sequências analisadas.

O diagrama de Venn representa o agrupamento de conjuntos de espécies ou gêneros semelhantes, denominadas como unidades taxonômicas operacionais (UTO's) para cada grupo de plantas (rizosferas do guaranazeiro doente e sadio) sendo possível também estimar os filotipos comuns. Na figura 20 pode-se observar o diagrama de Venn para o índice de similaridade de 97% que demonstra o total de 614 OTUs, sendo 294 em amostras da rizosfera do guaranazeiro doente e 427 no guaranazeiro sadio, sendo que 107 OTU's são comuns aos dois tratamentos.

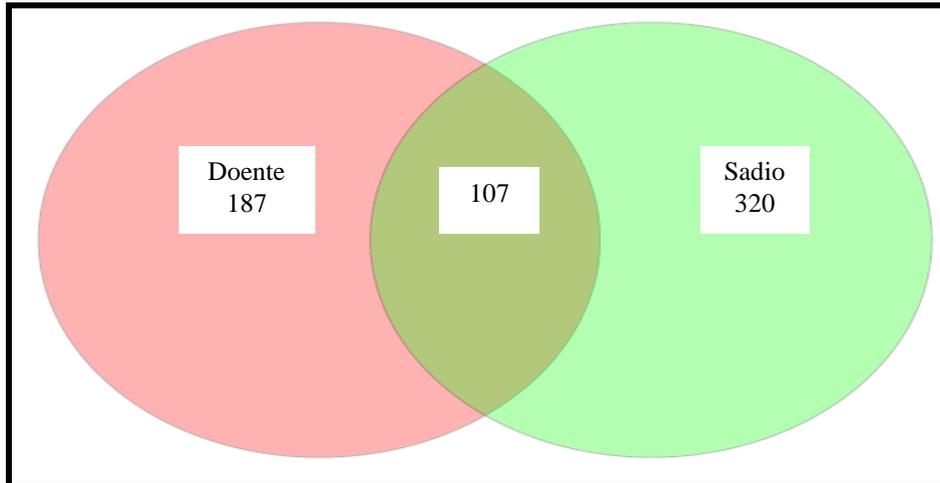


Figura 19 - Diagrama de Venn para o índice de similaridade de 97%.

#### 5.4.1 Análise da Riqueza

Neste estudo a estimativa da riqueza e de diversidade foram analisadas mediante a aplicação do software Mothur. A estimativa da riqueza foi medida pelos os índices de Chao1 e Ace e a diversidade foi calculada pelo índice de Shannon. O índice de similaridade utilizado foi de 97%.

Conforme demonstrado na tabela 7 , o índice de similaridade utilizado para análise da riqueza e diversidade foi de 97% para o total de sequências de 2635 em ambos os tratamentos. Utilizou-se o total das OTU's para cada grupo (doente e sadio) sendo para o grupo do guaranazeiro doente 294 e 427 para o sadio.

Os resultados obtidos, após a análise da estimativa de riqueza dos grupos de plantas estudadas, indicam que em rizosfera do guaranazeiro doente, o índice de riqueza e diversidade é menor quando comparada ao grupo de plantas saudáveis. Os valores obtidos foram: O índice de Chao para a rizosfera do guaranazeiro doente foi 661,09 e 994,01 para a sadia e de Ace 1013,42 para doente e 2019,60 para o grupo de plantas saudáveis. O índice de cobertura estimada foi de 93% para o grupo de plantas doentes e 90% para o grupo de plantas saudáveis.

**Tabela 05 – Índices de riqueza e diversidade em rizosfera de guaranazeiro doente e sadio.**

Planta	Índice de Similaridade	Total das sequências	OTUs	Índices de Riqueza		Índice de Diversidade	Índice de Cobertura Estimada
				Chao1	Ace	Shannon	%
<b>Doente</b>	97%	2635	294	661,09 (532,46- 859,12)	1013,42 (881,42- 1175,09)	3,96	93
<b>Sadia</b>	97%	2635	427	994,01 (828,13- 1228,49)	2019,60 (1807,08- 2264,86)	4,54	90

#### 5.4.2 Curvas de rarefação

A curva de rarefação, que foi construída a partir do programa computacional *Mothur*, indica o efeito do esforço no sequenciamento para estimar o número de OTUs. Considerando o número de sequências para os grupos da rizosfera de guaranazeiro doente e sadio, pode-se observar que embora aumente o número de sequências a tendência da curva em ambos os tratamentos é a estabilidade.

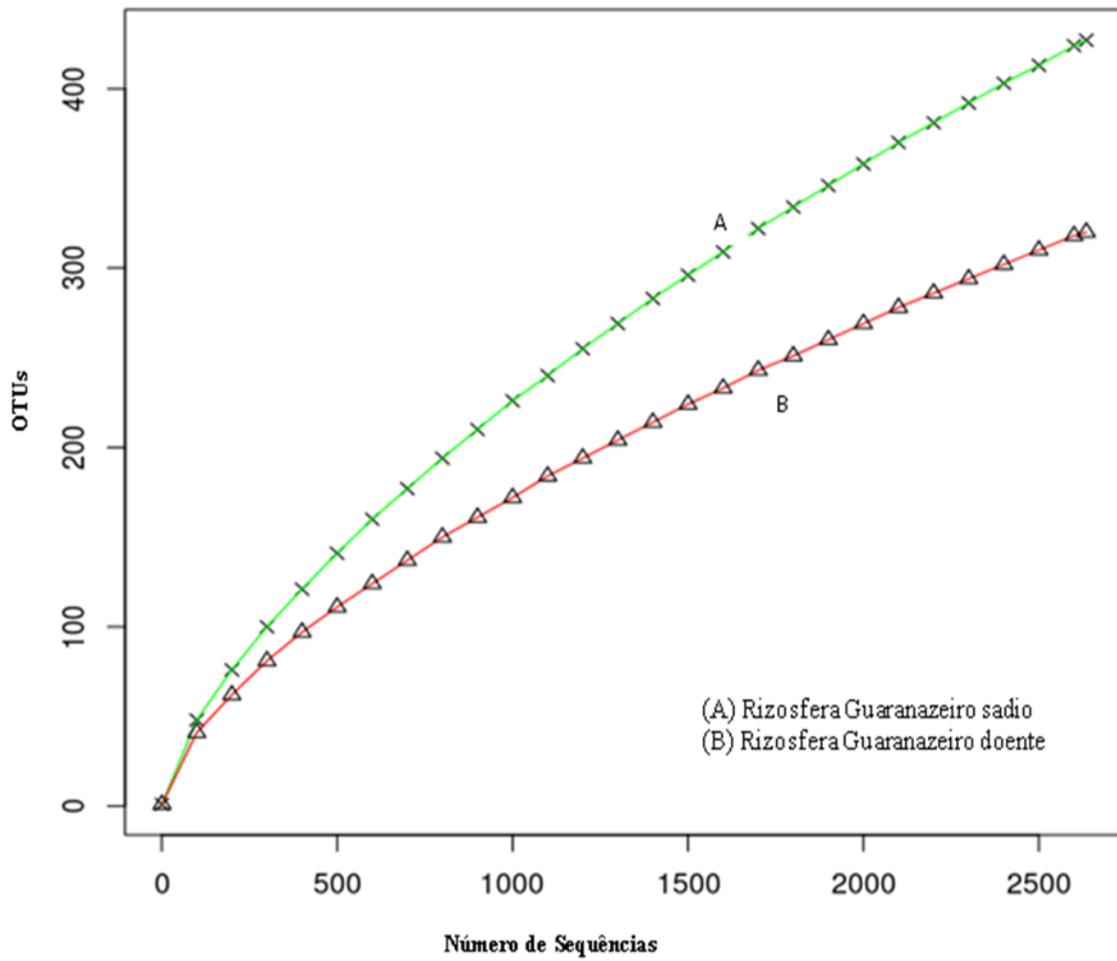


Figura 20. Curvas de rarefação das amostras bacterianas da rizosfera do guaranazeiro doente e sadio

## 6 DISCUSSÃO

A microbiota da rizosfera desempenha um papel essencial na saúde e produtividade das plantas e muitas vezes esse ambiente é conhecido como o segundo genoma da planta. É um local atraente para os microrganismos devido à disponibilidade de nutrientes (BERENDSEN, et al., 2012). O conhecimento da diversidade biológica em termos de riqueza de espécies, distribuição local e global, e função no ecossistema, permanece ainda bastante incompleto.

Com o objetivo de analisar a microbiota dependente e independente de cultivo da rizosfera do guaranazeiro, utilizou-se a tecnologia do pirosequenciamento da região 16S rDNA e as ferramentas da bioinformática para amostras do DNA genômico total que foram extraídos da rizosfera do guaranazeiro com sintomas para antracnose (plantas doentes) e também das assintomáticas (plantas sadias).

