

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de
Baccharis dracunculifolia, com e sem galha causada por
Baccharopelma dracunculifoliae

ORIENTADO: Raiana Silva Menezes de Santana

ORIENTADOR: Prof.^a Andréa Maria Amaral Nascimento

CO-ORIENTADOR: Prof. Edmar Chartone de Souza

BELO HORIZONTE

Dezembro - 2013

Raiana Silva Menezes de Santana

Caracterização da comunidade bacteriana de *Baccharis
dracunculifolia*, com e sem galha causada por
Baccharopelma dracunculifoliae

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de mestre em Genética

Orientadora: Prof.^a Andréa Maria Amaral Nascimento

Co-orientador: Prof. Edmar Chartone de Souza

Belo Horizonte

Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas

2013

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	1
LISTA DE ABREVIATURAS.....	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1-Introdução Geral.....	5
1.1 Considerações gerais	6
1.2. Microrganismos endofíticos.....	7
1.3 Galhas.....	10
1.4 <i>Baccharis dracunculifolia</i>	12
1.5 Métodos moleculares para identificação de procariotos	15
2. Objetivos	21
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. Materiais e métodos	23
3.1 Área de estudo e amostragem.....	24
2.2. Desinfecção das folhas e raízes.....	25
2.3 Extração de DNA total	25
2.4 Perfil de restrição do amplicon do gene de rRNA 16S	25
2.5 Sequenciamento do gene de rRNA 16S usando a plataforma PGM Ion Torrent™	26
2.6 Sequenciamento do gene de rRNA 16S usando a plataforma Illumina Hiseq 200	28
4-Resultados e discussão	29
4.1 Características da biblioteca da endorrizosfera de <i>B. dracunculifolia</i> com galhas de <i>Baccharopelma dracuncufoliae</i>	30
4.2 Composição taxonômica da comunidade de bactérias endofíticas.....	31
4.3 Características das bibliotecas de rDNA 16S de folhas de plantas masculinas com galha (MS) e masculinas sadias (MG).....	41
4.3.1 Comparação entre bibliotecas de rDNA 16S de plantas masculinas com galha (MG) e masculinas sadias (MS).....	42
4.4 Perfil de restrição do amplicon do gene de rRNA 16S	48
5-Conclusão.....	51
Referências.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições da PCR para amplificação de seguimento de 1465 pares de base para obtenção de perfil de restrição do amplicon do gene rRNA 16S	26
Tabela 2 - Condições da PCR para amplificação de fragmento de 291 pares de bases para ser sequenciado pela plataforma Ion Torrent™	27
Tabela 3 - Dados obtidos do sequenciamento de fragmento da região V6 de rDNA 16S de raízes de <i>B. dracunculifolia</i> com galha (RG) de <i>B. dracunculifoliae</i>	30
Tabela 4 - OTUs mais abundantes na endorrizosfera de plantas com galha.	34
Tabela 5 - Dados das sequências obtidas nas bibliotecas de rDNA 16S de folhas de plantas masculinas com galha (MS) e masculinas sadias (MG).....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ARDRA - Amplified rDNA restriction analysis/ "análise de restrição do DNA ribossômico amplificado

DNA – Ácido desoxirribonucleico

OTU – Operational taxonomic unit/ "unidade taxonômica operacional

PCR – Polimerase chain reaction/ “reação em cadeia da Polimerase”

rDNA – Ácido desoxirribonucleico ribossômico

RDP – Ribossomal Database Project II

RNA – Ácido ribonucleico

RESUMO

Bactérias são ubíquas, habitando os mais diversos ambientes, inclusive outros seres vivos. Sua composição e diversidade pode ser afetada pela condição de saúde ou doença do organismo hospedeiro. Neste cenário, este trabalho caracterizou as comunidades bacterianas endofíticas da endorrizosfera de *Baccharis dracunculifolia* afetada pela galha do inseto *Baccharopelma dracunculifoliae*, bem como de folhas de plantas masculinas, com e sem galha de *B. dracunculifoliae*, a partir do sequenciamento parcial do gene de rRNA 16S utilizando diferentes plataformas de alta processividade: Ion Torrent e Illumina Hiseq 2000. Além disso, comparou-se a composição destas comunidades, usando análise de restrição do rDNA amplificado (ARDRA). A análise filogenética da microbiota da endorrizosfera mostrou uma comunidade diversa e complexa, representada por 17 filos. Destaca-se que 50% das sequências de rDNA 16S não foram classificadas no nível de filo. Proteobacteria predominou (28,7%), seguido pelos filos Actinobacteria (11,5%) e Acidobacteria (2,6%). As composições das comunidades bacterianas das folhas de plantas masculinas saudáveis e atacadas foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). Em ambas bibliotecas, Proteobacteria foi o filo mais abundante. Outros filos encontrados foram Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Chlorobi. A microbiota endofítica de *B. dracunculifolia* abriga bactérias metabolicamente diversas, com potencial para degradar grande variedade de compostos. Ao contrário do sequenciamento Illumina Hiseq 2000, o perfil ARDRA não revelou diferenças entre plantas masculinas saudáveis, com galha e plantas femininas saudáveis e com galha. Os resultados deste estudo indicam que *B. dracunculifolia* abriga uma comunidade diversa e complexa, e que a presença do inseto galhador interfere na sua composição bacteriana.

ABSTRACT

Bacteria are ubiquitous, inhabiting different environments, including other living beings. Composition and diversity may be affected by the health or disease conditions of the host organism. In this scenario, this work characterized the endophytic bacterial communities of *Baccharis dracunculifolia* endorhizosphere affected by the gall insect *Baccharopelma dracuncifoliae* and leaves of male plants, with and without *B. dracuncifoliae* gall, from the partial sequencing of 16S rRNA gene using different high throughput platforms: Ion Torrent and Illumina HiSeq 2000. Furthermore, we compared the composition of these communities, using restriction analysis of the amplified rDNA (ARDRA). Phylogenetic analysis of the microbiota of endorhizosfera showed a diverse and complex community, represented by 17 phyla. It is noteworthy that 50 % of the sequences of 16S rDNA were not classified in the phylum level. Proteobacteria predominated (28.7 %), followed by the phyla Actinobacteria (11.5%) and Acidobacteria (2.6%). The compositions of the bacterial communities from the leaves of healthy and affected plants were significantly different ($p < 0.05$). In both libraries, Proteobacteria was the most abundant phylum. Other phyla found were Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes and Chlorobi. The endophytic microbiota of *B. dracuncifolia* harbour metabolically diverse bacteria with potential to degrade wide variety of compounds, which is expected when studying such a rich plant secondary metabolites as *B. dracunculifolia*. Unlike Illumina HiSeq 2000 sequencing, the ARDRA profile revealed no differences between male healthy and gall plants, and female healthy and gall plants. The results of this study indicate that *B. dracunculifolia* houses a diverse and complex community, and that the presence of galling insect interferes in their bacterial composition.

1-Introdução Geral

1.1 Considerações gerais

Os microrganismos destacam-se pela ubiquidade nos diversos ambientes do planeta, inclusive no interior de outros organismos. A microbiota que habita os seres vivos reflete a infinidade de interações que os microrganismos estabelecem com outras formas de vida, de modo a construir-se uma relação de interdependência.

Nessa troca mútua de vantagens em pró da sobrevivência, as alterações fisiológicas e bioquímicas do hospedeiro parecem atingir a microbiota em composição.

Em humanos, por exemplo, já existem trabalhos revelando diferenças na composição da microbiota intestinal entre indivíduos obesos e magros, bem como entre indivíduos diabéticos e não diabéticos (Ley *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2010; Burcelin *et al.*, 2011; Tehrani *et al.* 2012).

A composição da microbiota da pele de anfíbios demonstrou uma participação importante na defesa contra o fungo patogênico *Batrachochytrium dendrobatidis*, causador da doença citridiomucose. Algumas espécies de bactérias típicas da pele de anfíbios demonstraram a capacidade de produzir antimicrobianos que suprimem o crescimento desse fungo. Assim, uma mudança na composição da microbiota epidérmica de um anfíbio pode alterar sua resistência a este patógeno (Harris *et al.*, 2009; Daskin e Alford, 2012)

Trabalhos realizados com corais também comprovam a participação da microbiota na susceptibilidade desses animais a certas doenças. Já se conhece, por exemplo, alguns indivíduos resistentes ao branqueamento dos corais, um grave problema ambiental que degrada vários recifes. Essa proteção reside nos metabólitos secundários produzidos por algumas bactérias encontradas no interior do organismo (Shnit-Orland e Kushmaro, 2009; Daskin e Alford, 2012).

A partir desses exemplos, é possível concluir que a microbiota de um organismo está sujeita a variações quando este sofre alguma mudança em seu estado fisiológico. Esse fenômeno parece ser comum aos seres vivos que abrigam dentro de si uma comunidade microbiana. Sendo assim, os vegetais, conhecidos por hospedarem um repertório significativo de microrganismos, podem apresentar tal variação em condições de doença.

1.2. Microrganismos endofíticos

Microrganismos endofíticos são definidos como organismos isolados do interior de tecidos vegetais (Araújo *et al.*, 2002; Mano e Morisaki, 2008) e que, aparentemente, não provocam dano à planta hospedeira. Constituem-se, em sua maioria, de fungos e bactérias. Essa microbiota pode ser encontrada em vários tecidos internos da planta como raízes, caule, folhas, sementes e frutos (Coelho *et al.*, 2011). No interior desses tecidos, tais organismos podem residir dentro das células, no espaço intercelular ou no sistema vascular (Jacobs *et al.*, 1985; Seghers *et al.*, 2004). Assim, estabelecem com a planta relações mutualísticas, simbióticas ou simplesmente de comensalismo (Ulrich *et al.*, 2008).

Microrganismos endofíticos ocupam o mesmo nicho ecológico de fitopatógenos tornando-se, por isso, potenciais candidatos a agentes de biocontrole (Araújo *et al.*, 2002; Hallman *et al.*, 1997). De fato, 88,6% das actinobactérias endofíticas isoladas do tomateiro apresentaram atividade antimicrobiana contra pelo menos um fitopatógeno (Oliveira *et al.*, 2010). Além disso, Harish e colaboradores (2007) detectaram uma diminuição de 33% na infecção do vírus da banana BBTV, uma redução de 60% em relação ao grupo controle, ao tratar mudas de banana com uma mistura de bactérias endofíticas isoladas da raiz e do cormo da bananeira.

Em trabalho conduzido por Sheng *et al.* (2008), dois isolados bacterianos endofíticos da raiz do rapé (*Brassica napus*), identificados como *Pseudomonas fluorescens* e *Micobacterium sp.*, apresentaram resistência ao chumbo e a antibióticos, além de induzirem o alongamento das raízes e produzirem ácido indol acético. Ainda, Ramesh e Phadke (2012) confirmaram a eficácia das bactérias endofíticas no combate ao fitopatógeno *Ralstonia solanarum*, agente causador da murcha da berinjela. Devido à importância do controle de pragas na agricultura, diversas pesquisas envolvendo endofíticos têm sido realizadas (Eastwell *et al.*, 2006; Harish *et al.*, 2008; Ludueña *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012).

O biocontrole de insetos é de especial importância, uma vez que poucos estudos foram feitos até o momento aprofundando a relação entre bactérias endofíticas e insetos

herbívoros. Pouco se conhece sobre o potencial desses microrganismos como agentes inibidores de pragas. Zhang e colaboradores (2010) descreveram uma bactéria endofítica com atividade inseticida. Os pesquisadores isolaram microrganismos endofíticos da raiz, caule, folhas e sementes da espécie *Achnatherum inebrian*, como a bactéria *Streptomyces rochei*, que aumentou em 85% a taxa de mortalidade herbívoro *Aphis gossypii*. Estes estudos tem sido realizados principalmente nas regiões temperadas, havendo, então, necessidade de maiores investigações nas florestas tropicais. (Ahmad *et al.*, 1986; Butin, 1992; Barker *et al.*, 1996; Ball *et al.*, 1997; Vega *et al.*, 2008).

Os resultados positivos tem incentivado a possibilidade de modificar geneticamente bactérias endofíticas de maneira que passem a secretar substâncias tóxicas a insetos pragas (Zhang *et al.*, 2011). Fahey (1988; 1991) publicou os primeiros trabalhos sobre endofíticos geneticamente modificados para o controle de insetos e que, mais tarde, ensejou o desenvolvimento de um produto comercial denominado INCIDE (Azevedo *et al.*, 2000). A resistência de plantas a insetos herbívoros mantida pela presença de endofíticos não é constante. Fatores como genótipo da planta (Breen, 1993) e do organismo endofítico (Christensen *et al.*, 1991), estresse hídrico, nutrientes (Arechavaleta *et al.* 1989) e características físico-químicas do solo, bem como abundância de endofíticos, (Breen, 1992) podem afetar a eficiência desses mecanismos de resistência.

Atribui-se também aos organismos endofíticos contribuições importantes para o crescimento e desenvolvimento do vegetal. Tal colaboração consiste na promoção do crescimento e do estabelecimento das plantas em condições adversas, acelerando, inclusive, a emergência de sementes (Araújo *et al.*, 2002). Em estudo sobre a diversidade genética e o potencial para promoção do crescimento de bactérias endofíticas presentes em nódulos de soja na China, Li *et al.* (2008) encontraram bactérias endofíticas que, embora não demonstrassem estabelecer uma relação simbiótica com a soja, contribuíam com seu crescimento e desenvolvimento. Isso porque gêneros encontrados nos nódulos como *Serratia*, *Burkholderia* e *Pantoea* foram capazes de produzir ácido indol acético, solubilizar fosfato mineral e fixar nitrogênio atmosférico.

He e colaboradores (2013) isolaram uma bactéria em *Polygonum pubescens* que também é capaz de produzir substâncias estimuladoras do crescimento, tais como ácido indol acético, desaminase 1-aminociclopropano-1-carboxílica e fosfato inorgânico solubilizado, além de induzir a absorção pela planta de metais pesados, representando

uma possível ferramenta a serviço da fitorremediação. Puente *et al.* (2009), por sua vez, inocularam bactérias endofíticas em sementes esterilizadas do cacto *Pachycereus pringlei* e plantaram-nas em solo de rocha pulverizada juntamente com sementes estéreis não inoculadas. Como resultado, apenas as plantas provenientes de sementes inoculadas com bactérias endofíticas conseguiram se desenvolver. Além disso, ao eliminar as bactérias introduzidas com antibióticos, o desenvolvimento da semente interrompeu-se. Esses experimentos demonstram claramente o papel desses microrganismos não apenas no desenvolvimento e crescimento da planta, mas também no seu estabelecimento em ambientes pouco favoráveis. Outras colaborações das bactérias endofíticas em favor do desenvolvimento vegetal consistem no estímulo do crescimento das raízes e da absorção de nutrientes do solo (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004). Duangpaeng *et al.* (2012) inocularam em sementes de arroz em germinação linhagens de endofíticos previamente testadas e positivadas para a produção de substâncias semelhantes ao ácido indol acético. O resultado observado foi um significativo aumento do crescimento das raízes, confirmando, mais uma vez, que a presença de bactérias endofíticas na planta tem natureza benéfica.

Bactérias endofíticas são também responsáveis pela fixação do nitrogênio atmosférico, sendo, portanto, essenciais à sobrevivência de muitas espécies vegetais (Mano e Morisaki, 2008). Este tipo de bactéria endofítica, encontradas principalmente nas raízes das plantas, já é bem estudado e seus principais representantes são os gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Acetobacter* e *Azoarcus* (Azevedo *et al.*, 2000). Deve-se destacar que a maioria das bactérias endofíticas são gêneros comumente encontrados no solo, como *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Azospirillum* e *Bacillus* (Lodewyckx *et al.*, 2002). Esses microrganismos podem invadir os tecidos vegetais em uma parte ou durante todo o ciclo de vida da planta (Liam *et al.*, 2008).

As comunidades endofíticas de várias plantas já foram descritas, como arroz (Mano e Morisaki, 2008), batata (Andreote *et al.*, 2010), tomate (Nejad e Jonhson 2000), citros (Araújo *et al.*, 2002), soja (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2008), cana-de-açúcar (Mendes *et al.*, 2007), dentre outras. É notável que grande parte das comunidades de bactérias endofíticas caracterizadas origina-se de plantas importantes para o homem, como as espécies de relevância na agricultura e no comércio, em geral. A composição dessas comunidades varia de planta para planta. Fatores como, tecido vegetal habitado, idade da planta, tipo de solo e interação com outros microrganismos, afetam a estrutura e a

composição da comunidade bacteriana (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2005; Astraful Islã *et al.*, 2010).