O gene 16S rDNA em bactérias é constituído por sequências conservadas, intercaladas com sequências variáveis que incluem 9 regiões hipervariáveis. O comprimento, em número de bases, destas regiões hipervariáveis varia de 50 a 100 bases (PETROSINO et al., 2009).

As regiões variáveis podem ser usadas para estudar as relações evolutivas entre dois organismos muito próximos, identificar espécies bacterianas por meio da classificação taxonômica (CHOI et al., 1996, CLARRIDGE, 2004; MUNSON et al., 2004; PETTI et al., 2005; SCHMALENBERGER et al., 2001) e ainda diferenciar entre um número limitado de diferentes espécies ou gêneros (BECKER et al, 2004;. BERTILSSON et al., 2002;CHOI et al., 1996; CLARRIDGE, 2004; KATAOKA et al., 1997; LU et al., 2000; MARCHESI et al.,1998; MAYNARD et al., 2005; ROTHMAN et al., 2002; YANG et al., 2002; VAN DE,et al.,1996). As regiões hipervariáveis são flanqueadas por sequências conservadas na maior parte das bactérias, o que permite a amplificação por PCR das sequências alvo, utilizando iniciadores universais (BAKER et al., 2003; LU et al., 2000; McCABE et al., 1999; MUNSON et al., 2004).

As sequências geradas pelo pirosequenciamento foram analisadas pelo programa computacional Mothur (SCHLOSS et al., 2009). As OTUs (Unidade Taxonômica Operacional) obtidas por meio do alinhamento dos fragmentos do gene 16S rDNA, foram classificadas utilizando-se os índices de similaridade de 97%, valor normalmente usado para espécies, de 95% como uma aproximação para gênero e maior ou igual a 80% para filo (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2005; BORNEMAM e TRIPLETT, 1997).

O uso da OTU é apropriado para comparar a riqueza relativa quando sequências do gene 16S rDNA são avaliadas utilizando a mesma região no gene (STACH et al., 2003). A riqueza e a diversidade de espécies dependem, além da própria natureza da comunidade, do esforço amostral despendido, uma vez que o número de espécies aumenta com o aumento do número de indivíduos amostrados. O conceito de diversidade envolve dois parâmetros: riqueza, que é a quantidade de espécies, e abundância relativa, que é a quantidade de indivíduos de uma determinada espécie (DIAS, 2004).

Os estimadores não-paramétricos utilizados neste estudo foram os índices Chao1 e o estimador ACE (Abundance based Coverage Estimator), ambos são apropriados para estimar a diversidade das amostras das comunidades microbianas (CHAO, 1987; BREITBART et al., 2002). A estimativa de Chao1 é largamente empregada em estudos ecológicos e de diversidade. O método extrapola o número de OTU observadas (Sobs) a partir da relação entre as OTUs observadas uma única vez e aquelas observadas em duplicata.

O índice de Shannon é uma medida matemática da diversidade de espécies em uma comunidade. Os índices de diversidade fornecem informações sobre a composição da comunidade, consideram a riqueza e a abundância relativa das diferentes espécies. Este índice deriva da teoria da informação e o valor obtido é uma medida da incerteza. Quanto maior seu valor, mais diversa a comunidade se apresenta (PINTO-COELHO, 2006).

A estimativa da riqueza (Chao1 e ACE) e diversidade (Shannon) da comunidade bacteriana da rizosfera do guaranazeiro, sugerem maior riqueza e diversidade na comunidade bacteriana da rizosfera do guaranazeiro sadio, quando comparado à rizosfera do guaranazeiro doente. A alta porcentagem detectada pelo índice de cobertura estimada das amostras, 93% para a microbiota da rizosfera do guaranazeiro doente e 90% do sadio, também foi satisfatória e confirmados pela análise de rarefação (KREBS, 1998).

Com o objetivo de conferir se o esforço amostral realizado foi o suficiente para capturar os grupos mais abundantes e para inferir o quão diverso é cada uma das amostras, as sequências foram analisadas por meio da curva de rarefação. As curvas de rarefação resultantes, com dissimilaridade de 3% como critério de OTU (para cada grupo das amostras da rizosfera do guaranazeiro doente e sadio), apresenta a tendência à estabilização, indicando que o número das sequências amostrou satisfatoriamente a comunidade bacteriana da rizosfera do guaranazeiro. Quando a curva estabiliza, ou seja, nenhuma espécie nova é adicionada, significa que a riqueza total foi obtida. A partir disso, novas amostragens não são necessárias (BEGON, 2006).

Construir uma curva de rarefação consiste em fracionar aleatoriamente e repetitivamente uma amostra para que a média do número de espécies encontradas em cada subamostra possa ser calculada (HUGHES et al., 2001; YOUSSEF e ELSHAHED, 2009). O resultado da rarefação pode ser usado para estimar, de forma aproximada, quantas OTUs adicionais seriam provavelmente descobertas ao dobrar o número de sequências. A curva de rarefação pode ser usada como indicativo da diversidade da comunidade e também da cobertura desta diversidade obtida através do esforço amostral. Além disso, permite avaliar o quanto um estudo se aproxima de capturar todas as espécies do local (HUSON, et al., 2009).

O diagrama de Venn evidenciou que ocorrem gêneros comuns aos dois estados fisiológicos do guaranazeiro (doente e sadio). Na condição de planta sadia, o número de filotipos foi superior em relação ao guaranazeiro doente. Estes resultados confirmam os índices de riqueza e diversidade e a classificação taxonômica obtidos neste estudo.

Com a classificação taxonômica, a partir das OTUs geradas das amostras da rizosfera do guaranazeiro doente e sadio, observou-se que o Filo *Bacteroidetes* é predominante nas duas condições fisiológicas do guaranazeiro, seguido pelo Filo Proteobactéria e em terceira posição o Filo Acidobactéria. Em menor proporção estão os grupos dos *Chloroflexi* e *Firmicutes*.

Estudos demonstram que a comunidade bacteriana do filo *Bacteroidetes* é modificada de acordo com a profundidade do solo e são abundantes nos locais próximo à superfície do solo, oceanos e água doce. Seja qual for o seu meio ambiente, verifica-se que a função biológica dos *Bacteroidetes* quer como simbiote, ambiental, ou agentes patogênicos, está relacionada com a degradação de biopolímeros complexos (THOMAS, et al., 2011; WILL, et al., 2010). Além disso, tem sido relatado que eles são importantes contribuintes para utilização de nutrientes no solo (YOUSUF, et al., 2012). Os genes envolvidos na desnitrificação foram encontrados indicando um possível envolvimento com o ciclo do nitrogênio (VAN SPANNING, et al., 2005). Porém, a função exata dos representantes dos *Bacteroidetes* na rizosfera ainda está sendo esclarecida (BERNARDET & NAKAGAWA, 2006; REICHENBACH, 2006).

No Filo *Bacteroidetes* os gêneros *Taibaiella* (*Chitinophagaceae*) e *Mucilaginibacter* foram dominantes e estão presentes nas duas condições fisiológicas do guaranazeiro. Porém, na rizosfera do guaranazeiro doente a frequência relativa de *Tabaiella* foi superior (24%), quando comparada ao guaranazeiro sadio (7%). Por outro lado, observou-se a predominância do gênero *Mucilaginibacter* (*Sphingobacteriaceae*) na rizosfera do guaranazeiro sadio que apresentou a frequência relativa de 51% e 17% em plantas doentes.

O gênero *Taibaiella* apresenta três espécies que foram isoladas das amostras de solo. Os *Mucilaginibacter* estão presentes na água, nas rizosferas de diferentes plantas, no solo e possuem 15 espécies descritas. As bactérias que pertencem aos gêneros *Tabaiella* e *Mucilaginibacter* são Gram negativas, aeróbias obrigatórias, as enzimas catalase e oxidase são ativas. Apresentam como lipídeo principal o fosfatidiletanolamina e a menaquinona é o MK-7. Os *Tabaiellas* produzem o pigmento flexirrubina (SON HM, et al., 2014; TAN, et al., 2014; ZHANG, et al., 2013).

Os *Bacteroidetes* presentes somente na rizosfera do guaranazeiro doente pertencem aos gêneros *Chryseobacterium* (Flavobacteriaceae), *Flavobacterium* (Flavobacteriaceae), *Pedobacter* (Sphingobacteriaceae) e *Sphingobacterium* (Sphingobacteriaceae).

Os representantes do gênero *Chryseobacterium*, são bactérias Gram negativas, aeróbica, têm sido encontrados no solo, nas rizosferas de diferentes plantas, no intestino dos peixes, em água potável, sedimentos marinhos e de água doce, em bebidas fermentadas e em produtos lácteos. Até o momento 90 espécies já foram descritas (DU J, et al., 2015).

O gênero *Pedobacter* está presente em diferentes ambientes sob várias condições climáticas, que vão do frio às regiões temperadas. As 35 espécies descritas foram isoladas de diferentes ambientes, incluindo solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo (YOON, et al., 2006, 2007; TEN, et al., 2006; JEON et al, 2009) em geleiras (MARGESIN *et al.*, 2003; SHIVAJI et al, 2005; MARGESIN & SHIVAJI, 2011; ZHOU et al., 2012), em água doce (AN, et al. 2009; MUURHOLM, et al., 2007) e também em lodo (STEYN, et al., 1998). Todos os membros são bacilos Gram negativos, aeróbios obrigatórios, com menaquinona 7 (MK-7) como a principal quinona respiratória. Outras características dos membros deste gênero é a presença das enzimas catalase, oxidase e fosfatase, enquanto que a redução de nitrato, a fermentação da glicose, produção de urease, indol a partir de triptofano e H<sub>2</sub>S de tiosulfato estão ausentes. O fosfatidiletanolamina é o lipídeo principal. São móveis por deslizamento e são desprovidos do pigmento flexirrubina (URIOS, et al., 2013).

Os membros do *Flavobacterium* estão presentes em ambientes terrestres, água doce e marinho. São bactérias Gram-negativas, não-móveis e móveis, em forma de bastonete, que consiste de dez espécies reconhecidas, várias espécies são conhecidas por causar doenças em peixes de água doce ().

O seqüenciamento genômico de representantes dos grupos dos *Bacteroidetes* confirma a presença de enzimas que degradam diferentes substratos (matéria orgânica de elevado peso molecular, isto é, proteínas e açúcares) de origem vegetal, algas e animal. Além disso, o genoma dos *Bacteroidetes* parece ser versátil. Frequentemente reorganiza-se por meio de

rearranjos genéticos, duplicações de genes e transferências de genes laterais (LGT), um recurso que pode ter contribuído para a sua adaptação a diversos ambientes (FRANÇOIS THOMAS, et al., 2011).

No Filo das *Proteobactérias* os gêneros comuns aos dois estados fisiológicos das plantas, está representado pelas *Pseudomonas* e na rizosfera do guaranazeiro sadio foram encontrados: *Rhizomicrobium* (Rhizobiales\_Incertae\_Sedis), *Acidicaldus* (Acetobacteraceae), *Sphingomonas* (Sphingomonadaceae) e *Rhodoplanes*.

Na rizosfera do guaranazeiro doente, o gênero *Pseudomonas* apresentou maior frequência relativa (9%) quando comparado ao sadio (3%). WEINERT, et al., 2011, observaram que as *Pseudomonas* estão envolvidas no combate contra patógenos. Em estudos anteriores, foi observado que representantes desse gênero são responsáveis pela produção de alguns compostos com propriedades antifúngicas, com capacidade de interferir diretamente no fator de patogenicidade de alguns grupos de fungos induzindo a resistência sistemática na planta hospedeira (HAAS; DEFAGO, 1990).

O gênero *Acidicaldus* apresenta uma única espécie descrita (*Acidicaldus organivorans*), é termofílico com temperatura ótima para o crescimento entre 50 e 55°C e pH entre 2,5 e 3,0. Tem capacidade de crescer heterotróficamente em diferentes substratos orgânicos, incluindo vários monossacarídeos, álcool, aminoácidos, fenol e em condições aeróbias e anaeróbias utilizam o ferro férrico comoceptor terminal de elétrons (JOHNSON, et al., 2006).

O *Rhizomicrobium* apresenta duas espécies descritas, *Rhizomicrobium palustre* e *Rhizomicrobium electricum*. São bactérias Gram-negativas, não formadora de esporos, se reproduzem por brotamento, as enzimas catalase e oxidase estão ausentes. São anaeróbios facultativos. A temperatura ótima de crescimento é de 30 ° C, o pH ótimo é de 6,7. Os principais produtos da fermentação da glicose são o lactato, acetato e fumarato. Utilizam o oxigênio, nitrato, Fe (III) e fumarato como aceptores de elétrons, na presença de glicose. A quinona respiratória predominante é a ubiquinona Q-10 (ATSUKO UEKI, et al., 2010; KODAMA e WATANABE, 2011).

As *Sphingomonas* apresentam 89 espécies descritas, são bactérias Gram negativas, aeróbica, flagelada e apresentam o esfingolípido como principal lipídio. Estão presentes em diferentes locais: em ambiente hospitalar, no solo, na rizosfera, em sedimentos, na água doce e ambiente marinho (LEYS, et al., 2004).

As bactérias do gênero *Rhodoplanes* são Gram-negativas, tem forma de bastonete, são fototróficas, apresentam os pigmentos fotossintéticos bacterioclorofila e carotenóides, já

foram isoladas do solo e rizosfera. A ubiquinona-10, erodoquinona-10 estão presentes como quinonas primárias. Os lipídeos fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina foram os principais lipídios polares e pequenas quantidades de lipídios, aminoácidos não identificados também estão presentes (SRINIVAS, et al., 2014).

O único representante da *Actinobacteria* foi o gênero *Acidothermus* (*Acidothermaceae*) presente nas rizosferas do guaranazeiro doente e sadio. São bactérias Gram-positivas com características termofílicas e não cresce abaixo de 37° C (MOHAGHEGHI et al., 1986; RAINEY e STACKEBRANDT, 1993).

Embora seja considerado como um dos filos bacterianos mais abundantes encontrado no solo (BARNES, et al., 2007), na rizosfera do guaranazeiro, o Filo Acidobacteria assumiu a terceira posição correspondendo a 10% em rizosfera do guaranazeiro sintomático e 17% nos assintomáticos. Verificou-se a presença dos gêneros *Candidatus Koribacter* e *Granulicella* ambos pertencem a Família *Acidobacteriaceae* e estão presentes nos dois sistemas do guaranazeiro (doente e sadio). O gênero *Candidatus Koribacter* são bactérias capsuladas, heterotróficas, aeróbicas, Gram-negativas e o crescimento ocorre em diferentes açúcares e ácidos orgânicos (SAIT et al., 2002).

Os representantes da *Granulicella* são bacilos Gram-negativos, são bactérias anaeróbicas, heterotróficas. São acidófilas com crescimento em pH na faixa de 3,0 a 7,5 (pH ótimo de 3,8 a 4,5) e temperatura que varia de 2 a 33°C (15-22° C é o ideal). A principal menaquinona é a MK-8. O pigmento produzido é o carotenóide (MANNISTO, et., al 2012).

Nos estudos realizados, com diferentes cultivares, foi observado que na presença do patógeno surgem grupos específicos de bactérias na rizosfera. Por exemplo, no estudo metagenômico do microbioma da rizosfera da beterraba, observou-se que em plantas, assim como em humanos, animais e insetos, pode ocorrer a dependência de membros específicos da comunidade microbiana para a proteção contra doenças. Detectou-se que o nível da supressão da doença contra o patógeno de planta *R. solani* não está associado à riqueza de *taxa* bacteriano, ou seja, pela presença ou ausência de espécies selecionadas, mas é determinado pela abundância relativa de grupos bacterianos específicos, como exemplo os membros da *Pseudomonadaceae*, foram identificados como ativos durante a supressão da doença em beterraba (MENDES KRUIJT, et al., 2011).

A análise filogenética da comunidade bacteriana da rizosfera de três cultivares de batata, em dois diferentes solos demonstrou que as plantas são capazes de alterar as comunidades bacterianas da rizosfera quando atacadas por patógenos, ou seja, possuem um sistema de recrutamento de microrganismos protetores e também há uma relação do

microrganismo com o genótipo da planta (WEINERT, et al 2011). Além disso, á medida que as raízes das plantas se desenvolvem no solo, elas são capazes de influenciar a comunidade microbiana por meio da liberação de exsudados, fazendo com que a rizosfera seja caracterizada por uma comunidade microbiana selecionada (BERENDSEN, et al., 2012; CHAPARRO, et al., 2012).

A microbiota da rizosfera de *Arabidopsis* foi analisada e 81 transcritos foram expressos em diferentes fases de desenvolvimento da planta. Um dos genes envolvidos na síntese da estreptomicina foram significativamente induzidos em fase de floração, provavelmente para supressão da doença. Estes resultados sugerem que a planta pode selecionar um subconjunto de microrganismos, provavelmente para funções específicas, em diferentes fases de desenvolvimento da planta (CHAPARRO, et al., 2014).