Os estudos clássicos relacionados à diversidade de microrganismos endofíticos focam-se na caracterização de isolados obtidos a partir de tecidos internos após a desinfecção das superfícies das plantas com hipoclorito de sódio ou agentes similares (Michè e Balandreau, 2001). A maioria dos trabalhos utiliza técnicas de cultivo tradicional associadas ou não com a análise filogenética do gene do rRNA 16S bacteriano, seja para simplesmente analisar a diversidade ou para encontrar bactérias com fenótipos específicos (More *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2010; Phetcharat e Duangpaeng, 2011; aMontanez *et al.*, 2012).

1.3 Galhas

Galhas são estruturas atípicas causadas por bactérias, vírus, nematoides, fungos, ácaros e insetos. São caracterizadas pela ocorrência de hipertrofias e/ou hiperplasias do tecido vegetal, gerando protuberâncias de vários formatos (Fernandes *et al.*, 1998; Arduin e Krauss, 2001). A relação ecológica entre plantas e organismos indutores de galhas data de milhares de anos, constituindo um modelo importante para estudos de coevolução (Stone *et al.*, 2003). Um tipo peculiar de galha se destacou por contribuir com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular: o tumor de galha. A utilização do plasmídeo Ti, como vetor de transferência de genes para células vegetais de dicotiledôneas, é de grande importância biotecnológica (Llop *et al.*, 2009). Esse plasmídeo está presente naturalmente na bactéria indutora *Agrobacterium tumefaciens*, sendo um componente chave na instalação e no desenvolvimento dos tumores (Drummond *et al.*, 1977).

Galhas entomógenas são crescimentos no tecido vegetal induzidos por insetos. As galhas constituem uma estratégia de adaptação dos agentes causadores, uma vez que conferem proteção contra predadores e suprimento alimentar, devido a um maior fluxo de nutrientes para a galha. Esse desvio revela a atividade espoliativa desses insetos, os quais podem ser considerados parasitas (Price *et al.*, 1986, 1987). Como consequência, a planta pode ter seu crescimento inibido (Abrahamson e McCrea, 1986). Quanto ao local de instalação, as galhas podem se desenvolver por todo o corpo da planta, entretanto, é mais comum encontrá-las em folhas e ramos (Fernandes *et al.* 1988). Durante sua

formação, várias modificações ocorrem no tecido foliar a fim de disponibilizar para a larva em desenvolvimento tecidos nutritivos, proteção e abrigo (Arduin *et al.*, 2005).

Além disso, a produção de metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, pode ser alterada. Essas substâncias protegem a planta contra herbívoros, mas os insetos galhadores podem intensificar sua produção, afastando possíveis competidores e parasitoides (Soares *et al.*, 2000). A diferenciação do tecido vegetal em galha é induzida por estímulos químicos ou mecânicos do inseto, tais como secreção salivar, fluidos, hormônios e mastigação do tecido vegetal (Hori, 1992; Ramalho e Silva, 2010). Esses estímulos fazem com que o citoplasma das células formadoras da galha torne-se mais denso e rico em substâncias nutritivas ao redor da câmara larval, tornando o centro da galha, aonde se localiza a larva em desenvolvimento (Arduin e Krauss, 2001).

Seis ordens de insetos galhadores estão presentes na região Neotropical: Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Coleoptera, Hemiptera e Thysanoptera. A ordem Diptera é a mais associada à produção de galhas. Estas formações exibem grande diversidade de formas, e a relação entre o inseto galhador e a planta hospedeira apresenta alta especificidade. Assim, é possível identificar o inseto galhador pela morfologia da galha presente na planta (Araújo *et al.*, 2003).

Em *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), a galha induzida por *Baccharopelma dracunculifoliae* (Hemiptera, Psyllidae) é a mais frequentemente observada (Fernandes *et al.*, 1996). Arduin e colaboradores (2005) perceberam que essa galha se desenvolve em quatro etapas: dobramento (Fig. 1-C), inchaço (Fig. 1-D), deiscência e senescência. A fase de dobramento consiste na proximidade das extremidades laterais da folha ao longo da nervura central, formando uma cápsula- dentro da qual a larva habita- dotada de uma fenda. Na fase de inchamento, os tecidos foliares da galha aumentam em espessura e a fenda da câmara se fecha ainda mais. Em seguida, na fase de deiscência, a fenda da galha se abre, permitindo a saída do inseto adulto. A última etapa é a de senescência, na qual a galha envelhece e seca. Sua cor muda do verde para cinza e deste para preto, quando ela já está completamente seca, mas ainda ligada à planta (Lara e Fernandes, 1994).

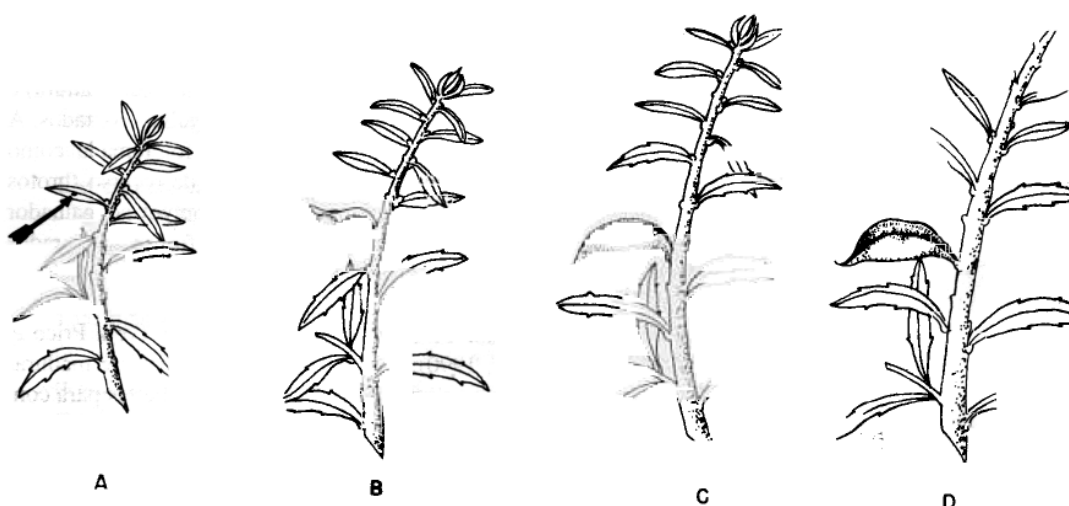


Figura 1 - *Baccharis dracunculifolia*. Fonte: Lara e Fernandes (1994).

Todos os estudos envolvendo galhas entomógenas e microrganismos endofíticos disponíveis na literatura descrevem a interação entre fungos e insetos galhadores (Wilson, 1995; Raman *et al.*, 2012; Oki *et al.*, 2009). No que concerne à relação entre bactérias endofíticas e galhas de insetos, nenhum trabalho foi publicado caracterizando essa interação. Contudo, isso não significa que esta interação não exista e que não seja relevante. Bactérias endofíticas e insetos galhadores dividem o mesmo espaço no interior da planta e, desta forma, é natural que as consequências desse contato afetem ambos. Trata-se, assim, de uma interessante área a se explorar.

1.4 *Baccharis dracunculifolia*

Baccharis dracunculifolia, cujo nome popular é Alecrim-do-campo, é uma planta da família Asteraceae, de porte arbustivo de até 4 m de altura, lenhosa, dioica e perene. É encontrada nas partes altas da América do sul, como Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Sudeste e Sul do Brasil (Barroso, 1976).

Em relação à morfologia, apresenta ramos pilosos, folhas alternas e lanceoladas e ápices foliares ricos em glândulas. As flores são pequenas e se agrupam em

inflorescências, que crescem nos brotos. O dimorfismo sexual é observado pela cor das flores: plantas masculinas apresentam flores amarelo-claro e plantas femininas, flores brancas. (Espírito-Santo *et al.*, 2004).

De acordo com Fernandes e colaboradores (1996), as espécies desse gênero apresentam a maior fauna conhecida de insetos galhadores dos Neotrópicos. Dentre os insetos galhadores específicos do gênero *Baccharis*, o psilídeo *Baccharopelma dracunculifoliae* é o mais comum (Burckhardt *et al.*, 1994; Burckhardt, 1987). Além disso, *Baccharis dracunculifolia* é um importante recurso alimentar para várias espécies de insetos herbívoros, como Coleópteros, Hemípteros e Ortópteros (Fagundes *et al.* 2005).

Baccharis dracunculifolia também é dotada de muitas propriedades medicinais. Seu exsudato resinoso contribui para a eficácia do própolis verde em tratar inflamações, distúrbios hepáticos, úlceras estomacais bem como apresentar atividade antifúngica, antibacteriana e antioxidante, (Massignani *et al.*, 2010; Silva Filho *et al.*, 2008). Bastos e colaboradores (2011) relataram uma possível associação entre a presença de galhas de *Baccharopelma dracunculifoliae* e a produção da resina que a espécie de abelha *Apis mellifera* utiliza para fabricar o própolis verde. Eles pesquisaram duas populações de *Baccharis dracunculifolia*, uma em um ambiente urbano e outra rural, e descobriram que nas plantas da área urbana não havia galha de insetos, assim como não foi detectada a produção da substância resinosa. Na outra população, por sua vez, foi possível encontrar plantas galhadas e produtoras de resina. Os autores inferiram, então, que as galhas podem estimular a síntese de compostos defensivos que compõem a matéria-prima do própolis feito por *Apis mellifera*. O mesmo trabalho ainda verificou não existir diferença na composição do própolis verde cujo exsudato se originou de plantas masculinas e femininas.

Estudos realizados com plantas do gênero *Baccharis* não encontraram associação entre sexo e predisposição ao ataque de herbívoros (Espírito-Santo e Fernandes, 1998; Araújo *et al.*, 2003). Entretanto, há na literatura vários relatos de mortalidade diferencial e segregação espacial entre espécies de plantas dioicas masculinas e femininas, como *Acer negundo* (Aceraceae) e *Antennaria parvifolia* (Asteraceae), entre outras (Byerlichudek e Eckhart, 1987; Eppley, 2001; Espírito-Santo e Fernandes, 2002). Também foram encontradas diferenças intersexuais nos mecanismos de defesa e no uso e alocação de recursos: plantas masculinas investem mais recursos em crescimento

vegetativo, enquanto plantas femininas, em estruturas reprodutivas (Byerzichudek e Eckhart, 1987). Recentemente, Jiang e colaboradores (2012) encontraram diferenças entre machos e fêmeas da espécie dioica *Populus yunnanensis* em relação à resistência ao solo contaminado com zinco, chuva ácida e ambos. Nesse estudo, os machos efetuaram maior alocação de Zinco do que as fêmeas, apresentaram síntese mais elevada de compostos indicadores de regulação da defesa contra metais pesados como Prolina, aminoácidos livres e tiois não proteicos e registraram taxas maiores de fotossíntese. Por outro lado, as fêmeas exibiram maior produção de espécies reativas do oxigênio e maior redução na massa total se comparadas aos machos. Novamente essas diferenças foram atribuídas ao maior investimento de plantas femininas em crescimento e reprodução se comparado às masculinas.

A comunidade bacteriana endofítica e seus padrões sexo-específico em plantas dioicas de *Baccharis dracunculifolia* são ainda desconhecidos. Contudo, já existem trabalhos avaliando a diversidade de fungos endofíticos em *Baccharis dracunculifolia*. Oki e colaboradores (2009) mediram, entre outros parâmetros, a riqueza de fungos endofíticos com relação ao sexo do vegetal e encontraram uma riqueza similar, mas uma composição significativamente diferente entre os sexos da planta.

O própolis verde brasileiro, produzido por abelhas a partir de substâncias resinosas do alecrim-do-campo, é reconhecido mundialmente por suas propriedades farmacológicas antibacteriana, antitumoral e anti-inflamatória, dentre outras (Teixeira *et al.*, 2005). Curiosamente, ele se mostra superior aos demais própolis produzidos no mundo, pois é o único que contém a artepilin C, um poderoso composto apontado como o principal responsável pelos benefícios do consumo do própolis verde (Hata *et al.*, 2012).

A caracterização da comunidade bacteriana endofítica do alecrim-do-campo é, assim, um passo preliminar para estudos mais aprofundados sobre uma possível contribuição dos organismos endofíticos para as propriedades medicinais encontradas em *B. dracunculifolia* e afins.

A raiz é a principal via de entrada das bactérias endofíticas (Hurek e Hurek, 2011) e, por isto, tem sido a região mais (Oh *et al.*, 2012; Moore *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2008; Sheng *et al.*, 2008). A figura 2 ilustra a estrutura da rizosfera.

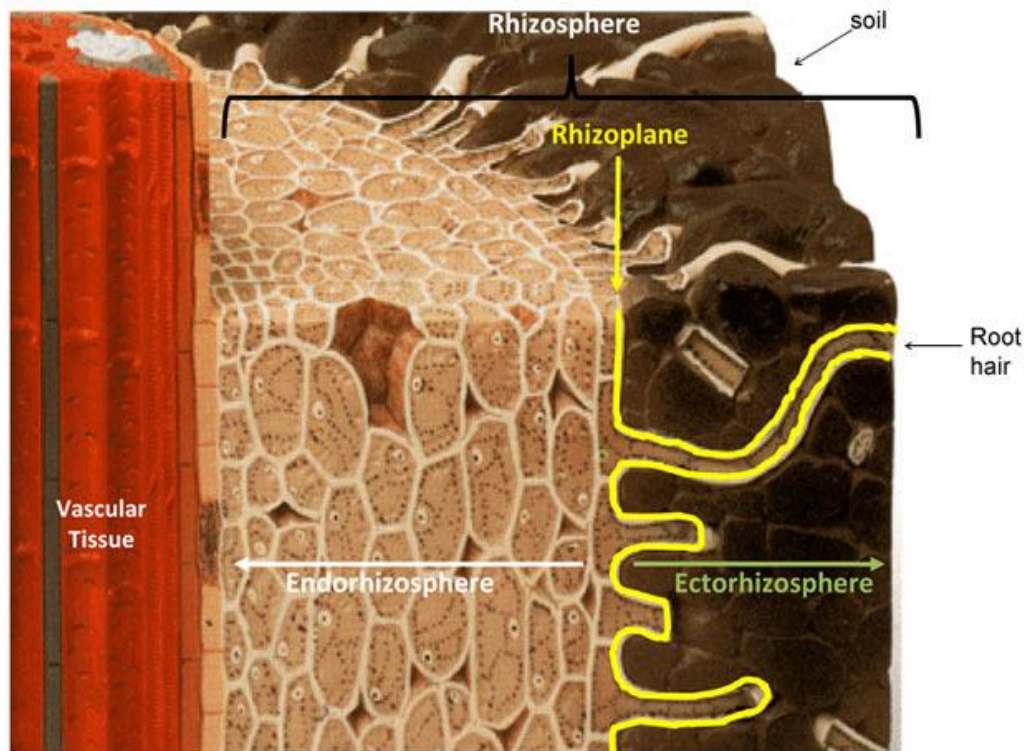


Figura 2 - Estrutura ideal da rizosfera. Fonte: McNear Jr., 2013.

1.5 Métodos moleculares para identificação de procariotos

Muitos microrganismos residentes em amostras ambientais como solos, águas e no interior de plantas não conseguem ser isolados em meios de cultura em virtude de suas condições específicas de crescimento ainda desconhecidas. Dessa forma, é necessário recorrer a métodos independentes de cultivo para identificar plenamente as comunidades ambientais microbianas. Nesse contexto, as técnicas moleculares destacam-se por sua ampla faixa de aplicação.

Em se tratando de diversidade e filogenia de procariotos, a identificação molecular pelo gene do RNA ribossômico (rRNA) 16S tem sido a abordagem mais utilizada. Esse gene é altamente conservado e foi pouco afetado por transferências gênicas horizontais, constituindo-se, por isso, em um adequado marcador filogenético e com boa discriminação dos microrganismos no nível de gênero e, em alguns casos, de espécie. Ele é um dos componentes da subunidade ribossômica bacteriana 30S enquanto os genes

rRNA 23S e 5S compõem a subunidade maior 50 S. Além disso, possui um tamanho de 1650 pares de base, o que o torna mais informativo do que o gene rRNA 5S (120 pares de base) e menos laborioso de se trabalhar, em virtude de sua menor extensão, do que o gene rRNA 23S (3000 pares de base) (Woese, 1987; Nascimento, 2011). Destaca-se, ainda, que milhões de sequências do gene de rRNA 16S estão disponíveis em bancos de dados.

A identificação de procariotos utilizando o rDNA 16S como marcador molecular requer diversas etapas: primeiramente busca-se em um banco de dados de nucleotídeos de domínio público uma sequência similar à encontrada no isolado; em seguida, recupera-se as sequências de linhagens validadas e publicadas; posteriormente, calcula-se os valores de similaridade entre pares de nucleotídeos da sequência do isolado e de linhagens filogeneticamente próximas e, por último, constrói-se uma árvore filogenética (Chun *et al.*, 2007). As sequências do gene rRNA 16S de uma comunidade microbiana podem ser obtidas por amplificação e clonagem para construção de bibliotecas genômicas, as quais resultam em um conjunto heterogêneo de diferentes táxons (Sanz e Köchling, 2007).