Os estudos sobre a diversidade taxonômica e funcional das comunidades de solo e rizosfera associadas a soja, permitiu visualizar uma comunidade específica que habita a rizosfera baseando-se em atributos funcionais, os quais podem estar relacionados com benefícios à planta, como promoção do crescimento e nutrição. Esse processo de seleção segue a teoria de nicho, indicando o poder de seleção da planta e de outras variáveis ambientais em moldar as comunidades microbianas tanto de forma taxonômica quanto funcional (MENDES, 2014)

Acredita-se que as plantas secretam compostos específicos, exsudato da raiz, nas diferentes fases de desenvolvimento da planta o que influencia na microbiota da rizosfera. Tal característica, foi evidenciada ao analisar os exsudatos coletados de sementes, mudas e raízes de tomate (*Lycopersicon esculentum*), pepino (*Cucumis sativus*) e pimentão (*Capsicum annuum*). Verificou-se os ácidos orgânicos predominantes (ácido cítrico, ácido succínico e ácido málico) e a capacidade das rizobactérias para crescerem *in vitro*, sendo o ácido cítrico como a única fonte de carbono. Isto indica que as espécies de plantas podem selecionar bactérias e correlacionar a capacidade de colonização da raiz a partir da produção de exsudatos radiculares específicos (KAMILOVA, 2006).

No microbioma da rizosfera do guaranazeiro destacaram-se quatro Filos bacterianos que foram: os Bacteroidetes, Proteobacteria, Acidobactéria, Actinobacteria, porém em diferentes frequências e proporções. Quanto aos gêneros dominantes, existem grupos encontrados apenas na rizosfera do guaranazeiro doente (*Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Sphingobacterium*), outros gêneros presentes somente em plantas saudáveis (*Rhizomicrobium*, *Acidicaldus*, *Sphingomonas* e *Rhodoplanes*) e gêneros que são comuns á

rizosfera do guaranazeiro doente e sadio (*Pseudomonas*, *Taibaiella*, *Mucilaginibacter*, *Candidatus Koribacter*, *Granulicella* e *Acidothermus*).

A interação entre os gêneros *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, e *Sphingobacterium* foi verificada na rizosfera da soja. Os membros destes grupos alcançaram maiores frequências, quando cultivados em conjunto com *Bacillus cereus* e os resultados foram comparados a cultura pura. O aumento da frequência de *F.johnsoniae*, por exemplo, foi devido ao uso do peptídeoglicano produzido por *B.cereus* como fonte de carbono. Em contrapartida *F.johnsoniae* impediu a eliminação de *B.cereus* pela ação das *Pseudomonas*. Observaram também ao nível molecular, a presença de um composto produzido por *Chryseobacterium* que ativa o promotor regulado pela acil-homoserina-lactose (AHLs) caracterizando o mecanismo "quorum sensing" existente entre as bactérias (GUAN, et al., 2008).

Os representantes do gênero *Flavobacterium* encontrados na rizosfera do guaranazeiro doente não foram abundantes, porém, os estudos anteriores realizados com este gênero revelam algumas funções importantes desse grupo de bactérias, presentes no solo e rizosfera. Parece que desempenham um papel importante na degradação e aumento da matéria orgânica e são abundantes nas rizosferas de culturas agrícolas. Determinados estudos sugerem que estão associados com a resistência das plantas à doença. Entretanto, o mecanismo ainda não é conhecido (GRABER ER, et al., 2010; KOLTON M, et al.,2011; SANG MK, KIM KD,2012). As análises bioquímicas de *Flavobacterium* sp. F52 comprovaram o envolvimento dos representantes deste grupo, com a promoção de crescimento, proteção e atividade de quitinase extracelular em plantas. O sequenciamento genômico identificou mais de 20 genes associados com a degradação da quitina e genes envolvidos no metabolismo de açúcares complexos (MAX KOLTON, et al.,2012).

Os gêneros acessados somente em rizosfera do guaranazeiro sadio apresentam algumas funções descritas na literatura especializada. Por exemplo, o estudo realizado com representantes dos *Rhizomicrobium* quando cultivados em culturas puras, revelou que os membros deste gênero apresentam a capacidade de gerar correntes elétricas durante o processo de oxidação de metabólitos intermediários, tais como: lactato e acetato (Kodama & Watanabe, 2008). Por outro lado, as bactérias do gênero *Rhodoplanes* participam do processo de fixação do nitrogênio (OKAMURA, et al., 2009). Quanto ao gênero *Acidicaldus*, nenhum relato sobre a função que desenvolve no ambiente é citada. Enquanto que os estudos realizados com as *Sphingomonas* demonstram que os representantes deste gênero apresentam ampla capacidade catabólica para a degradação de poluentes orgânicos (hidrocarbonetos),

podendo ser utilizados para biorremediação (ZHANG, et al., 2014). Estudos utilizando o genoma de *Sphingomonas wittichii* RW1, estão sendo realizados para análise da expressão de genes envolvidos com o processo da degradação de poluentes (MORENO-FORERO, et al., 2015).

A presença das *Pseudomonas* (presente nas duas condições fisiológicas do guaranazeiro), pode estar relacionada com a função do combate a patogenicidade. Os estudos realizados com algumas linhagens de *P. fluorescens* apresentaram atividade antagônica contra o fitopatogênico *Colletotrichum falcatum*, estas linhagens foram avaliadas quanto à produção de enzimas quitinolíticas, correlacionando a atividade antifúngica destas bactérias à sua produção de quitinase (VISWANATHAN e SAMIYAPPAN, 2004). Além disso, as *Pseudomonas* são capazes de disponibilizar fósforo para absorção pelo vegetal através da mineralização de fosfato orgânico ou solubilização de fosfato inorgânico. Entre os principais exemplos de bactérias solubilizadoras de fosfato estão os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* (RODRIGUEZ & FRAGA 1999). Devido a sua importância como solubilizador de fosfato, 443 linhagens do gênero *Pseudomonas* associadas a solos rizosféricos de banana (*Musa* spp.) e arroz (*Oryza sativa* L.) foram testadas, sendo que destas 18% se mostraram capazes de solubilizar fosfato *in vitro* (NAIK, et al., 2008).

O gênero *Acidothermus* possui representantes nas rizosferas do guaranazeiro doente e sadio. Devido a importância desse gênero, como microrganismos com capacidade para degradar a matéria lignocelulósica da planta, o genoma de *A. cellulolyticus* foi sequenciado por outros autores. Como resultado do sequenciamento do genoma, 43 genes que codificam 35 hidrolases glicosídicas e enzimas esterases de hidrato de carbono foram identificados. Apresentam atividade enzimática em carboidratos estruturais ou de armazenamento encontrados nas plantas e fungos, incluindo celulose, xilanas, amido, e quitina. Este repertório diverso das enzimas de degradação da biomassa, eleva o valor industrial deste microrganismo. Esforços estão em andamento em todo o mundo para desenvolver fontes de energia renováveis como alternativas aos combustíveis fósseis. Uma fonte de bioenergia, é de interesse biotecnológico para converter biomassa em biocombustíveis (BARABOTE, et al., 2009).

O gênero *Candidatus Koribacter* presente nas duas condições fisiológicas do guaranazeiro (doente e sadio), está relacionado com a doença do citrus. Os estudos de diversidades utilizando diferentes hospedeiros e avaliação do fenótipo estão sendo realizados em diferentes hospedeiros que buscam avaliar as diferenças entre genomas de diferentes isolados. Para tanto, algumas regiões do genoma têm sido particularmente úteis, como o gene

da proteína ribossomal 16S, os espaçadores da região entre os genes ribossomais 16S e 23S (JAGOUIEUX et al., 1994, 1997; SUBANDIYAH et al., 2000; COLETTA-FILHO et al., 2005; OKUDA et al., 2005). O gene *Omp* que codifica a proteína de membrana *Omp* (outer membrane protein) (BASTIANEL et al., 2005), o cluster gênico *nus G-rpl KAJL-rpoB* (VILLECHANOUX et al., 1993; OKUDA et al., 2005; LIN et al., 2010), e uma região do gene da DNA polimerase de bacteriófago foram utilizados como marcadores genéticos (TOMIMURA et al., 2009).

Os representantes do gênero *Granulicella* presente nos dois sistemas do guaranazeiro (doente e sadio), possuem capacidade para hidrolisar pectina, xilano, laminarina, liquenana, amido, celulose e lignina. Há indícios de que os representantes desse gênero participam no ciclo do carbono (PANKRATOV, et al., 2010).

O papel específico dos gêneros *Taibaiella*, *Mucilaginibacter* e *Pedobacter*, que predominaram a microbiota da rizosfera do guaranazeiro, até o momento não é conhecido.

De acordo com os estudos prévios realizados com os gêneros acessados na rizosfera do guaranazeiro, é possível entender a função que eles exercem no microbioma da rizosfera. Por exemplo, apresentam a capacidade de proteção contra patógenos, realizam a solubilização do fosfato, participam no ciclo do carbono, atuam na fixação do nitrogênio, apresentam a capacidade de degradação da biomassa e de poluentes, e também realizam a hidrólise de polissacarídeos complexos (o que resulta em monômeros de glicose, um importante precursor para diferentes vias metabólicas). Existem grupos de bactérias que não foram classificadas e as suas funções não são conhecidas.

Considerando a importância dos gêneros acessados, é provável que a ausência, a diminuição da frequência e o surgimento dos gêneros exclusivos da rizosfera do guaranazeiro doente, possa estar relacionada com a presença do patógeno *Collethotrichum guaranicola* que desencadeou a alteração na microbiota da rizosfera, gerando maior diversidade e riqueza à rizosfera do guaranazeiro sadio.

Estudos demonstram que as bactérias não se comportam como células individuais e solitárias, mas como microrganismos coloniais que exploram sistemas elaborados sendo capazes de captar informações originadas por plantas e por outras bactérias, indicando assim a existência de uma interação e comunicação entre células (WHITEHEAD et al., 2001; BAI & RAI, 2011). Esta interação ou mecanismos de percepção e resposta empregados pelas bactérias, denominado quorum sensing, caracteriza-se pela liberação de sinais químicos secretados a partir de células, capazes de induzir diversas alterações como a regulação da

expressão de genes dependentes da densidade celular (MILLER & BASSLER, 2001; KELLER & SURETTE, 2006).

O sistema de sinalização (Quorum Sensing), já foi identificado em muitos gêneros bacterianos e se baseia na capacidade destes agentes em monitorar a presença de outras bactérias ao seu redor, pela produção e resposta a moléculas sinalizadoras, conhecidas como autoindutores. Estas pequenas moléculas são detectadas por receptores específicos e permitem que as células avaliem o tamanho da população através da concentração de sinais. Quando esta sinalização atinge o nível crítico, os microrganismos passam a agir como um único organismo multicelular, sendo capaz de organizar respostas unificadas favoráveis a sobrevivência da população (FUQUA, et al., 2001; RUMJANEK, et al., 2004; PINTO, 2005; AMMOR, et al., 2008).

Vários estudos estão sendo realizados na tentativa de entender a comunicação entre microrganismos, elucidar os mecanismos de interação entre procariotos e eucariotos, a formação de biofilmes, produção de bacteriocinas, fatores de virulência de patógenos de plantas e animais, biossíntese de antibióticos e no mecanismo do "quorum sensing" (PINTO et al., 2007; AMMOR et al., 2008; ESPER, 2010).

## CONCLUSÕES

- A presença do fungo *Colletotrichum* pode estar relacionada com a alteração na microbiota da rizosfera do guaranazeiro.
- A microbiota da rizosfera do guaranazeiro sadio apresentou maior diversidade e riqueza em relação a rizosfera do guaranazeiro doente.
- Quatro Filos bacterianos foram identificados: *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Acidobactéria*, *Actinobacteria*
- O Filo *Bacteroidetes* foi predominante nas duas condições fisiológicas do guaranazeiro (sadio e doente)
- Os gêneros acessados apenas na rizosfera do guaranazeiro doente foram: *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Pedobacter*, *Sphingobacterium*
- Os gêneros presentes somente em plantas sadias foram representados pelos *Rhizomicrobium*, *Acidicaldus*, *Sphingomonas* e *Rhodoplanes*.
- Os gêneros comuns á rizosfera do guaranazeiro doente e sadio foram: *Pseudomonas*, *Taibaiella*, *Mucilaginibacter*, *Candidatus Koribacter*, *Granulicella* e *Acidothermus*

## REFERÊNCIAS

- AMMOR, M. S.; MICHAELIDIS, C.; NYCHAS, G. J. Insights into the role of quorum sensing in food spoilage. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 71, n. 7, p. 1510-25, jul./2008.
- AN, D. et al. *Pedobacter daechungensis* sp. nov., from freshwater lake sediment in South Korea. **Int J Syst Evol Microbiol** 59, 69–72,2009.
- ALBUQUERQUE, F.C. Antracnose do guaraná. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/ **Serviço de Informação Agrícola**, 22p,1961.
- ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, p. 417-432, 2009.
- ASHELFORD, K. E.; CHUZHANOVA, N. A .; FRY, J. C.; JONES, A . J.;WEIGHTMAN, A. J. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. **Applied and**
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR. W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, p. 40-65, 2000.
- BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Kew. CAB International, 1992.
- BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial Quorum Sensing and Food Industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 183-193, May/ 2011.
- BAIS, H.P.;et al. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 2333-266, 2006.
- BAKER, G. C.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 541-555,2003.
- BARABOTE, R.D. et al. Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidothermus cellulolyticus* 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations. **Genome Res.**19(6): 1033–1043,2009.
- BAREA, J.M. et al. Microbial cooperation in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 417, p. 1761- 1778, 2005.
- BARNS, S.M. et al. Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. **Appl Environ Microbiol**, **73**:3113-6,2007.

- BASTIANEL, C. et al Diversity of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*,” based on the *omp* gene sequence. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 6473-6478, 2005.
- BECKER, K. et al. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. **J Clin Microbiol** 2004;42:4988–95.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C.R.; HARPER, J.L. . **Ecology**: from individuals to ecosystems. 4. ed. Malden: Blackwell Publishing, 738 p, 2006.
- BENTES, J.L.S.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em clones resistente e suscetível. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 71-77, 2002.
- BERENDSEN, R.L.; PIETERSE C.M, Bakker PA.. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends Plant Sci** 17: 478–486, 2012
- BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R.A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 51, p. 215–229, 2005.
- BERGESTROM, G.C.; NICHOLSON, R.L. The biology of corn anthracnose – Knowledge to exploit for improved management. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 83, p. 596-608, 1999.
- BERNARDET, J.F.; NAKAGAWA, Y. An introduction to the family of Flavobacteriaceae. **Prokaryotes** 7, 455–480,2006.
- BERTILSSON, S.; CAVANAUGH, C.M.; POLZ, M.F. Sequencing-independent method to generate oligonucleotide probes targeting a variable region in bacterial 16S rRNA by PCR with detachable primers. *Appl Environ Microbiol*;68:6077–86. 2002.
- BOHANNAN, B. J.; HUGHES, J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 282–287. 2003.
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from eastern amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, n.7, p. 2647-2653, 1997.
- BREITBART, M.; SALAMON, P.; ANDRESEN, B.; MAHAFFY, J. M.; SEGALL, A.M.; MEAD, D.; AZAM, F. ROHWER, F. Genomic analysis of uncultured marine viral communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99,p. 14250-14255. 2002.
- BROSIUS, J.; PALMER M.L.; KENNEDY P.J.; NOLLER H.F. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1978;75:4801–5.

- BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 105, n. 4, p. 329-348,1998.
- BUCKLEY, D. H. & SCHMIDT, T. M. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42,p. 11-21, 2001.
- CAMPOS, M.P.O. et al Guarana (*Paullinia cupana*) improves Fatigue in Breast Cancer Patients Undergoing Systemic Chemotherapy. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 17, p; 505-512, 2011.
- CAVALCANTE, V. AND DOBEBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with the sugarcane. **Plant Soil**. 108, p. 23-31. 1988
- CHAPARRO,J.M. et al. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development **The ISME Journal** , 8, 790–803, 2014.
- CHAPARRO, J.M. et al. Root exudation of phytochemicals in Arabidopsis follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soilmicrobial functions. **PLoS One** 8: e55731,2013.
- CHAPARRO, J.M. et al. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. **Biol Fertil Soils** 48:489–499, 2012.
- COSTA NETO, P.Q. Caracterização molecular de fungos endofíticos e patogênicos *Colletotrichum* ssp. isolados de guaranazeiro (*Paullinnia cupana* var. *sorbilis* H.B.K. (Mart.) Ducke). 2009. 108p. Tese (Doutorado em Biotecnologia, área de concentração: Conservação e Uso de Recursos Genéticos Microbianos da Amazônia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.
- CHAO, A.; LEE, S.M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal of American Statistical Association.**, n. 87, p. 210–217, 1992.
- CHAO, A. Estimating the population size for capturerecapture data with unequal catchability. **Biometrics**, v. 43, p. 783-791, 1987.
- CHOI, B.K.; WYSS, C.; GOBEL, U.B. Phylogenetic analysis of pathogen-related oral spirochetes. **J Clin Microbiol**; 34:1922–5, 1996
- CHAKRAVORTY, S.; PATHAK, D.; DUDEJA, M.; HALDAR, S.; HANIF, M.; TYAGI J.S. PCR amplification of shorter fragments from the devR (Rv3133c) gene significantly increases the sensitivity of tuberculosis diagnosis. **FEMS Microbiol Lett**; 257:306–11,2006
- CLARRIDGE, J.E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clin Microbiol Rev**;17:840–62, 2004
- COLE, J. R.; et al The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucl. Acids Res.**, v. 37(suppl 1) p. D141-D145,2009.