A diversidade molecular de bactérias também tem sido elucidada, recentemente, por meio de modernas metodologias de sequenciamento de alto rendimento. Diversas plataformas de sequenciamento são utilizadas, como Roche 454/FLX, Applied Biosystems SOLiD™ System, Ion Torrent e Illumina HiSeq 2000. Todas elas se assemelham pela capacidade de produzir milhões de sequências, revelando uma diversidade muito maior de microrganismos nas comunidades do que a técnica clássica de sequenciamento de Sanger (Mardis, 2008).

A plataforma Ion Torrent™ é singular pelo fato de ser uma tecnologia de sequenciamento que não utiliza fluorescência, e sim um íon semiconductor. Seu funcionamento baseia-se na detecção de uma alteração de pH gerada pela incorporação de um nucleotídeo à cadeia de DNA, reação que libera hidrogênio (Whiteley *et al.*, 2012).

A preparação para o sequenciamento (Figura 3) inicia-se com a construção de bibliotecas e a ligação de adaptadores próprios nas extremidades das sequências. Posteriormente, os fragmentos com os adaptadores são aderidos em micropartículas esféricas e amplificados por PCR em emulsão. Em seguida, as micropartículas com fragmentos amplificados aderidos são aplicadas em micro-poços de um chip que lá se depositam por centrifugação (Life technologies, 2011).

A seguir, o sequenciador *Ion Personal Genome Machine*TM despeja seguidamente em cada micro poço do chip soluções contendo um único tipo de nucleotídeo por vez.

Se o nucleotídeo, adicionado sequencialmente, complementa o fragmento de DNA que está sendo sequenciado, a formação de pontes de hidrogênio entre eles liberam prótons no meio, o que causa uma alteração de pH detectável. Essa mudança é captada e convertida em sinal digital, detectando, assim, a incorporação dos nucleotídeos presentes no micro-poço naquele momento (Life technologies, 2011).

Uma vez que os dados digitais são gerados, estes são encaminhados ao servidor Ion Torrent aonde serão processados e as sequências, montadas, por meio de *base calling algorithms*. O resultado é a produção de milhares de *reads* (sequências).

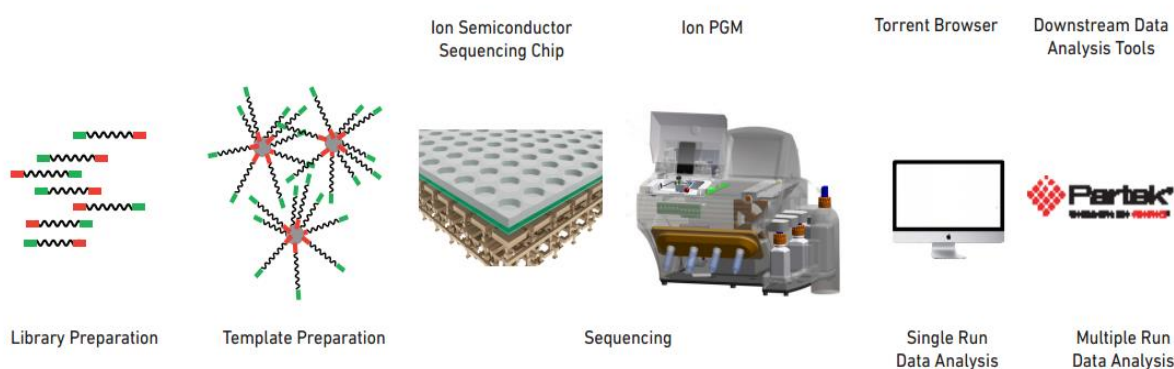


Figura 3 - Fluxo do sequenciamento pela plataforma Ion TorrentTM. Fonte: Life Technologies (Applied biosystems, 2011).

A plataforma Illumina Hiseq 2000 também vem sendo largamente utilizada em estudos de ecologia microbiana devido ao seu alto rendimento em termos de sequências produzidas bem como ao baixo custo de análise em comparação com as demais plataformas (Caporaso *et. al*, 2012). O funcionamento do Illumina Hiseq 2000 é baseado no sequenciamento por terminação de cadeia de Sanger, porém com algumas diferenças. Nessa tecnologia há um maciço sequenciamento paralelo de milhares de fragmentos de DNA reunidos em “clusters, que são grupos de sequências idênticas (Figuras 4 e 5). O sequenciamento é realizado pelo método de terminação de cadeia reversível, ou seja, o nucleotídeo terminador não interrompe definitivamente a adição dos próximos dNTPs.

Após a emissão e detecção da fluorescência correspondente à base incorporada à fita de DNA em crescimento, o fluoróforo se desliga do dNTP marcado e os próximos dNTPs podem ser adicionados à mesma fita nos próximos ciclos de sequenciamento. Esse sequenciamento base a base proporciona alta acurácia à técnica, diminuindo significativamente a taxa de erro do processo (Illumina, 2011).

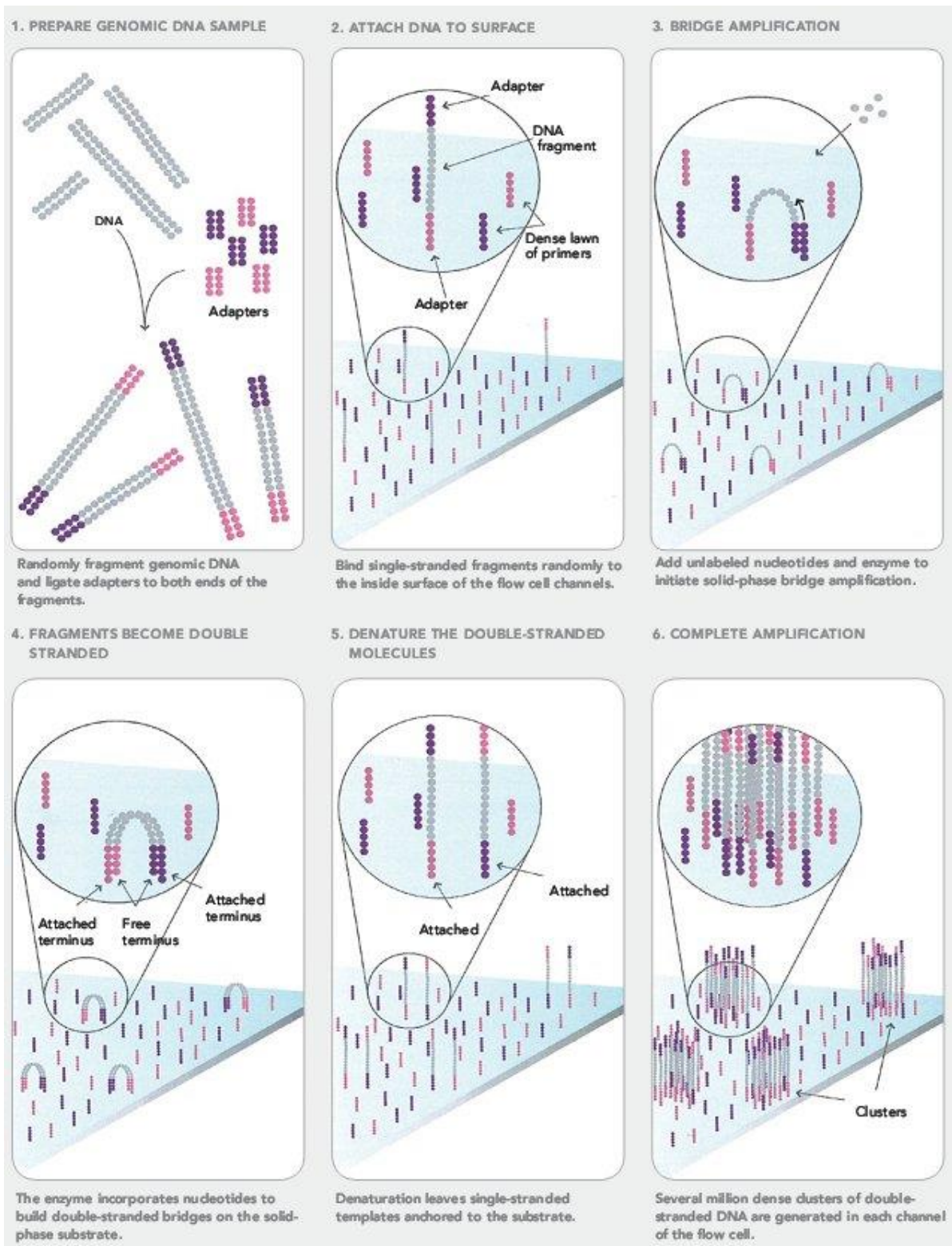


Figura 4 - Geração de clusters para sequenciamento pela Plataforma Illumina HiSeq 2000.

Fonte: Universidade de Tufts, 2013.



Figura 5 - Etapas do sequenciamento pela plataforma Ilumina Hiseq 2000. A etapa de análise das sequências pelo programa Consensus Assessment of Sequence and Variation (CASAVA) é opcional e softwares análogos podem ser utilizados. Fonte: Ilumina, 2011.

A análise de restrição do rDNA amplificado (ARDRA) é outra técnica de uso frequente em ecologia microbiana, uma vez que é de simples execução e altamente informativa. Trata-se de uma variação da PCR-RFLP, na qual sequências dos genes de RNA ribossômico previamente amplificadas são submetidas à digestão enzimática com o fim de se identificar polimorfismos de sequências entre linhagens e/ou espécies (Heyndrickx *et al.*, 1996).

Os genes ribossomais utilizados no ARDRA são o 16S, mais frequentemente usado, as regiões espaçadoras entre os genes 16S e 23S e entre este e o gene da subunidade 5S. (Heyndrickx *et al.*, 1996). A técnica resulta em um perfil de bandas que reflete as diferenças nas sequências dos genes utilizados para se avaliar a diversidade de espécies. Pode-se utilizar uma ou mais enzimas de restrição, sendo que quanto mais enzimas utilizadas, maior o poder discriminatório (Lee *et al.*, 1998).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar a comunidade bacteriana endofítica de raiz de *Baccharis dracunculifolia* com galha produzida por *Baccharopelma dracunculifoliae*, usando sequenciamento de alta processividade, e comparar as comunidades presentes em folhas de plantas masculinas e femininas, sem e com galhas.

2.2 Objetivos específicos

1. Obter e analisar, por método independente de cultivo, sequências parciais do gene de rRNA 16S de bactérias endofíticas de *Baccharis dracunculifoliae*
2. Identificar taxonomicamente bactérias destas comunidades endofíticas.
3. Sequenciar, utilizando a plataforma PGM Ion torrentTM, a região hipervariável V4 do gene de rRNA 16S da comunidade bacteriana presente na endorrizosfera de *B. dracunculifolia* afetada por galhas de *B. dracunculifoliae*.
4. Sequenciar, utilizando a plataforma Illumina Hiseq 2000, a região hipervariável V6 do gene de rRNA 16S da comunidade bacteriana presente nas folhas de *B. dracunculifolia* com e sem galhas de *B. dracunculifoliae*.
5. Comparar as comunidades bacterianas endofíticas das folhas de plantas com galha e se galha induzidas por *Baccharopelma dracunculifoliae*.
6. Comparar bactérias endofíticas das folhas de plantas masculinas e femininas, com e sem galha induzidas por *Baccharopelma dracunculifoliae*, a partir dos perfis de restrição obtidos pela técnica ARDRA.

3. Materiais e métodos

3.1 Área de estudo e amostragem

Realizou-se este estudo na zona de amortecimento da Área de preservação ambiental (APA) Morro da Pedreira, a qual é caracterizada por campos rupestres. Os espécimes de *Baccharis dracunculifolia* foram coletados ao longo dos campos localizados marginalmente à rodovia MG-10 (19°16'49"S/ 43°34'56.97"O e 19°16'57.56"S/43°35'20.49"O), na reserva Vellozia.

Ramos de *B. dracunculifolia* de plantas masculina e feminina, com e sem galhas, com idades variando entre 5 e 6 anos, foram coletados ao acaso (Figura 6). As plantas contendo galhas se distribuem juntamente com as plantas saudias na área amostrada, não havendo predominância de um ou outro tipo. Essa coleta foi feita no período reprodutivo da espécie, no qual a cor das flores permite diferenciar os gêneros (Barroso, 1976).

Ramos quaternários de seis plantas de cada tipo, fêmeina sadia, feminina com galha, masculina sadio e masculina com galha foram coletados. Esses foram acondicionados em saco plástico contendo cristais de sílica para retirar a umidade das folhas durante o transporte até o laboratório

Fragmentos de aproximadamente 5 centímetros de raízes secundárias de plantas com galha foram coletados ao acaso, ao longo da rodovia MG-10. Para cortar as raízes foi utilizado um canivete esterilizado. Seis raízes de cada tipo, com galha e sem galha, foram coletados e acondicionados em saco plástico contendo cristais de sílica para retirar a umidade das folhas durante o transporte até o laboratório. As raízes foram coletadas no período vegetativo da planta e os sexos foram desconsiderados.



Figura 6 - Coleta de ramos de *Baccharis dracunculifolia* na APA Morro da Pedreira.

2.2. Desinfecção das folhas e raízes

As folhas foram lavadas com água esterilizada e posteriormente tratadas com etanol 70% por 3 minutos, hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos, etanol 70% por 30 segundos e lavadas, novamente, cinco vezes com água destilada esterilizada. Para confirmar a ausência de bactérias na superfície das folhas a água resultante da última lavagem foi plaqueada em meio Ágar nutriente, o qual foi incubado a 37°C, por 48 h. As raízes foram submetidas ao mesmo processo de desinfecção, tomando - se o cuidado adicional de retirar o solo aderido à superfície externa com uma escova esterilizada.

2.3 Extração de DNA total

O DNA das folhas foi extraído utilizando-se o protocolo de Russel *et al.* (2010), adaptado por Souza *et al.* (2012). As folhas das seis amostras foram reunidas em cinco porções de 50 mg para a extração de DNA. Com relação às plantas doentes, o DNA foi extraído das folhas não galhadas. A extração de DNA das raízes foi executada com o kit PowerMax soil (Mobio), de acordo com instruções do fabricante.

2.4 Perfil de restrição do amplicon do gene de rRNA 16S

A amplificação do fragmento de 1465 (Tabela 1) pares de bases do gene de rRNA 16S foi feita por reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando os iniciadores 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492R (TACGGHTACCTTGTTACGACTT) (Lane *et al.*, 1991).

O amplicon de cada uma das plantas (femininas sadias e com galha, masculinas sadias e com galha) foi submetido separadamente à reação de restrição enzimática, seguindo instruções do fabricante, por três enzimas de restrição: *AluI* (Fermentas), que cliva uma sequência de quatro nucleotídeos (5' AGCT 3'); e *NlaIV* e *AflIII* (New England Biolabs), que clivam sequências de seis nucleotídeos (5' GGNNCC 3' e 5' ACRYGT3 3', respectivamente). A reação de restrição enzimática foi visualizada em gel de

poliacrilamida 8% em tampão Tris–Borate - EDTA (TBE) a 200V por quatro horas. Após a corrida, o gel foi corado com nitrato de prata.

Tabela 1 - Condições da PCR para amplificação de seguimento de 1465 pares de base para obtenção de perfil de restrição do amplicon do gene rRNA 16S

Etapas	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94°	10 minutos
Desnaturação	94°*	1 minuto
Anelamento dos iniciadores	56°	1 minuto
Extensão	72°	2 minutos
Extensão final	72°	10 minutos

*Repetição do ciclo – 35 vezes

2.5 Sequenciamento do gene de rRNA 16S usando a plataforma PGM Ion Torrent™

O DNA extraído das raízes de plantas saudáveis e com galha foi submetido ao sequenciamento de alta processividade usando a plataforma PGM Ion Torrent™. Os primers utilizados para amplificar a região V4 do gene de rRNA 16S foram 515f (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATGGTAATTGTGTGCCAGCMGCCGCGGTAA) e 806r (CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXXXXXXXXX AGTCAGTCAG CCGGACTACHVGGGTWTCTAAT) (Caporaso *et al.*, 2012). As condições para a reação de amplificação estão descritas na Tabela 2. Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), em uma tensão de 80 volts e visualizado sob luz ultravioleta.

A preparação da amostra para o sequenciamento iniciou-se com a construção de bibliotecas de fragmentos. Para a construção dessas bibliotecas e sequenciamento foram utilizados os reagentes Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit, Ion OneTouch™ 200 Template Kit, Ion PGM 200 Sequencing Kit, Ion Sphere™ Quality Control Kit, Ion Library Quantification Kit e Ion no316 Chip Kit, todos fornecidos pela Life Technologies, além de outros reagentes adicionais. Para a construção das bibliotecas, cerca de 500 ng

de DNA amplificado foram fragmentados aleatoriamente, usando o sistema Covaris™. Em seguida, as extremidades do DNA foram reparadas e ligadas a adaptadores específicos fornecidos pelos kits de sequenciamento. Os fragmentos de DNA da biblioteca foram ligados a esferas magnéticas e, em seguida, amplificados através da PCR em emulsão. Posteriormente, as bibliotecas foram enriquecidas e depositadas no Chip 316 para sequenciamento. Foram geradas sequências de 200 pb, as quais foram analisadas com os programas fornecidos pela plataforma Ion Torrent.