- COLETTA-FILHO, et al. Analysis of 16S rDNA sequences from citrus Huanglongbing bacteria reveal a different *Ca. Liberibacter* strain associated with citrus disease in São Paulo. **Plant Disease** 89: 848-852, 2005.
- COLWELL, R. K., C. X. MAO, & J. CHANG. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. **Ecology**, v. 85, p.2717-2727, 2004.
- DE ANGELIS, K. M.; E. L. Brodie, et al.. "Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots." **The ISME Journal** 3(2): 168-178, 2008.
- DOORNBOS, R. et al. (2012) Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agron.Sustain.Dev.* 32, 227–243
- DE SANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 5069-5072, 2006.
- DIAS, S. C. Planejando estudos de diversidade e riqueza: uma abordagem para estudantes de graduação. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 373-379, 2004.
- DU, J, et al. *Chryseobacterium solani* sp. nov. isolated from field-grown eggplant rhizosphere soil. **IJSEM International Journal of Systematic**. v.65, pt.5, 2015.
- EMBRAPA - CANA-DE-ACUCAR: UMA ALTERNATIVA DE ALIMENTO PARA ASECA <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/cot/COT73.html>> Acesso em 11 de julho de 2006.
- ESPER, L. M. R. *Enterobacter sakazakii* (Cronobacter spp.) and *Bacillus cereus*: quorum sensing, biofilm formation and efficacy of sanitizers. 2010. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas.
- EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.
- EWING, B. et al. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p. 175-185, 1998.
- FOGEL, G.B. et al. Prokaryotic Genome Size and SSU rDNA Copy Number: Estimation of Microbial Relative Abundance from a Mixed Population. 1999
- FELSENSTEIN, J. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6**. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, 2005.
- FREITAS, S.S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. **Microbiologia do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007. p. 1-20.
- GONZALEZ, J. M.; ZIMMERMANN, J.; SIZ-JIMENEZ, C. Evaluating putative chimeric sequences from PCR-amplified products. **Bioinformatics**, v. 21, n. 3, p. 333-337, 2005.

- GRABER, E.R. et al. Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. **Plant Soil** 337:481–496,2010.
- GUAN,C. et al. Interaction Among Rhizosphere Bacteria . Snow Brook Peterson. A dissertatio submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy (Microbiology). **University of Wisconsin-Madison**, 2008.
- HAAS, D.; DEFAGO, G. **Soil biochemistry**.New York: Marcel Dekker,. v. 6,1990.
- HALL, T. A . BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HAZEN, T. C. et al. "Deep-Sea Oil Plume Enriches Indigenous Oil-Degrading Bacteria." **Science** 330(6001): 204-208, 2010.
- HEANEY S.P.; HALL A.A.; DAVIES S.A.; OLAYA G. Resistance to fungicides in the QoI-STAR cross-resistance group: current perspectives. **The BCPC Conference: Pest & Disease**, Brighton, v. 2, p. 755–762, 2000.
- HOLMES, B. The Genera *Flavobacterium*,*Sphingobacterium* and *Weeksella*. **The Prokaryotes** , p 539-54, 2006.
- HUBER, T.; FAULKNER, G.; HUGENHOLTZ, P. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. **BioinformaticsApplications Note**, v. 20, n. 14, p. 2317-2319, 2004.
- HUGENHOLTZ, P.; KELLER, K.; BRODIE, E. L.; LARSEN,N.; PICENO, Y. M.; PHAN, R. E ANDERSEN, G. L. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. **Nucleic AcidsResearch**, v. 34, p. W394-W399. 2006.
- HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Tibtech**, v. 14, p. 190-197,1996.
- HUGHES J. B.; HELLMANN J. J.; RICKETTS T. H. e BOHANNAN B. J. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4399-4406,2001.
- IBGE, Estado @ 2013. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/>> (acesso em 25.03.2013).
- JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud.**Sci. Nat.** 1908.
- JEON, Y.et al. *Pedobacter oryzae* sp. nov., isolated from ricepaddy soil. **Int J Syst Evol Microbiol** 59, 2491–2495, 2009.
- JOHANSSON, J.F.; PAUL L.R.; FINLAY R.D. Microbial *interactions* in the mycorrhizosphere *and* their significance for sustainable agriculture. **FEMS Microbiol. Ecol.** 48:1–13,2004.

JAGOUIEX, E.S.;BOVÉ, J.M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the  $\alpha$ -subdivision of the proteobacteria. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 44: 379-386,1994.

JAGOUIEX, E.S.;BOVÉ, J.M.; GARNIER,M. Comparison of the 16S/23S ribosomal intergenic region of *Candidatus Liberobacter asiaticum* and *Candidatus Liberobacter africanum*, the two species associated with citrus huanglongbing (greening) disease. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 47: 224-227,1997.

JOHNSON (D.B.), STALLWOOD (B.), KIMURA (S.) and HALLBERG (K.B.): Isolation and characterization of *Acidicaldus organivorus*, gen. nov., sp. nov.: a novel sulfur-oxidizing, ferric iron-reducing thermo-acidophilic heterotrophic *Proteobacterium*. *Arch. Microbiol.*, 2006, **185**, 212-221.

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

JANDA, J. M. & ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761-2764, 2007.

KAMILOVA, F. et al . Organic Acids, Sugars, and L-Tryptophane in Exudates of Vegetables Growing on Stonewool and Their Effects on Activities of Rhizosphere Bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 19, No. 3, pp. 250–256, 2006.

KATAOKA, M. et al. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. **FEMS Microbiol Lett**;151:249–55,1997.

KELLER, L.; SURETTE, M. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nature Reviews in Microbiology*, London,v. 4, n. 4, p.248-258, abr./ 2006.

KLAPPENBACH, J.A.; SAXMAN P.R.; COLE J.R.; SCHMIDT T.M.; rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res* 2001;29:181–4.

KODAMA,Y.;WATANABE,K. *Rhizomicrobium electricum* sp. nov., a facultatively anaerobic, fermentative, prosthecate bacterium isolated from a cellulose-fed microbial fuel cell. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** ,61, 1781-1785,2011.

KOLTON,M. et al. Draft Genome Sequence of *Flavobacterium* sp. Strain F52, Isolated from the Rhizosphere of Bell Pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Maccabi). **J. Bacteriol.** v.194 no. 19 5462-5463,2012.

KOLTON, M. et al. Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants. **Appl Environ Microbiol** 77: 4924-4930, 2011.

- KUMAR, A. et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. **Crit Care Med**;34:1589–1596, 2006.
- KREBS, C.J. **Ecological methodology**. 2nd ed. New York: Addison Wesley Longman, 620, 1998.
- LEY, R. E. et al. "Evolution of mammals and their gut microbes." **Science** 320(5883): 1647–1651, 2008.
- LEYS, N. et al. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Appl Environ Microbiol** 70: 1944–1955, 2004.
- LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. Microbiology of the Phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 1875–1883, 2003.
- LIN H, et al. Acquisition of uncharacterized sequences from ‘*Candidatus Liberibacter*’, an unculturable bacterium, using an improved genomic walking method. **Mol. Cell. Probes** 22: 30–37, 2008.
- LUDWIG, W. et al: A software environment for sequence data. **Nucleic Acids Research**. v. 32, n. 4, p. 1363–1371, 2004.
- LU. J.J.; PERNG, C.L.; LEE, S.Y.; WAN, C.C. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. **J Clin Microbiol**;38:2076–2080, 2000.
- MARGESIN, R. et al. *Pedobacter cryoconitis* sp. nov., a facultative psychrophile from alpine glacier cryoconite. **Int J Syst Evol Microbiol** 53, 1291–1296, 2003.
- MAGURRAN. A. E. **Ecological Diversity and its Measurement**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press; 1988.
- MARCHESI, J.R. et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Appl Environ Microbiol** 1998;64:795–799.
- MARCHETTI, G. et al. Evaluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin-fixed, paraffin embedded tissues: comparison of four amplification assays. **J Clin Microbiol** 1998;36:1512–1517.
- MAYNARD, C. et al. Waterborne pathogen detection by use of oligonucleotide-based microarrays. **Appl Environ Microbiol**;71:8548–8557, 2005.
- MALOY, S. Experimental techniques in bacterial genetics. Jones and Bartlett; Boston: 1989.
- MÄNNISTÖ (M.K.), RAWAT (S.), STAROVOYTOV (V.) and HÄGGBLÖM (M.M.): *Granulicella arctica* sp. nov., *Granulicella mallensis* sp. nov., *Granulicella tundricola* sp.

nov. and *Granulicella sapmiensis* sp. nov., novel acidobacteria from tundra soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2012, **62**, 2097-2106.

McCABE, K.M. Bacterial species identification after DNA amplification with a universal primer pair. **Mol Genet Metab.**66:205–211,1999.

MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COATA-MAIA, L; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A.M. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia, 2007. v. 1, p. 129-140.

MENDES, R. et al. "Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria." *Science* 332(6033): 1097-1100, 2011.

MENDES, W, et al. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **The ISME Journal**, 2014.