Tabela 2 - Condições da PCR para amplificação de fragmento de 291 pares de bases para ser sequenciado pela plataforma Ion Torrent™

Etapas	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94°	3 minutos
Desnaturação	94°*	45 segundos
Anelamento dos iniciadores	50°	55 segundos
Extensão	72°	1 minuto e 30 segundos
Extensão final	72°	10 minutos

* Repetição do ciclo – 35 vezes

As OTUs (Unidade taxonômica operacional) foram definidas a partir do programa Mothur v.1.32.0. As sequências brutas foram filtradas de acordo com instruções do tutorial MiSeq SOP, com adaptações (MiSeq SOP, 2013). Foi determinada a distância genética de 3% para agrupar as sequências em OTUs, porcentagem sugerida pela literatura para classificar um microrganismo ao nível de espécie (Drancourt *et al.*, 2000). RDP-II Classifier foi a base de dados utilizada como referência para inferir as afiliações filogenéticas. A cobertura foi calculada de acordo com a fórmula de Good: $1 - (n-1) / N \times 100$, onde n é o número de OTUs únicas (*singletons*) e N é o total de sequências encontradas.

2.6 Sequenciamento do gene de rRNA 16S usando a plataforma Illumina Hiseq 200

O sequenciamento foi feito a partir dos amplicons da região hipervariável V6 do gene de rRNA 16S, utilizando-se os iniciadores 967F (5'CAACGCGAACCTTACC 3') e 1046R (5' CGACAGCCATGCANAGACCT 3'). Em seguida, foram construídas bibliotecas de fragmentos entre 150-180 pb (amplicom e adaptadores) para as duas amostras conforme figura 7.

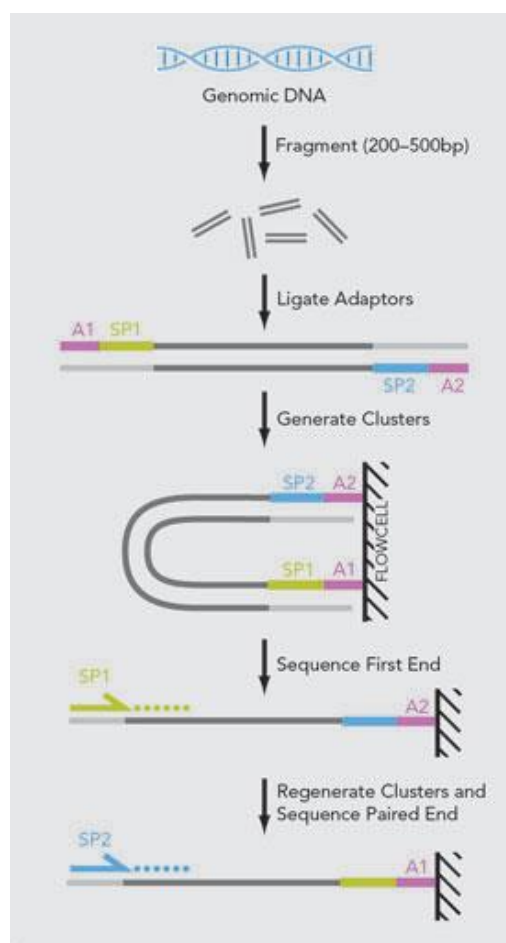


Figura 7 - Construção da biblioteca de fragmentos da região V6 do gene de rRNA 16S para sequenciamento pela plataforma Illumina Hiseq 2000. Fonte: Illumina, 2013.

Após o sequenciamento das amostras foi utilizado o programa Illumina QC report para checagem da qualidade das sequências e remoção dos adaptadores e de sequências de baixa qualidade. O agrupamento em OTUs, a uma distância genética de 0,03, e o cálculo da cobertura e curva de rarefação foram realizados com o programa Mothur

v.1.32.0 As sequências brutas foram filtradas de acordo com instruções do tutorial MiSeq SOP (MiSeq SOP, 2013). RDP-II Classifier foi a base de dados utilizada como referência para inferir as afiliações filogenéticas. A cobertura foi calculada de acordo com a fórmula de Good: $1 - (n-1) / N \times 100$, onde n é o número de OTUs únicas (*singletons*) e N é o total de sequências encontradas.

4-Resultados e discussão

4.1 Características da biblioteca da endorrizosfera de *B. dracunculifolia* com galhas de *Baccharopelma dracuncufoliae*.

A caracterização de uma comunidade bacteriana endofítica por sequenciamento de alta processividade é uma tendência nos trabalhos de diversidade microbiana. Devido à alta capacidade em processar milhões de sequências, essa técnica é capaz de revelar uma diversidade significativamente maior do que a obtida por técnicas com menor poder de sequenciamento, fornecendo um retrato mais fiel da diversidade com a realidade.

Para investigar a composição de bactérias endofíticas de *B. dracunculifolia*, uma biblioteca de fragmentos do gene de rRNA 16S foi construída e sequenciada usando a plataforma IonTorrent™. As sequências parciais do gene de rRNA 16S usadas para análise filogenética foram de 126-176 pb, com média de 152 pb, cobrindo a região variável V4, correspondente a *Escherichia coli* K12. A Tabela 3 resume os dados gerados pelo sequenciamento.

Foram produzidas 992.240 sequências brutas que, após triagem por comprimento, integridade das sequências dos primers e presença de homopolímeros acima de 8 nucleotídeos, restaram 648.124 sequências, sendo 3,5% delas quimeras, 29% cloroplastos e 4% mitocôndrias, os quais foram excluídos das análises posteriores.

A curva de rarefação (Figura 8) obtida plotando o número de OTUs encontradas na biblioteca em relação ao número de sequências demonstrou tendência à estabilidade. A cobertura alcançada foi de 93%.

Tabela 3 - Dados obtidos do sequenciamento de fragmento da região V4 de rDNA 16S de raízes de *B. dracunculifolia* com galha (RG) de *B. dracuncufoliae*.

Dados	RG
Sequências brutas	992.240
Sequências triadas	648.124
Quimeras	22.392
Cloroplastos	190.344
Mitocôndrias	26.664
Sequências exclusivas bactérias	397.628
OTUs	39.879
OTUs únicas	28.114

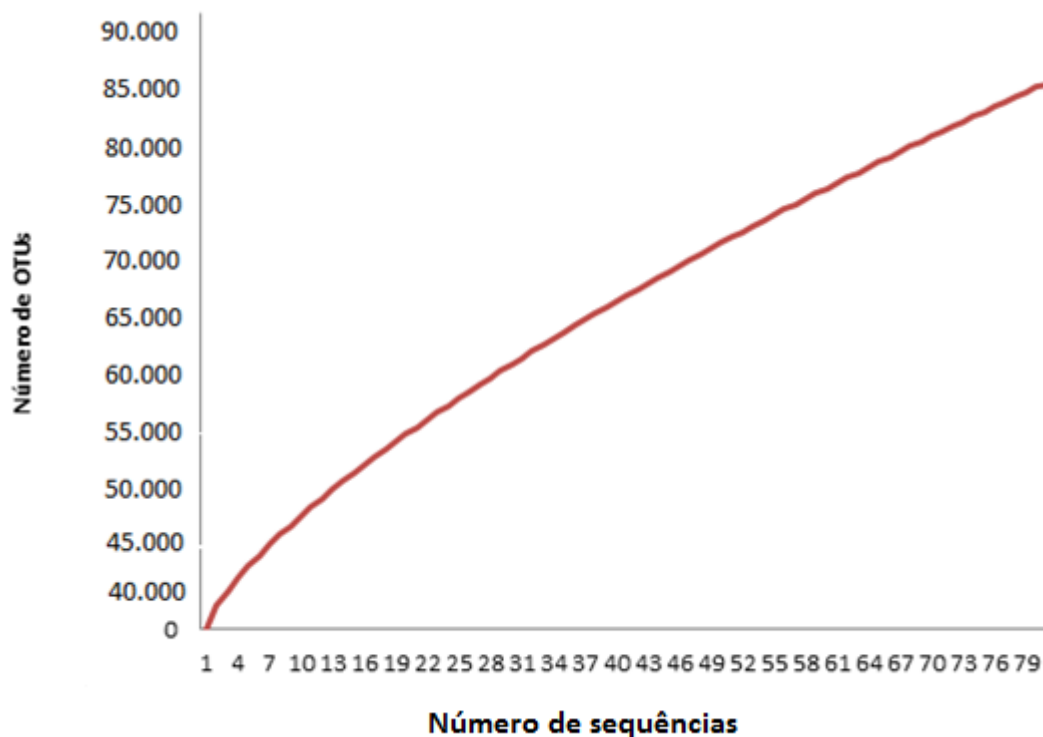


Figura 8 - Curva de rarefação, considerando uma distância genética de 0,03.

4.2 Composição taxonômica da comunidade de bactérias endofíticas

A análise filogenética revelou uma comunidade bacteriana endofítica diversa e complexa. Um total de 39.879 unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foi obtido, representando 17 filos. Entretanto, a maioria das OTUs foi afiliada a cinco filos: Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes. Além disso, as OTUs mais abundantes (50% das sequências) foram associadas a bactérias classificadas apenas no nível do domínio Bactéria. A distribuição relativa dos grupos filogenéticos é mostrada na Figura 9. As “outras bactérias” compreende filos bacterianos tais como *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Armatimonadetes*, *Chloroflexi*, *Chlamydiae*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *TM7*, *Nitrospira*, *Deinococcus-Thermus*, *OD1* e *BRC1*, totalizando 1,8%. A Tabela 4 lista as 40 OTUs mais abundantes e a porcentagem das sequências abrangidas por cada uma delas.

A elevada proporção de sequências não classificadas pode ser explicada pelo fato de o banco de dados não ser completo o suficiente para classificar a grande variedade de

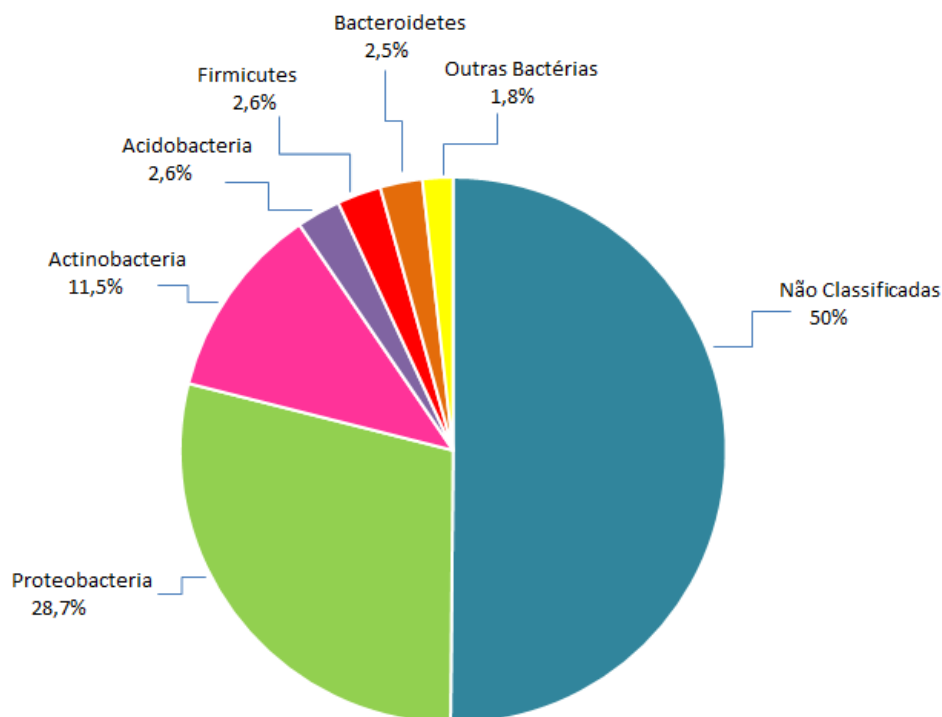


Figura 9 - Distribuição filogenética das OTUs da biblioteca do gene de rRNA 16S de bactéria endofítica da raiz de *B. dracunculifolia* afetadas com galhas induzidas por *B. dracuncufoliae*.

sequências obtidas. A presença de novos filos também deve ser considerada, já que apenas recentemente as comunidades endofíticas tem sido estudadas a partir de métodos independentes de cultivo, capazes de revelar uma infinidade de novos táxons. (Li *et al.*, 2011). Liu e colaboradores (2007) constataram que fragmentos entre 100 e 200 pb do gene rRNA 16S permitem uma classificação robusta, desde que os primers sejam escolhidos adequadamente. Dessa forma, é provável que a extensão das sequências obtidas neste sequenciamento não seja a causa do grande número de sequências não classificadas.

Das 39.879 OTUs obtidas, 70,5% são OTUs únicas (*singletons*). Essa elevada porcentagem deve-se à capacidade das plataformas de sequenciamento de alta processividade gerarem milhões de sequências, proporcionando a oportunidade de se identificar a grande parcela de espécies raras componentes das comunidades microbianas (Fuhrman, 2009).

Tabela 4 - OTUs mais abundantes na endorrizosfera de *B. dracunculifolia* com galha induzida por *B. dracuncifoliae*.

Número da OTU	Filó	Sequência ou organismo próximo	% das sequências
1	Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>	31,7
2	Proteobacteria	<i>Bradrhizobium</i>	21,3
6	Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	17,2
3	Actinobacteria	<i>Microbacteriaceae</i> não classificada	17,0
9	-	Bacteria não classificada	14,0
4	Proteobacteria	<i>Hydrogenophilus</i>	13,0
8	-	Bacteria não classificada	13,0
10	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	11,1
13	Proteobacteria	<i>Burkholderiales</i> não classificada	9,1
5	Firmicutes	<i>Bacillaceae</i> não classificada	8,5
11	Proteobacteria	<i>Methylobacterium</i>	8,5
34	Proteobacteria	<i>Rhodospirillales</i> não classificada	7,8
122	Actinobacteria	<i>Actinobacteria</i> não classificada	6,9
16	Actinobacteria	<i>Actinomycetales</i> não classificada	6,8
7	Proteobacteria	<i>Burkholderiales</i> não classificada	6,5
21	Proteobacteria	<i>Caulobacter</i>	6,3
45	Proteobacteria	<i>Rhodospirillales</i> não classificada	6,2
20	Actinobacteria	<i>Pseudonocardiaceae</i> não classificada	6,0
12	Proteobacteria	<i>Rhizobiales</i> não classificada	5,5
23	Proteobacteria	<i>Labrys</i>	5,3
17	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	5,0
25	Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	4,8
30	Proteobacteria	<i>Rhizobiales</i> não classificada	4,8
28	Proteobacteria	<i>Burkholderia</i>	4,7
32	Actinobacteria	<i>Amycolatopsis</i>	4,6
14	Actinobacteria	<i>Mycobacterium</i>	4,6
48	Proteobacteria	<i>Rhizobiales</i> não classificada	4,4
38	-	Bacteria não classificada	4,4
220	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	4,3
33	Proteobacteria	<i>Comamonadaceae</i> não classificada	4,2
43	Acidobacteria	<i>Acidobacteria_Gp3</i> não classificada	4,1
140	Proteobacteria	<i>Rhizobium</i>	4,1
18	Actinobacteria	<i>Actinomycetales</i> não classificada	4,1
114	Proteobacteria	<i>Acetobacteraceae</i> não classificada	3,9

68	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	3,9
15	-	Bacteria não classificada	3,7
47	Proteobacteria	<i>Phenylobacterium</i>	3,7
27	Proteobacteria	<i>Comamonadaceae</i> não classificada	3,7
77	Proteobacteria	<i>Rhizobiales</i> não classificada	3,7
42	Acidobacteria	Gp2	3,6
40	-	Bacteria não classificada	3,5

Os principais filos identificados são os mesmos presentes em trabalhos de diversidade microbiana em solos do cerrado (Quirino *et al.*, 2009; Rachid *et al.*, 2013). Apenas as proporções de cada filo no ambiente são variáveis, uma vez que dependem das características físicas e químicas peculiares de cada solo. Proteobacteria apresentou a maior porcentagem de táxons da comunidade bacteriana endofítica da raiz de *B. dracunculifolia*, abrangendo 28,7% do total de OTUs, e as classes α - (60%), β - (14%), γ - (7%), δ - (2%) e ϵ -Proteobacteria (0,1%) também estavam presentes (Figura 10). Além disso, proteobactérias não classificadas totalizaram 17%. Estudos anteriores, usando clonagem e sequenciamento tradicional (Sanger) de genes de rRNA 16S, relatam a predominância do filo Proteobacteria na comunidade de bactérias endofíticas presentes em raízes de arroz (Sun e colaboradores, 2008) e de taboa (Li e colaboradores, 2011), com 59,26% e 87,5%, respectivamente. Ao contrário do presente estudo, a classe β -proteobacteria predominou (arroz = 29%, taboa = 46%) Como já mencionado, a análise filogenética revelou predominância da classe α -Proteobacteria. Considerando a afiliação no nível de gênero, *Methylobacterium* foi a população dominante (3,8%) tanto da classe α -proteobacteria, quanto em relação ao número total de OTUs (0,66%). Os segundos gêneros dominantes foram *Caulobacter* e *Labrys* (0,88% cada um) e os outros gêneros, *Sphingomonas*, *Phenylobacterium*, *Bosea*, *Dongia*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Novosphingobium*, *Sphingosinicella*, *Hyphomicrobium*, *Rhodomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Brevundimonas*, *Microvirga*, *Sphingobium*, *Geminicoccus*, *Beijerinckia*, *Hansschlegelia*, *Rhodopila*, *Agromonas*, *Paracoccus*, *Craurococcus* somaram 2,4%. Além disso, 15 OTUs únicas foram identificadas até gênero.

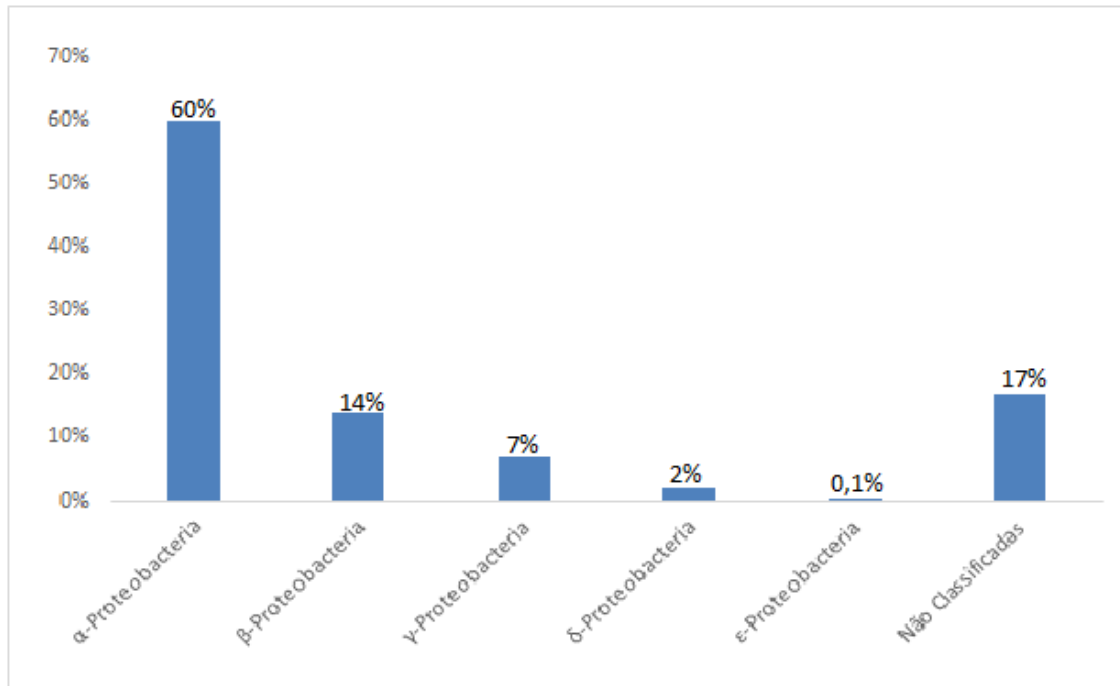


Figura 10 - Distribuição de OTUs por classes do filo Proteobacteria.

Representantes do gênero *Methylobacterium*, ordem Rhizobiales, são gram-negativos oxidadores de metano e são frequentemente encontrados como endófitos. Outras características atribuídas a este gênero são sua capacidade para metilotrofia, formação de biofilmes, produção de *quorum-sensing*, resistência a metais pesados e outros estresses e promoção do crescimento vegetal pela síntese de hormônios (Pat *et al.*, 1976; Ivanova *et al.*, 2001; Lidstron e Chistoserdova, 2002). Interessantemente, estudo recente mostrou que mudanças na comunidade endofítica foram induzidas por *Methylobacterium*, levando a uma proteção da planta contra ataque de patógenos (Ardanov *et al.*, 2012). Este dado sugere que membros deste gênero, o qual foi o mais abundante no presente estudo, poderia, de alguma forma, proteger a planta contra galhas de insetos. Entretanto, estudos posteriores, incluindo *B. dracunculifolia* sadia (sem galha), são necessários para confirmar esta hipótese. Bactérias do gênero *Caulobacter* são típicas de ambientes aquáticos (Bowers *et al.*, 1954; Patel *et al.*, 2009) embora tenham sido descritas como membros de várias comunidades endofíticas: raízes de arroz (Mano e Morisaki, 2008), soja (Kuklinsky-Sobralet *et al.*, 2004), citrus (Trivedi *et al.*, 2010) e folhas e ramos de álamo (Ulrich *et al.*, 2008).

Bactérias afiliadas ao gênero *Labrys*, ordem Rhizobiales, também estão presentes na endorrizosfera de *B. dracunculifolia*. Membros deste gênero são

encontrados em solos, sedimentos (Albert *et al.*, 2010), rizosfera de diferentes plantas (Islam *et al.*, 2007), e em nódulos de raízes de *Neptunia oleracea* (Chou *et al.*, 2007). São capazes de degradar diferentes compostos haloaromáticos, principalmente aqueles fluorados, como fontes de carbono e de energia (Carvalho *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2012a, b).

O gênero *Sphingomonas* é encontrado em águas de rio (Wittich *et al.*, 1992), sistemas de distribuição de água (Sun *et al.*, 2013) e solo (Leys *et al.*, 2004). Algumas espécies são conhecidas por metabolizarem poluentes orgânicos e outras são patógenos humanos (Yim *et al.*, 2013). Como integrante de comunidades endofíticas foi encontrado em sementes de milho (Liu *et al.*, 2012), brotos de mamão (Thomas *et al.*, 2007) choupo, salgueiro e raiz de arroz (Videira *et al.*, 2009). Suas funções benéficas à planta incluem fixação de nitrogênio e degradação de xenobióticos (Doty *et al.*, 2009; Videira *et al.*, 2009; Stolz *et al.*, 2000).

Espécies do gênero *Phenylobacterium*, por sua vez, já foram isoladas de diversos ambientes, tais como águas subterrâneas alcalinas (Tiago *et al.*, 2005), aquíferos termais subterrâneos (Kanso e Patel, 2004), sistema de lodo ativado (Aslam *et al.*, 2005) e solos (Oh e Roh, 2012). Esse gênero também apresenta a capacidade de metabolizar o herbicida chloridazon (Lingens *et al.*, 1985) e compostos fenólicos (Baldrian *et al.*, 2012). Como bactéria endofítica, poucos trabalhos relatam sua ocorrência tais como raízes da árvore Peônia (*Paeonia ostii*) (Han *et al.*, 2011) e de soja (Molina *et al.*, 2012).

Poucas OTUs (14%) da classe β -Proteobacteria foram classificadas no nível de gênero. *Hydrogenophilus* foi o mais representativo (9,7%). *Hydrogenophilus thermoluteolus* foi a primeira espécie do gênero a ser isolada, de fonte termal (Hayashi *et al.*, 1999), sendo frequente nesse ambiente. Embora bactérias desse gênero sejam termofílicas, esta espécie já foi descrita em um lago subglacial na Antártida (Lavire *et al.*, 2006). *H. thermoluteolus* apresenta, ainda, a capacidade de oxidar hidrogênio e derivados do enxofre, como tiosulfato (Miyake *et al.*, 2007).

Burkholderia é uma β -Proteobacteria tipicamente endofítica, sendo a segunda mais abundante desta classe, totalizando 1,3%. As espécies desse gênero podem promover benefícios à planta como: resiliência ao estresse hídrico, comum em solos de cerrado (Naveed *et al.* 2014), degradação de poluentes orgânicos (Andreolli *et al.*, 2013),

proteção contra doenças fúngicas (Fishal *et al.*, 2010) e promoção do crescimento (Compant *et al.*, 2005).

O gênero *Cupriavidus* (0,4%), abriga bactérias predadoras de outras bactérias e fungos. A espécie-tipo *Cupriavidus necator* foi isolada pela primeira vez de solo (Makkar e Casida, 1987; Vandamme e Coenye, 2004) e tem revelado a capacidade de produzir PHA, um polímero biodegradável (Cavalheiro *et al.*, 2009). A espécie *Cupriavidus metallidurans* é útil na detoxificação de metais pesados, como cobalto e cromo (Von Rozycki e Nies, 2009). Como bactéria endofítica, tem sido descrita em raízes de leguminosas (Barrett e Parker, 2006). Essa capacidade tem sido explicada pela aquisição de genes simbióticos de *Rhizobium* por transferência gênica horizontal (Andam *et al.*, 2007).

O gênero *Limnobacter* (0,31%) foi isolado pela primeira vez em sedimentos de lago (Spring *et al.*, 2001), e já foi encontrado em depósitos vulcânicos (Lu *et al.*, 2008) e na neve dos Andes (Toril *et al.*, 2009). Bactérias desse gênero são capazes de oxidar tiosulfato (Lu *et al.*, 2011) e degradar fenol (Vedler *et al.*, 2013). Como endófito, já foi identificado em sementes de milho (Liu *et al.*, 2013).

O gênero *Herbaspirillum* (0,19%), por sua vez, é um conhecido fixador de nitrogênio associado às raízes (Baldani *et al.*, 1986) de gramíneas (Olivares *et al.*, 1996) e arroz (Elbeltagy *et al.*, 2001). Algumas espécies exercem funções importantes para a planta, como a produção dos hormônios ácido indol acético-3 e giberelina (Bástian *et al.*, 1998).

A classe γ -Proteobacteria também revelou poucos gêneros conhecidos, sendo pouco representativa (2%). Dentre eles, *Acinetobacter* exibiu a maior porcentagem de OTUs da classe (9,5%). Esse gênero apresenta muitas espécies patogênicas (Bergogne-Berezin *et al.*, 1996; Peleg *et al.*, 2008), mas sua presença já foi detectada em plantas. Uma linhagem já foi encontrada na rizosfera de pepinos com a habilidade de degradar uma molécula de *quorum sensing*, mostrando potencial aplicação em biocontrole (Kang *et al.*, 2004). Em outro trabalho, Kay e colaboradores (2002) descobriram uma linhagem de *Acinetobacter* do solo que coloniza oportunisticamente plantas infectadas com a bactéria patogênicas *Ralstonia solanacearum*. Além disso, *Acinetobacter* e *Aquicella*, também encontradas neste estudo (3,2%) foram associadas a plantas resistentes ao cobre (Sun *et al.*, 2010), o que pode indicar alguma tolerância a metais pesados. Já o gênero

Steroidobacter (1,6%) abriga bactérias desnitrificantes e degradadoras de hormônios esteroides (Kuever *et al.*, 2008).

Neste estudo, membros do gênero *Hydrocarboniphaga* totalizaram 1,5%. Bactérias desse gênero já foram isolados de lago de água doce, *Hydrocarboniphaga daqingensis* (Liu *et al.*, 2011) e de solo contaminado com óleo, *H. effusa*, as quais apresentam capacidade de degradar hidrocarbonetos aromáticos e alcanos, com potencial aplicação em biorremediação (Palleroni *et al.*, 2004). Deve-se destacar que este é o primeiro relato deste gênero como bactéria endofítica de *B. dranculifolia*.

Actinobactérias são amplamente reconhecidas como patógenos e pelo seu papel em processos ambientais devido à degradação de material de plantas e, como uma das fontes mais importantes de metabólitos secundários bioativos, como, por exemplo, antibióticos. Elas são geralmente encontradas em solos, mas recentemente ambientes endofíticos têm revelado ser uma fonte rica destas bactérias biossinteticamente profílicas (Berdy, 1995). No presente estudo, o filo Actinobacteria foi o segundo em abundância abrigando gêneros variados, destacando-se: *Solirubrobacter* (1,5%), *Conexibacter* (1,47%), ambos da ordem *Solirubrobacterales*, e gêneros *Nocardioides* (0,67%) e *Kutzneria* (0,58%).

Solirubrobacter são bactérias mesofílicas encontradas no solo (Singleton *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2007). Trabalhos recentes mostram *Solirubrobacter* como representante de comunidades endofíticas, tendo sido encontrado em batatas (Franco *et al.*, 2013) e na rizosfera de citrus (Trivedi *et al.*, 2012).

Bactérias do gênero *Conexibacter* são encontradas em diferentes solos. (Mociardini *et al.*, 2003; Seki *et al.*, 2012). Seu papel como endófito ainda é desconhecido. Este, já foi descrito em batatas (Franco *et al.*, 2013) e gramíneas (Videira *et al.*, 2013). O gênero, por sua vez, reúne bactérias capazes de metabolizar herbicidas, como o S-triazina, e compostos aromáticos, como piridina, já tendo sido isolado de solos usados para agricultura e óleo de xisto (Topp *et al.*, 2000; Seki *et al.*, 2012). O gênero *Kutzneria* tem sido explorado pela sua capacidade de produção de diferentes compostos químicos, mas nenhum em comum com os medicinais de *B. dracunculifolia*. Não foram encontrados trabalhos na literatura de representantes endofíticos dos gêneros *Nocardioides* e *Kutzneria*.

O gênero *Pseudonocardia*, correspondeu a 0,54% das OTUs classificadas no filo Actinobacteria. As espécies *P. endophytica* e *P. tropica* foram isoladas em plantas medicinais chinesas (Chen *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010). Entretanto, o papel dessas bactérias em relação às propriedades medicinais das plantas ainda não foi investigado. Além disso, outras espécies de *Pseudonocardia* foram encontradas em raízes e caules de eucaliptos (Kaewkla e Franco 2010; 2011) e de absinto (Zhao *et al.*, 2011). Novas espécies de actinobactérias têm sido isoladas recentemente como endófitos, inclusive de plantas medicinais (Quin *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2012), sendo produtores potenciais de novas drogas para indústria farmacêutica e biocontrole, estimulando respostas de defesa da planta. Portanto, este estudo mostra que *B. drancunculifolia* é fonte potencial de alta diversidade, abrigando gêneros endofíticos raros de Actinobacteria.

Gêneros do filo Acidobacteria gp1 gp2, gp3, gp4, gp5, gp6 e gp16 totalizaram 43% das OTUs. Acidobacteria gp3 foi o gênero mais representativo dentro do filo Acidobacteria, representando 17,5%, e o segundo em relação ao total de OTUs recuperadas de *B. drancunculifolia* classificadas no nível de gênero, com 0,54%. Acidobactérias são amplamente encontradas em solos e sedimentos, variando de 10 a 50% das sequências de genes de rRNA 16S em bibliotecas (Barns *et al.*, 2007). Uma vez que *B. drancunculifolia* é uma espécie encontrada em cerrados, bioma característico por seus solos com variados graus de acidez (Rachi *et al.*, 2013), é interessante notar a capacidade dessas bactérias de adentrar a raiz dessa planta, saindo de seu micro-habitat no solo. Entretanto, membros do filo Acidobacteria também foram descritos em outros ambientes, como água doce, oceanos e ambientes poluídos (Ward *et al.*, 2009; Barns *et al.*, 1999). Deve-se, ainda, destacar a capacidade dessas bactérias de resistência em ambientes pouco favoráveis, como os contaminados com metais e ácidos, o que indicaria a presença de enzimas capazes de transformar esses compostos (Barns *et al.*, 2007; Navarro-Noya *et al.*, 2010).

O filo Firmicutes abrigou 2,6% das OTUs. Destas, apenas 13% foram classificadas no nível de gênero. Dentre as OTUs classificadas até gênero 15% são *singletons*. Os gêneros mais abundantes foram *Paenibacillus* e *Streptococcus*, cada um com 1,54%. Integrantes do gênero *Paenibacillus* incluem bactérias do solo que frequentemente são descritas como endofíticas, por invadirem as raízes e formarem biofilmes (Timmusk *et al.*, 2005). Muitos trabalhos relatam a capacidade dessas bactérias de promover o crescimento vegetal pela produção de hormônios, como citocininas e

auxinas, além de defesa contra patógenos e condições abióticas estressantes (Nielsen e Sorensen, 1997; Timmusk e Wagner, 1999; Timmusk *et al.*, 1999). É importante mencionar, ainda, que Lebuhn e colaboradores (1997) identificaram a produção de ácido benzoico pela espécie *P. polymyxa*, isolada do rizoplano do trigo, do solo da rizosfera e solo não rizosférico. Este composto fenólico é um dos constituintes do própolis verde de *B. dracunculifolia* (Chang *et al.*, 2008), o que é uma evidência da possível contribuição de bactérias endofíticas para a produção dos metabólitos secundários característicos dessa planta medicinal. O gênero *Streptococcus*, por sua vez, tem sido associado a doenças (Marco *et al.*, 2013; Veloso *et al.*, 2013), sendo o presente estudo o primeiro a relatar a presença do gênero numa comunidade endofítica.