MÍLEO, L.J.; SILVA, J.F.; BENTES, J.L.S.; CHRISTOFFOLET, P.J. Plantas daninhas hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola* em cultivos de guaraná no estado do Amazonas. **Planta Daninha**, v. 25, p. 771-782, 2007.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, England, v.55, p.165-199, 2001.

MOHAGHEGHI, A. et al. Isolation and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* gen. nov., sp. nov., a new genus of thermophilic, acidophilic, cellulolytic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1986;36:435–443.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Rizosfera In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. Ed. Lavras: Editora UFLA, p. 407-447, 2006.

MORENO-FORERO, S. Genome-wide analysis of *Sphingomonas wittichii* RW1 behaviour during inoculation and growth in contaminated sand. **ISME J.** 9(1): 150–165, 2015

MUNSON, M.A.; BANERJEE, A.; WATSON, T.F.; WADE, W.G. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol*;42:3023–3029,2004.

MUURHOLM, S. et al *Pedobacter duraquae* sp. nov., *Pedobacter westerhofensis* sp.nov., *Pedobacter metabolipauper* sp. nov., *Pedobacter hartonius* sp.nov. and *Pedobacter steynii* sp. nov., isolated from a hard-water rivulet. **Int J Syst Evol Microbiol** 57, 2221–2227,2007.

NAIK, P.R.; RAMAN, G.; NARAYANAN, K.B.; SAKTHIVEL, N. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. **BMC Microbiol**, London. v. 8, p. 230, 2008.

NASCIMENTO FILHO, F.J. Interação genótipos x ambientes, adaptabilidade, estabilidade e repetibilidade em clones de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke). 199 p.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

NASCIMENTO FILHO, et al. Adaptabilidade e estabilidade de clones de guaraná. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.44, n.9, p.1138-1144, 2009.

NAWROCKI, E. P.; KOLBE, D. L.; EDDY, S. R. Infernal 1.0: inference of RNA alignments. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1335-1337, 2009.

NEHL, D. B.; KNOX, O. G. G. Significance of Bacteria in the Rhizosphere In: MUKERJI, K.; MANOHARACHARY, C.; SINGH, J. *Soil Biology: Microbial Activity in the Rhizosphere*. Berlin: Springer, p. 89-119, 2006.

NUBEL, U.; GARCIA-PICHEL, F.; KUHL, M.; MUYZER, G. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 422-443, 1999.

OKAMURA, K.; KANBE AND, T.; HIRAIISHI, A. *Rhodoplanes serenus* sp. nov., a purple non-sulfurbacterium isolated from pond water International. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 59, 531–535, 2009.

OKUDA, M. et al. Characterization of the *tufB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB* gene cluster of the citrus greening organism and detection by loop-mediated isothermal amplification. **Plant Disease**. 89: 705-711, 2005.

PACE, N. R. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. **ASM News**, v. 62, p. 463-470, 1996.

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

PANKRATOV, T.A.; DEDYSH, S.N. *Granulicella paludicola* gen. nov., sp. nov., *Granulicella pectinivorans* sp. nov., *Granulicella aggregans* sp. nov. and *Granulicella rosea* sp. nov., acidophilic, polymer-degrading acidobacteria from *Sphagnum* peat bogs. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 60, 2951-2959, 2010.

PEIFFER, J.A.; SPOR, A.; KOREN, O.; JIN, Z.; TRINGE, S.G.; DANGL, J.L.; BUCKLER, E.S.; LEY, R.E. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **PNAS**, v.110, n. 16, p.6548-6553, 2013.

PETROSINO, J.F. et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clin Chem** 55(5):856-66, 2009.

PETTI C.A.; POLAGE, C.R.; SCHRECKENBERGER P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. **J Clin Microbiol**; 43:6123–6125, 2005.

- PINTO-COELHO, R. M. **Fundamentos em ecologia**. Artmed Editora. Porto Alegre, 252p., 2006.
- PINTO, U. M.; VIANA, E. S.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Detection of acylated homoserine lactones in Gram-negative proteolytic psychrotrophic bacteria isolated from cooled raw milk. **Food control**, Guildford, v. 18, n. 10, p. 1322-1327, out. 2007.
- POTTER, M.C. Bacteria in their relation to plant pathology. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 3, p. 50-68, 1909.
- PRESTON FW, The commonness and rarity, of species. **Ecology**, v. 29 p. 254-283. 1948.
- PROSSER, J. I. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. **Plant and Soil**, v. 244, p. 9-17, 2002.
- PROSSER, J.I. et al. The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 384-392, 2007.
- RAINEY, A.; STACKEBRANDT, E. Phylogenetic evidence for the classification of *Acidothermus cellulolyticus* into the subphylum of actinomycetes. **FEMS Microbiol. Lett.**; 108:27–30, 1993.
- RASCHE, F.; et al. A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, p. 219-235, 2006.
- RYAN, R.P.; GERMAINE K.; FRANKS A.; RYAN D.J.; DOWLING D.N. Bacterial endophytes; recent developments and applications. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 278, p. 1–9, 2008.
- REICHENBACH, H. The order cytophagales. **Prokaryotes** 7, 549–590, 2006.
- RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**. v. 17, p. 319-339, 1999.
- ROLING, W. F. M.; HEAD, I. M. Prokaryotic systematics: PCR and sequence analysis of amplified 16S rRNA genes.
- ROSCH, L.F.W.; CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M. E TRIPLETT, E.W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant Soil**, v. 302, p. 91–104, 2008.
- ROSCH, L. F. W.; FULTHORPE, R. R.; RIVA, A.; CASELLA, G.; HADWIN, A.K.M. ; KENT, A.D. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME J.**, v.1, n. 4, p. 283-290, 2007.
- ROSCH, C.; EILMUS, S. E BOTHE, H.. Approaches to assess the biodiversity of bacteria in natural habitats. **Biochemical Society Transactions** . v. 34, p.169–173. 2006.

- ROSCH, C.; EILMUS, S.; BOTHE, H. Approaches to assess the biodiversity of bacteria in natural habitats. The 11th Nitrogen Cycle Meeting, 2005.
- ROSCH, C.; MERGEL, A.; e BOTHE, H. Biodiversity of Denitrifying and Dinitrogen-Fixing Bacteria in an Acid Forest Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3818–3829. 2002.
- ROTHMAN, R.E. et al. Detection of bacteremia in emergency department patients at risk for infective endocarditis using universal 16S rRNA primers in a decontaminated polymerase chain reaction assay. **J Infect Dis**;186:1677–1681, 2002.
- SAIT, M.; HUGENHOLTZ, P.; JANSSEN, P.H. Cultivation of globally-distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. **Environ. Microbiol.** 4:654-666, 2002.
- SANCHEZ, P.A.; VILLACHICA, J.H.; BANDY, D.E. Soil fertility dynamics after clearing a tropical rainforest in Peru. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.47, p. 1171-1178, 1983.
- SANFORD, JP. Hyde Park; Vermont, USA: 2003. The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy, Antimicrobial Therapy Incorporated.
- SANG M.K, KIM K.D. The volatile-producing *Flavobacterium johnsoniae* strain GSE09 shows biocontrol activity against *Phytophthora capsici* in pepper. **J Appl Microbiol** 113: 383-398, 2012.
- SANTOS, J.D.A. **Guaraná Proposta de Preço Mínimo**, CONAB p. 165-171, 2007.
- SCHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, p. 1135-1145, 2008.
- SCHLOSS, P. D. Evaluating different approaches that test whether microbial communities have the same structure. **The ISME Journal**, v. 2, p. 265-275, 2008.
- SCHLOSS, P. D. & HANDELSMAN, J. Toward a census of bacteria in soil. **PLOS Computational Biology**, v. 2, p. 786-793, 2006a.
- SCHLOSS, P. D. & HANDELSMAN, J. Introducing SONS, a tool for operational taxonomic unit-based comparisons of microbial community memberships and structures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 10, p. 6773-6779, 2006b.
- SCHLOSS, P. D. & HANDELSMAN, J. Introducing TreeClimber, a test to compare microbial community structures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2379-2384, 2006c.
- SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SCHLOSS, P. D.; LARGET, B. R.; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 5485-5492, 2004.

SCHLOSS, P.D. et al. Introducing Mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Appl Environ Microbiol.** v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SCHMALENBERGER, A.; SCHWIEGER, F.; TEBBE, C.C. Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. **Appl Environ Microbiol**;67:3557–3563, 2001.

SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas). **Informações de Mercado sobre Guaraná. Manual Operacional**, 56 p, 2005.

SELIM, A.S, BOONKUMKLAO P, Sone T, Assavanig A, Wada M, Yokota A. Development and assessment of a real-time PCR assay for rapid and sensitive detection of a novel thermotolerant bacterium, *Lactobacillus thermotolerans*, in chicken feces. **Appl Environ Microbiol** 71:4214–4219. 2005.

SHANNON, C.E.; WEAVER, W. The mathematical theory of communication. Urbana: **University Illinois Press**, 1949.