O filo Bacteroidetes agrupou 2,5% do total de OTUs, sendo 20,5% delas classificadas no nível de gênero. *Ohtaekwangia* foi o gênero mais representativo (8%). *Ohtaekwangia* foi isolada pela primeira vez de areia marinha (Yoon *et al.*, 2010) e existem trabalhos que atestam sua capacidade de produzir diversos metabólitos secundários com atividade antiparasítica e anticarcinogênica. (Okanya, 2012). Esses metabólitos, contudo não estão presentes no própolis verde de *B. dracunculifolia*. O gênero *Mucilaginibacter* foi o segundo mais rico em OTUs do filo, com 3,6% das OTUs de Bacteroidetes encontradas. Bactérias deste gênero são capazes de metabolizar compostos chamados ginsenoides (Cui *et al.*, 2013), que também não estão presentes em *B. dracunculifolia*.

4.3 Características das bibliotecas de rDNA 16S de folhas de plantas masculinas com galha (MS) e masculinas sadias (MG)

O sequenciamento pela plataforma Illumina Hiseq 2000 gerou um total de 1.331.000 sequências brutas. Após triagem para qualidade, o número de sequências foi reduzido para 962.668 com comprimento entre 91-99 pb, com média de 56 pb. Sequências correspondentes a cloroplastos e mitocôndrias foram excluídas das análises posteriores (Tabela 5). Utilizou-se o mesmo programa para detectar quimeras, não sendo nenhuma encontrada. As sequências restantes totalizaram 337 OTUs.

Tabela 5 - Dados das sequências obtidas nas bibliotecas de rDNA 16S de folhas de plantas masculinas com galha (MS) e masculinas sadias (MG).

Dados	MG	MS
	519.711	442.957
Sequências pós- triagem de qualidade		
Cloroplastos	492.685 (94,7%)	422.506 (95%)
Mitocôndrias	17.613 (3%)	11.661 (2,6%)
Sequências de bactérias	9413	8790
Quimeras	0	0
OTUs	228	213

As curvas de rarefação sobrepostas (Figura 12) demonstraram tendência à estabilidade, sendo as coberturas atingidas de 99% para ambas bibliotecas (MG e MS). Entretanto, estas análises deverão ser consideradas como preliminares, pois foram detectadas sequências não classificadas como cloroplastos. Essas, portanto, deverão ser futuramente inspecionadas, para incluí-las ou excluí-las.

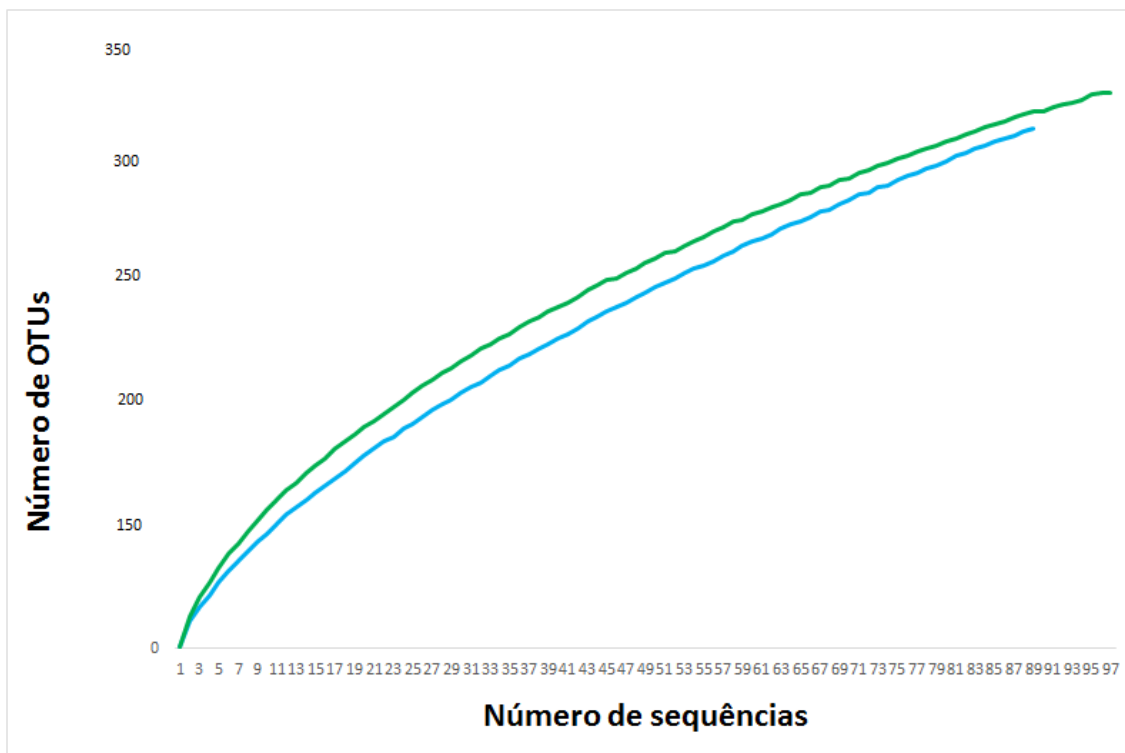


Figura 12 - Curva de rarefação das bibliotecas de plantas masculinas com galha (MG) (linha verde) e masculinas sadias (MS) (linha azul), para uma distância genética das OTUs de 0,03.

4.3.1 Comparação entre bibliotecas de rDNA 16S de plantas masculinas com galha (MG) e masculinas sadias (MS)

Semelhantemente ao sequenciamento realizado pelo plataforma Ion Torrent™, a maior parte das OTUs, incluindo as mais abundantes, foi composta principalmente por bactérias não classificadas no nível de filo (61,4% para MG e 54,5% para MS). Nesse caso, o curto comprimento das sequências obtidas pode ter comprometido a qualidade da classificação das sequências. Além disso, não se exclui a limitação do banco de dados quanto à identificação de sequências novas devido a presença de novos filos. As bibliotecas de MG e de MS revelaram OTUs exclusivas e compartilhadas, com frequências similares (MG exclusiva - 36,8%, MS exclusiva - 32,3% e compartilhadas - 30,8%), como ilustradas na Figura 13.

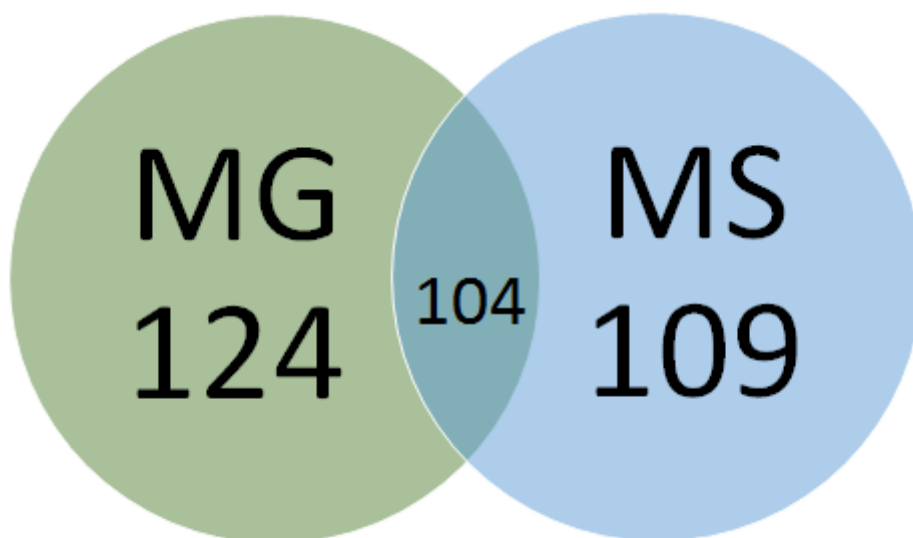


Figura 13 - Diagrama de Venn mostrando o número de OTUs exclusivas e compartilhadas recuperadas das bibliotecas de macho com galha (MG) e de macho sadio (MS). As OTUs foram definidas a partir de uma distância genética de 0,03.

A análise filogenética revelou cinco filos: Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria, comuns a ambas bibliotecas, enquanto Chlorobi e Bacteroidetes são exclusivos das bibliotecas MG e MS, respectivamente (Figuras 14A e 14B). O teste estatístico Libshuff encontrou diferença significativa entre as duas bibliotecas ($p < 0,05$) para um intervalo de confiança de 95%.

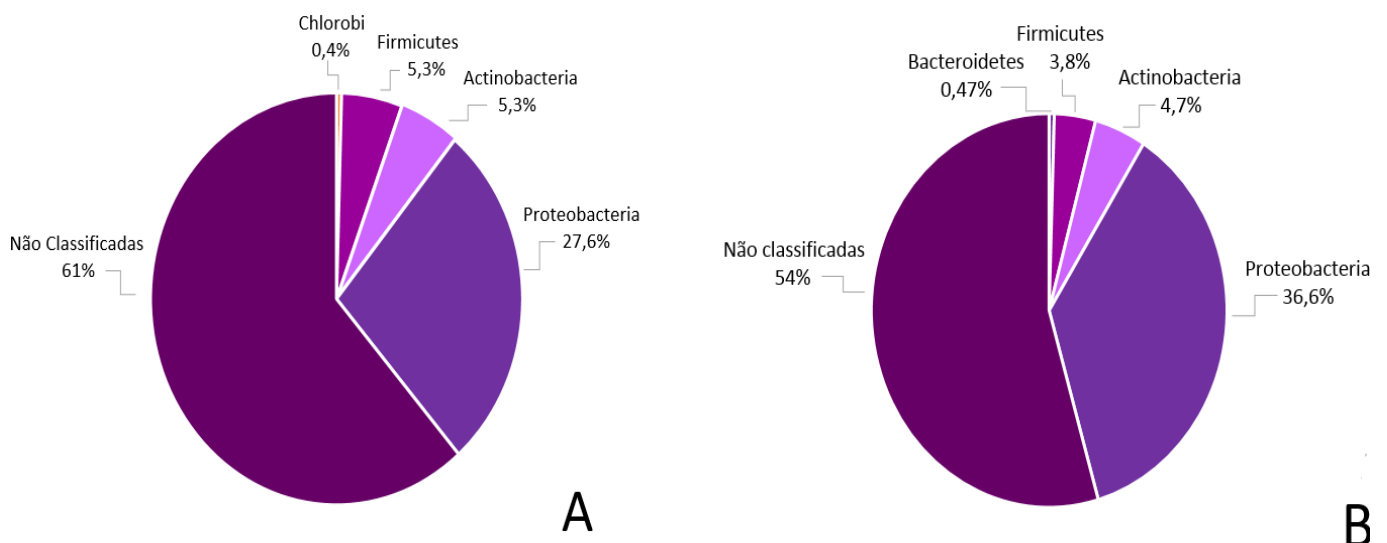


Figura 14 - **A**. Distribuição filogenética das OTUs de folhas de plantas demacho sadio (MS) e **B** de macho com galha (MG) de *B. dracunculifoliae*.

As classes, α -, β -, γ -Proteobacteria, Actinobacteria, Bacili e Clostridia foram comuns às bibliotecas MG e MS (Figura 15). A classe γ -Proteobacteria apresentou a maior diferença entre as bibliotecas quanto ao número de OTUs (6,6% e 12,8% para MG e MS, respectivamente). Por outro lado, a classe Chlorobia foi exclusiva de MG, enquanto δ -proteobacteria e Negativicutes (filo Firmicutes) foram exclusivas de MS.

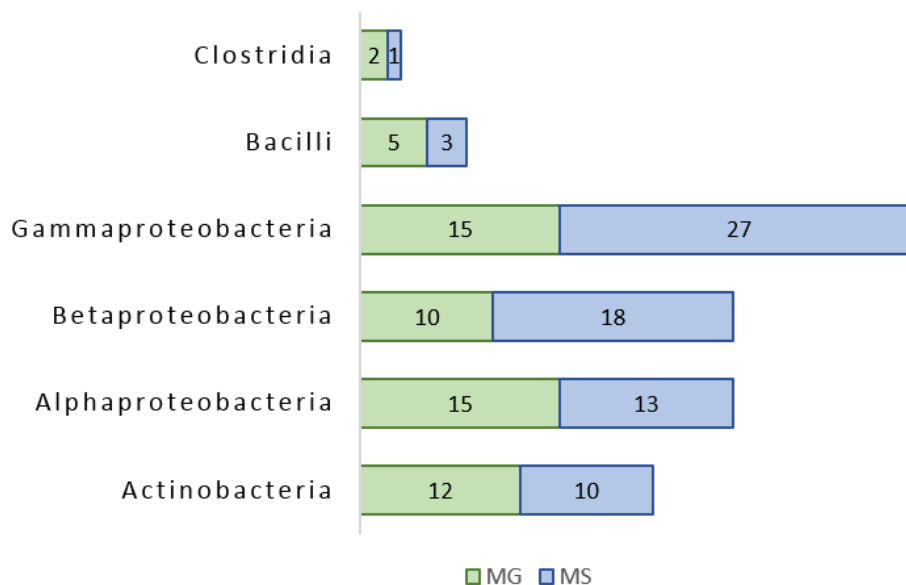


Figura 15 - Distribuição das OTUs obtidas de folhas de plantas masculinas com galha (MG) e masculinas sadias (MS) de *B. dracunculifoliae*, nas classes compartilhadas por ambas. Os números correspondem às OTUs encontradas em cada classe.

Identificou-se um total de 27 gêneros nas comunidades bacterianas de folhas de *B. dracunculifolia* masculinas com e sem galha induzida por *B. dracunculifoliae*. Apenas *Thiotrix* e *Acinetobacter* apresentaram mais de uma OTU, (*Thiotrix* - duas em MS e *Acinetobacter* - uma em MS e uma em MG). Desse número, 22% foram exclusivos de MG, 33% exclusivos de MS e o restante, 45%, foi compartilhado por ambos (Figura 16).

Dentre os gêneros encontrados apenas em MG, alguns merecem comentário. *Rothia* é um gênero do filo Actinobacteria cuja espécie mais estudada é *Rothia dentocariosa*, bactéria patogênica causadora de endocardite. Membros desse gênero não são tipicamente endofíticos. Entretanto, recentemente, uma nova espécie, *Rothia endophytica*, foi isolada de raízes de loureiro (Xiong *et al.*, 2013). *Brevidimonas* foi o gênero encontrado como dominante em comunidades endofíticas da rizosfera de plantas de pradaria capazes de degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Phillips *et al.*, 2008). O gênero *Vogesella* compreende espécies encontradas em diferentes ambientes, como águas de rio (Grimes *et al.*, 1997), águas de nascente, (Chou *et al.*, 2007) e lagos (Jorgensen *et al.*, 2010). O gênero *Pseudoalteromonas* abriga espécies marinhas, inclusive encontradas em águas oceânicas na Antártica (Médigue *et al.*, 2005). Algumas delas se associam a organismos superiores para produzir compostos biologicamente ativos contra vários organismos, como outras bactérias, fungos e algas (Holmström *et al.*,

2008). Finalmente, o gênero *Moraxella* contém espécies patogênicas ao homem e a maioria dos trabalhos tem se restringido ao estudo dos mecanismos de patogenicidade. Entretanto, uma linhagem de *Moraxella spp* foi caracterizada por Spain e Gibson (1991) em sua capacidade de degradar o composto fenólico *p*- Nitrofenol. Outra espécie foi recentemente identificada por Jebasingh *et al.* (2013) por sua capacidade de degradar o poluente acrilamida. Existem poucos trabalhos identificando esse gênero como membro de comunidades endofíticas e seu papel nelas ainda é desconhecido.

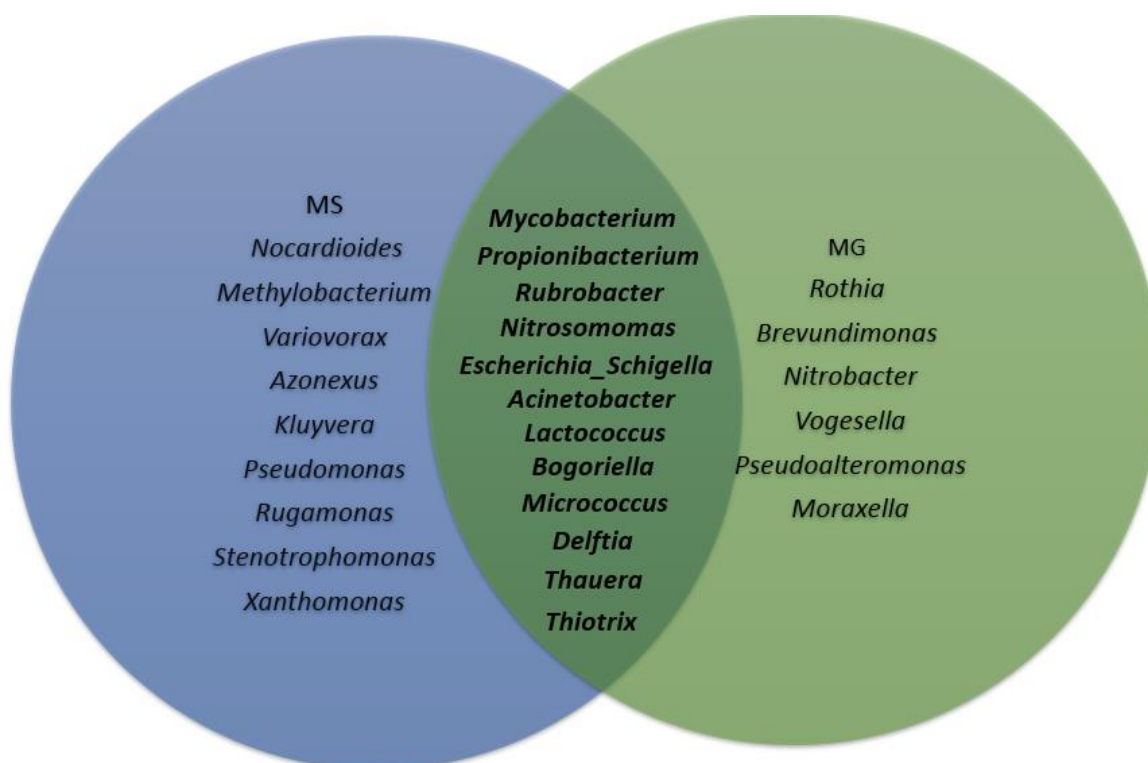


Figura 16 - Diagrama de Venn ilustrando a distribuição dos gêneros compartilhados pelas bibliotecas de *B. dracunculifolia* masculinas com galha (MG) e masculinas sadias (MS).

Nove gêneros foram encontrados somente na biblioteca de MS: *Nocardioides*, *Methylobacterium*, *Variovorax*, *Azonexus*, *Kluyvera*, *Pseudomonas*, *Rugamonas*, *Stenotrophomonas* e *Xanthomonas*. Bactérias do gênero *Nocardioides* são versáteis metabolicamente, capazes de degradar diversos compostos, como hormônios esteroides (Homklm, 2012), antrazina (Piutti *et al.*, 2003), dibenzofuranos (Kubota *et al.*, 2005), alcanos (Hamamura e Arp, 2000) e outros compostos complexos (Fokina e Donova, 2003). Além disso, já foram encontradas na planta medicinal *Jatropha curcas* (Qin *et al.*, 2012). O gênero *Methylobacterium*, curiosamente, também foi encontrado neste estudo

na endorrizosfera de *B. dracunculifolia* afetada por galhas. Assim, pode-se supor que a presença ou ausência do inseto *B. dracuncifoliae* não é determinante para a presença dessa bactéria como endófito. *Variovorax*, assim como o gênero *Nocardioides*, abriga espécies metabolicamente diversas, hábeis para lidar com diversos compostos como os poluentes esteres ftalatos (Prasad e Suresh, 2012) e o herbicida Linuron e seu subproduto 3,4-dicloroanilina (Breugelmans *et al.*, 2010). Também é importante mencionar sua participação no ciclo do enxofre (Inceoglu *et al.*, 2012), tolerância a diversos metais pesados (Belimov *et al.*, 2005), promoção do crescimento vegetal e tolerância a condições de estresse (Sharp *et al.*, 2011). Todas essas habilidades justificam a presença desse gênero em um ambiente tão restrito como o tecido foliar. Por sua vez, o gênero *Azonexus* é composto por bactérias desnitrificantes (Quan *et al.*, 2006). O gênero *Stenotrophomonas* é representado principalmente por espécies de importância clínica, mas alguns trabalhos tem mostrado algumas espécies com propriedades interessantes como síntese de nanopartículas de ouro e prata (Malhotra *et al.*, 2013) e remoção de cobre do ambiente (Gosh e Saha, 2013). O gênero *Xanthomonas* inclui espécies patogênicas de plantas (Zhu, 2013).

Os gêneros compartilhados por ambas bibliotecas apresentam aspectos semelhantes àqueles já descritos, principalmente quanto à capacidade de degradar compostos variados e suportar algumas condições extremas. Dentre eles, encontra-se o gênero *Thauera*, o qual foi o mais abundante entre as OTUs classificadas até esse nível, reunindo 20 sequências. Bactérias desse gênero são descritas como desnitrificantes degradadoras de tolueno (Bhandare *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2013) monoterpênicos, metabólitos secundários presentes em plantas (Foss e Harder, 1998), compostos aromáticos (Philipp *et al.*, 2002) e fenólicos (Gallus *et al.*, 1997). *Nitrosomonas* é um gênero de bactérias nitrificantes (Mumper *et al.*, 2013), enquanto *Rubrobacter* abriga espécies resistentes a radiação gama, termofílicas e halotolerantes (Terato *et al.*, 1999; Jurado *et al.*, 2012). Membros do gênero *Micrococcus* são úteis para uma série de propósitos como biorremediação, pois são capazes de realizar biossorção de metais pesados (Puyen *et al.*, 2012) degradar poluentes tal como 2-nitrotolueno (Mulla *et al.*, 2013) e verde malaquita (Du *et al.*, 2013), síntese de nanopartículas de ouro (Arunkumar *et al.*, 2013) e promoção do crescimento vegetal (Dastager *et al.*, 2013). Os representantes do gênero *Delftia* incluem bactérias patogênicas e outras com aptidão para degradar uma variedade de compostos fenólicos (Jimenez *et al.*, 2012), o que é muito interessante, uma

vez que *B. dracunculifolia* é uma planta rica em tais substâncias. Além de compostos fenólicos, bactérias desse gênero também degradam herbicidas (González *et al.*, 2012), poluentes do grupo das cloroanilinas (Zhang *et al.*, 2010) e compostos presentes em inseticidas (Yang *et al.*, 2011).

4.4 Perfil de restrição do amplicon do gene de rRNA 16S

Diversos estudos têm revelado diferenças da microbiota humana na saúde e na doença (Ley *et al.*, 2006). Por isso, investigou-se e comparou-se a composição da microbiota de folhas de plantas doentes (com galha) e saudáveis (sem galha). Para isso, usou-se ARDRA, uma abordagem simples e rápida. Das três enzimas testadas, *AluI* foi a que gerou o maior número de fragmentos, sendo o perfil ARDRA ilustrado na Figura 11. Nenhuma das três enzimas apresentou diferença de perfil de restrição entre as amostras.

Diferentemente do resultado obtido neste estudo, Oki e colaboradores (2009) relataram diferença na composição de fungos endofíticos em plantas masculinas e femininas de *B. dracunculifolia*. Entretanto, como a riqueza de fungos endofíticos encontrada foi baixa, eles destacaram a necessidade de mais estudos sobre o assunto. Outros trabalhos reforçam a baixa contribuição do sexo em diversos aspectos de *B. dracunculifolia*. Espírito-Santo e Fernandes (1998), por exemplo, observaram que o sexo da espécie não influenciou na abundância de galhas de *Baccharopelma dracunculifoliae* nem na variação da concentração de taninos. Araújo e colaboradores (2003) também não encontraram influência do sexo na variação da abundância e diversidade de insetos galhadores em *Baccharis pseudomyriocephala*.

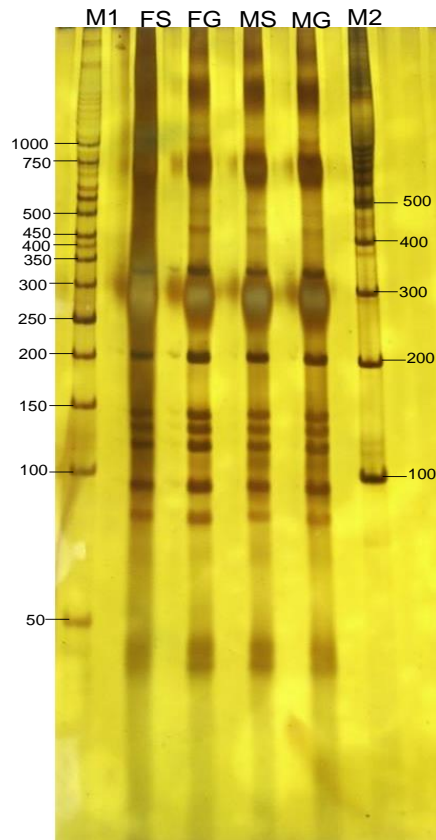


Figura 11 - Perfil de restrição do amplicon do gene de rRNA 16S de plantas femininas sadia (FS) e com galha (FG); masculinas sadia (MS) e com galha (MG). Os fragmentos obtidos variaram em tamanho entre 120 e 1000 pares de bases. M1: marcador de peso molecular de 50 pb (Ludwig Biotec); M2: marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotec).

Neste estudo, o rDNA 16S bacteriano não foi separado do plastidial e mitocondrial, uma vez que a clivagem dos dois últimos pelas enzimas de restrição resulta em perfil idêntico entre as amostras estudadas. Assim, a presença de variação entre os perfis revelaria grupos taxonômicos bacterianos exclusivos de cada amostra.

Viti e Giovannetti (2005), ao comparar os perfis de ARDRA entre bactérias provenientes de um solo poluído com cromo e outro não poluído, relataram que a enzima de restrição *RsaI* apresentou mesmo perfil para isolados de *Arthrobacter globiformis* e *Arthrobacter oxydans*. A diferença entre as espécies foi revelada pelo perfil obtido com *AluI* e *CfoI*, demonstrando a importância de se utilizar mais de uma enzima de restrição na abordagem ARDRA. Uma possível explicação para a ausência de diferença na composição de bactérias endofíticas entre plantas sadias e com galha pode ser devido ao DNA total dos espécimes com galha ter sido extraído de uma folha aparentemente normal, e não da própria galha. A tentativa de extrair o DNA da galha foi feita, mas sem sucesso

devido à baixa qualidade do DNA obtido. Portanto, para confirmar se a comunidade endofítica bacteriana local da galha difere do restante da planta, a caracterização e comparação dessas comunidades são necessárias.

Deve-se, ainda, considerar que apenas três enzimas de restrição foram testadas, não se podendo, portanto, afirmar que não existem diferenças na composição das comunidades endofíticas entre plantas femininas sadias, femininas com galha, masculinas sadias e masculinas com galha. Além disso, o sequenciamento realizado pela plataforma Illumina revelou diferença significativa entre as comunidades bacterianas endofíticas de plantas sadias e com galha, contrariando o resultado obtido com o ARDRA. Destaca-se, ainda, que a reação de restrição foi executada quatro vezes, e o perfil obtido foi o mesmo, sem diferenças entre as amostras. A alta reprodutibilidade do ARDRA é reconhecida pela literatura (Viti e Giovannetti, 2005).

5-Conclusão

O sequenciamento pela plataforma PGM Ion Torrent™ da comunidade endofítica bacteriana da endorrizosfera de *Baccharis dracunculifolia* afetada por galhas induzidas por *Baccharopelma dracunculifoliae* revelou-se diversa e complexa, abrigando gêneros raros com potencial para produção de metabólitos secundários bioativos. O fato de 50% das OTUs não terem sido classificadas no nível de filo cria uma oportunidade de descoberta de novos filos. Por sua vez, os perfis obtidos pelo ARDRA não exibiram diferenças na composição de bactérias endofíticas entre plantas sadias e com galha, bem como entre plantas masculinas e femininas. Entretanto, esse resultado não foi suficiente para afirmar que essas comunidades são similares, uma vez que apenas três enzimas de restrição foram utilizadas. Estes dados foram discordantes da caracterização da microbiota das folhas de machos sadios e com galha obtida pelo sequenciamento Illumina Hiseq 2000, que mostrou diferença significativa entre as duas bibliotecas. As folhas de plantas masculinas sadias e com galha e abrigaram uma comunidade bacteriana moderadamente diversa, diferindo significativamente entre si. Isso sugere que o inseto galhador interfere na composição da comunidade endofítica. Além disso, a presença de bactérias produtoras e degradadoras de metabólitos secundários é um indício de que esses microrganismos podem interagir, de alguma forma, com os compostos já conhecidos produzidos por *B. dracunculifolia*.

Referências

- Abrahamson W. G., McCrea K. D.** (1986) The impact of galls and gallmakers on plants. *Proceeding of the Entomological Society* 88: 364-367.
- Ahmad S., Johnson-Cicalese, J.M., Dickson, W.K. and Funk, C.R.** (1986). Endophyte-enhanced resistance in perennial ryegrass to the bluegrass billbug *Sphenophorus parvulus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 41:3-10.
- Albert A.A., Waas N.E., Langer S., Pavlons S.C., Feldner J.L., Rossello R., Rosseló-Mora R., Busse H.** (2010) *Labrys wisconsinensis* sp. nov., a budding bacterium isolated from Lake Michigan water, and emended description of the genus *Labrys*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 1570–1576.
- Andreolli M., Lampis S., Poli M., Gullner G., Biró B., Vallini G.** (2013) Endophytic *Burholderia* DBT1 can improve phytoremediation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere* 92: 688-694.
- Andreote, F.D., Rocha U.N., Araújo L., Azevedo J.L., van Overbeek L.S.** (2010) Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). *Antonie van Leeuwenhoek* 97 (4): 389-399.
- Applied biosystems.** Nota de Aplicação: sequenciamento de amplicon, 2011. Disponível em: <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_marketing/documents/generaldocuments/cms_094273.pdf>. Acesso em: 22 out. 2013
- Arachevaleta M., Bacon C.W., Hoveland C.S., Radcliffe D.E.** (1989) Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agronomy Journal* 81: 83-90.
- Araújo W. L., Marcon J., Maccheroni Jr. W., van Elsas J. D., van Vuurde W. L. J., Azevedo J. L.** (2002) Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4906 - 4914.
- Araújo A.A., Carneiro M.A.A., Fernandes GW** (2002) Efeitos do sexo, do vigor e do tamanho da planta hospedeira sobre a distribuição de insetos indutores de galhas em *Baccharis pseudomyriocephala* Teodoro (Asteraceae). *Revista Brasileira de Entomologia* 47: 483-490.
- Ardanov. P., Leonid Ovcharenko L., Zaets I., Kozyrovska N., Pirttilä A.** (2012). *Methylobacterium*-induced endophyte community changes correspond with protection of plants against pathogen attack. *PloS one* 7: 1-8.

Arduin M.; Kraus, J. E. (2001) Anatomia de galhas de ambrosia em folhas de *Baccharis concinna* e *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). Revista brasileira. Botânica 24: 63-72.

Arduin M., Fernandes G. W., Kraus J. E. (2005) Morphogenesis of galls induced by *Baccharopelma dracunculifoliae* (Hemiptera: Psyllidae) on *Baccharis dracunculifolia* (Asteracea) leaves. Brazilian Journal of Biology 65: 559-571.

Arechavaleta M., Bacon C.W., Hoveland C.S., Radclife D.E. (1989). Effects of tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. Agronomy Journal 81:83-90.

Arunkumar P., Thanalakshmi M., Kumar P., Premkumar K. (2013) *Micrococcus luteus* mediated dual mode synthesis of gold nanoparticles: Involvement of extracellular α -amylase and cell wall teichuronic acid. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 103: 517-522.

Aslam Z., Im W.T., Ten L.N., Lee S.T. (2005) *Phenylobacterium koreense* sp.nov., isolated from South Korea. Internacional Journal of Systematic Evolucionary Microbioly 55:2001-5.

Azevedo, JL, Maccheroni Jr. W, Pereira JO, Araújo WL (2000) Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants." Electronic Journal of Biotechnology 3: 15-16.

Baldani, J. I. Baldani V.L.D. Seldin L., Döbereiner J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology 36: 86-93.

Baldrian P., Kolařík M., Štursová M., Kopecký J., Valášková V., Větrovský T., Žifčáková L., Šnajdr J., Řídl J., Vlček C., Voříšková J. (2012). Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. The ISME Journal 6:248–258.

Ball OJP, Miles CO, Prestidge RA (1997b) Ergopeptide alkaloids and *Neotyphodium lolli*-mediated resistance in perennial ryegrass against adult *Heteronychnus arator* (Coleoptera: Scarabaeidae). Journal of Economic Entomology 90:1382-1391.