SIMBERLOFF, D. S. Properties of the rarefaction diversity Measurement. **American Naturalist.**, v. 106, p. 414-418, 1972.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, London, v. 163, p. 688, 1949.

SINGLETON, D. R.; FURLONG, M. A.; RATHBUN, S. L.; WHITMAN, W. B. Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4374–4376, 2001.

SHIVAJI, S. et al. *Pedobacter himalayensis* sp. nov., from the Hamta glacier located in the Himalayan mountain ranges of India. **Int J Syst Evol Microbiol** 55,1083–1088, 2005.

SKOW, A. et al. Species-level identification of staphylococcal isolates by real-time PCR and melt curve analysis. **J Clin Microbiol**;43:2876–2880,2005.

SMITH, C. J. (editors). Molecular microbial ecology. **Taylor & Francis Group**. New York, Chapter 2. 381p., 2005.

SRINIVAS, A.; SASIKALA,C.H.; RAMANA, C.H.V. *Rhodoplanes oryzae* sp. nov., a phototrophic alphaproteobacterium isolated from the rhizosphere soil of paddy. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 64, 2198-2203,2014.

SON, H. et al. *Taibaiella koreensis* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. **Int J Syst Evol Microbiol.**v. 64, p.1018-1023, 2014.

STACKEBRANDT, E.; WITT, D.; KEMMERLING C, KROPPENSTEDT R, Liesack W. Designation of Streptomyces 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes. **Appl Environ Microbiol**;57:1468–1477, 1991.

STACH, J. et al. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6189-6200, 2003.

STEYN, P. L. et al. Classification of heparinolytic bacteria into a new genus, *Pedobacter*, comprising four species: *Pedobacter heparinus* comb. nov., *Pedobacter piscium* comb. nov., *Pedobacter africanus* sp. nov. and *Pedobacter saltans* sp. nov. Proposal of the family Sphingobacteriaceae fam. nov. **Int J Syst Bacteriol** 48, 165–177,1998.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, Ohio, v. 67, p. 257-268, 2004.

STOHR, K.; HAFNER, B.; NOLTE, O.; WOLFRUM, J.; SAUER M, Herten DP. Species-specific identification of mycobacterial 16S rRNA PCR amplicons using smart probes. **Anal Chem**;77:7195–7203,2005.

SUBANDIYAH, S.;IWANAMI T.; TSUYUMU, S.; IEKI, H. Comparison of 16S rDNA and 16S/23S intergenic region sequences among citrus greening organisms in Asia. **Plant Disease**. 84: 15-18. 2000.

SUTTON, B.C.**The Genus *Glomerella* and it's anamorph *Colletotrichum***. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Eds). *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Wallingford, U.K.: CAB International, p. 1-26, 1992.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAN, X. et al. *Taibaiella chishuiensis* sp. nov., isolated from freshwater. **Int J Syst Evol Microbiol**. 64:1795-1801, 2014.

TEN, L. N. et al. *Pedobacter ginsengisoli* sp. nov., a DNase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field in South Korea. **Int J Syst Evol Microbiol** 56, 2565–2570, 2006.

THOMAS,F. et al.. Environmental and gut *Bacteroidetes*: the food connection. **Frontiers in Microbiology** Cellular and Infection Microbiology.v. 2, n.93,16,p. 2011

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **NucleicAcids Res.**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994a.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Improved sensitivity of profile searches through the use of sequence weights and gap excision. **Compt. Appl. Biosci.**, v. 10, p. 19-29, 1994b.

TOMIMURA, K. et al. Evaluation of genetic diversity among ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ isolates collected in Southeast Asia. **Phytopathology** 99(9): 1062-1069, 2009.

TRINGE, S.; HUGENHOLTZ, P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 11, p. 442-446, 2008.

TYAGI, S, KRAMER FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. **Nat Biotechnol** 1996;14:303–308.

UEDA, K.; SEKI, T.; Kudo, T.; Yoshida, T.; Kataoka, M. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. **J Bacteriol**;181:78–82,1999.

UEKI, A. et al. *Rhizomicrobium palustregen. nov., sp. nov.*, a facultatively anaerobic, fermentative stalked bacterium in the class Alphaproteobacteria isolated from rice plants roots. **Journal of General and Applied Microbiology** 56 (3) p.193-203,2010.

URIOS,L. et al. *Pedobacter tournemirensis sp. nov.*, isolated from a fault water sample of a deep Toarcian argillite layer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** v.63, 303–308, 2013.

VAN DE PEER Y.; CHAPELLE S, DE WACHTER R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucleic Acids Res**; 24:3381–3391,1996.

VAN SPANNING, R.J.M; DELGADO M.J.; RICHARDSON, D.J. The nitrogen cycle: denitrification and its relationship to N<sub>2</sub> fixation. In: Werner D, Newton WE (eds) Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment. **Springer: Netherlands**, pp 277–342,2005.

VARMA-BASIL, M. et al. Molecular beacons for multiplex detection of four bacterial bioterrorism agents. **Clin Chem**;50:1060–1062,2004.

VILLECHANOUX, S. et al The genome of the non-cultured, bacterial-like organism associated with citrus greening disease contains the *nusG-rplKAJL-rpoBC* gene- walking method. **Curr. Microbiol.** 26:161-166, 1993.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Antifungal activity of chitinases produced by some fluorescent *Pseudomonas* against *Colletotrichum falcatum* Went causing red rot disease in sugarcane. **Microbiological Research**, Jena, v. 155, p. 309-314, 2004.

WANG, Q. J.; CHEN, S. W.; ZHANG, J. B.; SUN, M. ;LIU, Z. D.; YU, Z. I. Co-producing lipopeptides and poly-gamma-glutamic acid by solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 3318-3323, 2008.

WEINERT,N.et al. PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: many common and few cultivar-dependent taxa. **FEMS Microbiol.Ecol.**75,497–506. 2011

- WILL, C. et al. Horizon-specific bacterial community composition of german grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology** 76, 6751- 6759,2010.
- WARD, N.L., et al., Three Genomes from the Phylum *Acidobacteria* Provide Insight into the Lifestyles of These Microorganisms in Soils, **Applied and Environmental Microbiology**, April, 75:2046-2056, 2009.
- WELLER, D. M. et al.. "Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens." **Annual Review of Phytopathology** 40(1): 309-348,2002.
- WHITEHEAD, N. A. et al.Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 25, n. 4, p.365-404, ago.2001
- WOESE, C.R. Interpreting the universal phylogenetic tree. PNAS, p.158392–8396 vol. 97 (2000).
- YANG, C.H.; CROWLEY, D.E.; MENGE, J.A. 16S rDNA finger- printing of *rhizosphere* bacterial communities *associated* with healthy and Phytophthora infected avocado roots. **FEMS Microbiol. Ecol.** 35:129–136,2001.
- YANG, S. et al. Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**;40:3449–3454, 2002.
- YOON, J. et al. *Pedobacter sandarakinus* sp. nov., isolated from soil. **Int J Syst Evol Microbiol** 56, 1273–1277, 2006.
- YUMIKO, K.; WATANABE, K. An electricity-generating prosthecate bacterium strain Mfc52 isolated from a microbial fuel cell. **FEMS Microbiol Lett.** 288 55–61,2008.
- YOUSSEF, N.H.; ELSHAHED, M.S. Diversity rankings among bacterial lineages in soil. **ISME J.** 3(3):305-13,2009.
- YOUSUF, B.; KESHRI, J.; MISHRA, A.; JHA, B. Application of targeted metagenomics to explore abundance and diversity of CO<sub>2</sub>-fixing bacterial community using cbbL gene from the rhizosphere of *Arachis hypogaea*. **Gene** 506: 18–24,2012.
- ZHANG, L. et al. *Taibaiella smilacinae* gen. nov., sp. nov., an endophytic member of the family *Chitinophagaceae* isolated from the stem of *Smilacina japonica*, and emended description of *Flaviumibacter petaseus* **Int J Syst Evol Microbiol** 63:3769-3776,2013.
- ZHANG, J. et al. Metallothionein 2 (SaMT2) from *Sedum alfredii* Hance Confers Increased Cd Tolerance and Accumulation in Yeast and Tobacco. **PLoS One** 9(7),2014.
- ZHANG, Y. et al. Geochip-based analysis of microbial communities in alpine meadow soils in the Qinghai-Tibetan plateau **BMC Microbiol** 13: 72, 2013.

ZHOU, Z. et al. "*Pedobacter arcticus* sp. nov., a facultative psychrophile isolated from Arctic soil, and emended descriptions of the genus *Pedobacter*, *Pedobacter heparinus*, *Pedobacter daechungensis*, *Pedobacter terricola*, *Pedobacter glucosidilyticus* and *Pedobacter lentus*". **Int J Syst Evol Microbiol** 62 (Pt 8): 1963–9, 2012.