Barker, G.M. and Addison, P.J. (1996). Influence of clavicipitaceous endophyte infection in ryegrass on development of the parasitoid *Microctonus hyperodae* loan (Hymenoptera: Braconidae) in *Listronotus bonariensis* (Kuschel) (Coleoptera: Curculionidae). Biological Control 281-287.

Barns S.M., Cain E.C., Sommerville L., Kuske C.R. (2007) Acidobacteria Phylum Sequences in Uranium-Contaminated Subsurface Sediments Greatly Expand the Known Diversity within the Phylum. Applied and Environmental Microbiology 73: 3113–3116.

Barrett C.F., Parker M.A. (2006) Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. Nodule Bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1198-1206.

Barroso G. M. (1976) *Compositae*-subtribo *Baccharidinae* - Hoffmann: estudo das espécies ocorrentes no Brasil. *Rodriguesia* 40: 3-273.

Bastián F., Cohen A., Piccoli P., Luna V., Bottini R., Baraldi R., Bottini R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant growth regulation* 24: 7-11.

Bastos E.M.A.F., Santana R.A., Calça-Costa A.F.G., Thiago P.S. (2011) Interaction between *Apis mellifera* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC, that favours green propolis production in Minas Gerais. *Brazilian Journal of Biology* 71:727-734.

Belimov A.A., Hontzas N., Safronova V.I., Demchinskaya S.V., Piluzza G., Bullitta S., Glick B.R. (2005) Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 241-250.

Bergogne-Bérézin E., Towner K.J. (1996). *Clinical Microbiology Reviews*, 9: 148–165.

Bhandare R., Calabro M., Coschigano P.W. (2006) Site-directed mutagenesis of the *Thauera aromatica* strain T1 *tutE* *tutFDGH* gene cluster. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346: 992-998.

Bierzuchudek P. e Eckhart V. (1987) Spatial segregation of the sexes of dioecious plants. *The American Naturalist* 132:34-43.

Bowers L., Weaver R.H., Grula E.A., Edwards F. (1954) Isolation and Identification as *Caulobacter Vibrioides* Henrici and Johnson with Emended Description. *Journal of Bacteriology* 68: 194-200.

Breen, J.P. (1992). Temperature and seasonal effects on expression of *Acremonium* endophyte-enhanced resistance to *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology* 21: 68-74.

Breen, J.P. (1993). Enhanced resistance to fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in *Acremonium* endophyteinfected turfgrasses. *Journal of Economic Entomology* 86: 621-629.

Breugelmans P., Leroy B., Bers K., Dejonghe W., Wattiez R., De Mot R., Springael D. (2010) Proteomic study of linuron and 3,4 - dichloroaniline degradation by *Variovorax* sp. WDL1: evidence for the involvement of an aniline dioxygenase-related

Burcelin R, Serino M, Chabo C, Blasco-Baque V, Amar J. (2011). Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective." *Acta diabetologica* 48: 257-273.

Burckhardt D. (1987) Jumping plant lice (Homoptera: Psylloidea) of the temperate neotropical region. Part 1: Psyllidae (subfamilies Aphalarinae, Rhinocolinae and Aphalaroidinae). *Zoological Journal of Linnaean Society* 89:299-392.

Butin, H. (1992). Effect of endophytic fungi from oak (*Quercus rubor*, L.) on mortality of leaf inhabiting gall insects. *European Journal of Forest Pathology* 22: 237-246.

Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Huntley J., Fierer N., Owens S.M., Betley J., Fraser L., Bauer M., Gormley N., Gilbert J.A., Smith G., Knight R. (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 6:1621-1624.

Carvalho M. F., De Marco P., Duque A., Pacheco C.C., Janssen D.B., Castro A.P.M.L. (2008) *Labrys portucalensis* sp. nov., a fluorobenzene-degrading bacterium isolated from an industrially contaminated sediment in northern Portugal. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58: 692-698.

Cavalheiro J.M.B.T, de Almeida M.C.M.D., Grandfils C.M.M.R., da Fonseca M.M.R. (2009) Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry* 44: 509-515.

Chang R., Piló-Veloso D., Morais S.A.L., Nascimento E.A. (2008) Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: 549-556.

Chen H, Qin S, Li J, Zhang Y, Xu L, Jiang C, Kim C, Li W. (2009) *Pseudonocardiaendophytica* sp. nov., isolated from the pharmaceutical plant *Lobelia clavata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 559–563.

Chou Y.J., Elliott G.N., James E.K., Lin K.Y., Chou J.H., Sheu S.Y., Sheu D.S., Sprent J.I., Chen W.M. (2007) *Labris neptuniae* sp. nov. isolated from roots nodules of the aquatic legume *Neptunia oleracea*. *Internacional Journal of Systematic Evolucionary Microbioly* 57: 577-581.

Christensen, M. J., Latch G.C.M. Tapper B.A. (1991) Variation within isolates of *Acremonium* endophytes from perennial rye-grasses. *Mycological Research* 95: 918-923.

Chun J., Jae-Hak L., Yoonyoung J., Myungjin K., Seil K., Byung K. K., Young-Woon L. (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2259–2261.

- Coêlho M. M., Ferreira-Nozawa M. S., Nozawa S. R., Santos A. L. W.** (2011) Isolation of endophytic bacteria from arboreal species of the Amazon and identification by sequencing of the 16S rRNA encoding gene. *Genetics and Molecular Biology* 34: 676-680.
- Compant, S. Reiter B., Sessitsch A., Nowak J., Clément C., Barka E.A.** (2005) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1685-1693.
- Daskin J.H. and Ross A.A.** (2012) Context-dependent symbioses and their potential roles in wildlife diseases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, 1457–1465.
- Dastager S.G., Deepa C.K., Pandey A.** (2013). Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp NII-0909 and its interaction with cowpea. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 987-992.
- Doty S.L., Oakley B., Xin G., Kang J.W., Singleton G., Khan Z., Vajzovic A., Staley J.T.** (2009) Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow. *SYMBIOSIS* 47: 23–33.
- Drancourt M., Bollet C., Carlioz A., Martelin R., Gayral J.-P. & Raoult D.** (2000) 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. ***Journal of Clinical Microbiology* 38: 3623 – 3630.**
- Drummond M.H., Gordon M.P., Nester E.W., Chilton M.** (1977). Foreign DNA of bacterial plasmid origin is transcribed in crown gall tumours. *Nature* 269:535 – 536.
- Du L., Zhao M., Li G., Xu F., Chen W., Zhao Y.** (2013) Biodegradation of malachite green by *Micrococcus* sp. strain BD15: Biodegradation pathway and enzyme analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation* 78: 108-116.
- Duangpaeng, A., Phetcharat P., Chanthapho S., Boonkantong, Okuda N** (2012) The Study and Development of Endophytic Bacteria for Enhancing Organic Rice Growth. *Procedia Engineering* 32: 172-176.
- Eastwell KC, Sholberg PL, Sayler RJ** (2006) Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of crown gall disease in grapevines. *Crop Protection* 25:1191–1200.
- Eppley S. M.** (2001) Gender-specific selection during early life history stages in the dioecious grass *Distichlis Spicata*. *Ecology* 82: 2022-2031.
- Espírito-Santo M.M., Fernandes G.W.** (1998) Abundance of *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae) Galls on the Dioecious Shrub *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Population Ecology* 27: 871-876.

Espírito-Santo M. M. e Fernandes G. W. (2002) Host plant effects on the development and survivorship of the galling insect *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae). *Austral Ecology* 27: 249-257.

Fagundes M., F. S. e Fernandes, G. W. (2005) Direct and indirect interactions involving ants, insect herbivores, parasitoids and the host plant *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) *Ecological Entomology* 30: 28-35.

Fahey J.W. (1988) Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. *In* Biologically active natural products (Chapter 9). American Chemical Society, pp. 120-128.

Fahey J.W., Dimock M.B., Tomasino S.F., Taylor J.M., Carlson P.S. (1991) Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: a case study from industry. *In*: Microbial ecology of leaves. Springer New York. 401-411.

Fernandes G. W, Carneiro, M. A. A., Lara A. C. F., Allain L. R., Andrade G. I., Julião G. R., Reis, T. C., Silva I. M. (1996) Gallling insects on neotropical species of *Baccharis* (Asteraceae). *Tropical Zoology (Testo stampato)* 9: 315-332.

Fishal E., Meon S., Yun W. (2010) Induction of Tolerance to *Fusarium* Wilt and Defense-Related Mechanisms in the Plantlets of Susceptible Berangan Banana Pre-Inoculated with *Pseudomonas* sp. (UPMP3) and *Burholderia* sp. (UPMB3) *Agricultural Sciences in China* 9:1140-1149.

Fokina V.V., Donova M.V. (2003) 21-Acetoxy-pregna-4(5),9(11),16(17)-triene-21-ol-3,20-dione conversion by *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 87: 319-325.

Foss S., Harder J. (1998) *Thauera linaloolentis* sp. nov. and *Thauera terpenica* sp. nov., Isolated on Oxygen-containing Monoterpenes (Linalool, Menthol, and Eucalyptol and Nitrate. *Systematic and Applied Microbiology* 21: 365-373.

Franco C., Smith S. (2013) Endophytic Bacterial Populations of Potato Plants. *In*: Schneider C, Leifert C, Feldmann F (Eds), Endophytes for plant protection: the state of the art, pp. 19-26.

Gallus C., Gorny N., Ludwig W., Schink B. (1997). Anaerobic Degradation of α -resorcylyate by a Nitrate-reducing Bacterium, *Thauera aromatica* Strain AR-1. *Systematic and Applied Microbiology* 20: 540-544.

Ghosh, A., Saha P. (2013) Optimization of copper bioremediation by *Stenotrophomonas maltophilia* PD2. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 1:159-163.

González A.J., Gallego A., Gemini V.L., Papalia M., Radice M., Gutkind G., Planes E., Korol S.E. (2012) Degradation and detoxification of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by an indigenous *Delftia* sp. strain in batch and continuous systems. *International Biodeterioration & Biodegradation* 66: 8-13.

Grimes, D.J., Woese C.R., MacDonell M.T., Collwell R.R. (1997) Systematic Study of the Genus *Vogesella* gen. nov. and Its Type Species, *Vogesella indigofera* comb. nov. *International journal of systematic bacteriology* 47: 19-27.

Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F., Kloepper J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914.

Hamamura N., Arp D.J. (2000) Isolation and characterization of alkane-utilizing *Nocardioides* sp. strain CF8 FEMS *Microbiology Letters* 186:21-26.

Harish S., Kavino M., Kumar N., Saravanakumar D., Soorianathasundaram K., Samiyappan R. (2008) Biohardening with Plant Growth Promoting Rhizosphere and Endophytic bacteria induces systemic resistance against *Banana Bunch Top Virus*. *Applied Soil Ecology* 39:187-200.

Harris R.N., Brucker R.M., Walke J.B. et al. (2009) Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *The ISME Journal* 3: 818–824.

Hata T., Tazawa S., Ohta S., Rhyu M.R., Misaka T., et al. (2012) Artepillin C, a Major Ingredient of Brazilian Propolis, Induces a Pungent Taste by Activating TRPA1 Channels. *PLoS ONE* 7: 1-9.

Hayashi N.B., Ishida T., Yokota A., Kodama T., Igarashi Y. (1999) *Hydrogenophilus thermoluteolus* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, facultatively chemolithoautotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:783-786.

He H., Ye Z., Yan J., Xiao L., Zhong T., Yuan M., Cai X., Fang Z., Jing Y. (2013) Characterization of endophytic *Rahnella* sp. JN6 from *Polygonum pubescens* and its potential in promoting growth and Cd, Pb, Zn uptake by *Brassica napus*. *Chemosphere* 90: 1960-1965.

Heyndrickx M., Vauterin L., Vandamme P., Kersters K., De Vos P. (1996) Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods* 26:247–259.

Holmström C., Egan S., Franks A., McCloy, S., Kjelleberg S. (2008) Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS microbiology ecology* 41: 47-58.

- Homklin, S., Ong S.K., Limpiyakorn T.** (2012) Degradation of 17 α -methyltestosterone by *Rhodococcus* sp. And *Nocardioides* sp. isolated from a masculinizing pond of Nile tilapia fry. *Journal of hazardous materials* 221: 35-44.
- Hori K.** (1992) Insect secretion and their effect on plant growth, with special reference to hemipterans. In: Shorthouse JD, Rohfritsch O (ed) *Biology of insect-induced galls* 157-170.
- İnceoğlu, O., Sablayrolles C., van Elsas J.D., Salles J.F.** (2013) Shifts in soil bacterial communities associated with the potato rhizosphere in response to aromatic sulfonate amendments. *Applied Soil Ecology* 63: 78-87.
- Islam A.S. M., Math R. K., Kim J. M., Yun M. G., Cho J. J., Kim E.J., Lee Y. H., Yun H. D.** (2010) Effect of plant age on endophytic bacterial diversity of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) root and their antimicrobial activities. *Current Microbiology* 61: 346-56.
- Islam M.S., Kawasaki H., Nakagawa Y., Hattori T., Seki T.** (2007) *Labrys okinawensis* sp. nov. and *Labrys miyagiensis* sp. nov., budding bacteria isolated from rhizosphere habitats in Japan, and emended descriptions of the genus *Labrys* and *Labrys monachus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 552–557.
- Ivanova E.G., Doronina N.V., Trotsenko Y.A.** (2001). Aerobic Methylobacteria Are Capable of Synthesizing Auxins. *Microbiology* 70: 392-397
- Jacobs M. J., Bugbee W. M., Gabrielson D. A.** (1985) Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar-beet roots. *Canadian Journal of Botany* 63:1262–1265.
- Je basingh S.E.J., Lakshmikandan M., Rajesh R.P., Raja P.** (2013) Biodegradation of acrylamide and purification of acrylamidase from newly isolated bacterium *Moraxella osiloensis* MSU11. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85: 120-125.
- Jiang, H., Peng S., Zhang S., Li X., Korpelainen H., Li C.** (2012) Transcriptional profiling analysis in *Populus yunnanensis* provides insights into molecular mechanisms of sexual differences in salinity tolerance. *Journal of experimental botany* 63: 3709-3726.
- Jimenez B.J., Rivas P.R., Lopez J.G., Pesciaroli C., Barghini P.** (2012). Immobilization of *Delftia tsuruhatensis* in macro-porous cellulose and biodegradation of phenolic compounds in repeated batch process *Journal of Biotechnology* 157: 148-153.
- Jørgensen N.O.G., Brandt K.K., Nybroe O., Hansen M.** (2010) *Vogesella mureinivorans* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from lake water." *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60: 2467-2472.

- Jurado V., Miller A.Z., Alias-Villegasa C., Laiza L., Saiz-Jimenez C.** (2012) *Rubrobacter bracarensis* sp. nov., a novel member of the genus *Rubrobacter* isolated from a biodeteriorated monument. *Systematic and Applied Microbiology* 35: 306–309.
- Kaewkla O., Franco C.M.M.** (2010). *Pseudonocardia adelaidensis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilized stem of a grey box tree (*Eucalyptus microcarpa*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:2818-2822.
- Kaewkla O., Franco C.M.M.** (2011) *Pseudonocardia eucalypti* sp. nov., an endophytic actinobacterium with a unique knobby spore surface, isolated from roots of a native Australian eucalyptus tree. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61:742-746.
- Kang B.R., Lee J.H., Ko S.J., Lee Y.H., Cha J.S., Ho Cho B., Kim Y.C.** (2004) Degradation of acyl-homoserine lactone molecules by *Acinetobacter* sp. strain C1010. *Canadian Journal of Microbiology* 50: 935-941.
- Kanso S., Patel B.K.** (2004) *Phenylobacterium lituiforme* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium from a subsurface aquifer, and emended description of the genus *Phenylobacterium*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 54: 2141-2146.
- Kay E., Bertolla F., Vogel T.M., Simonet P.** (2002). Opportunistic Colonization *Ralstonia solanacearum*-Infected Plants by *Acinetobacter* sp. and Its Natural Competence Development. *Microbial Ecology* 43: 291-297.
- Kim M.K., Na J., Lee T., Im W., Soung N., Yang D.** (2007) *Solirubrobacter soli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field *International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology* 57: 1453-1455.
- Kubota M., Kawahara K., Sekiya K., Uchida T., Hattori Y., Futamata H., Hiraishi A.** (2005) *Nocardioides aromaticivorans* sp. nov., a dibenzofuran-degrading bacterium isolated from dioxin-polluted environments *Systematic and Applied Microbiology* 28: 165-174.
- Kuklinsky-Sobral J., Araújo W. L., Mendes R., Pizzirani-Kleine A. A., Ryan R. P., Germaine K., Franks A., Ryan D. J., Dowling D. N.** (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* 278: 1–9.
- Kuklinsky-Sobral J., Araújo W.L., Mendes R., Geraldi I.O., Pizzirani-Kleiner I.A., Azevedo J.L.** (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology* 6: 1244–1251.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araujo W.L., Mendes R., Pizzirani-Kleiner, Azevedo J.L.** (2005) Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide." *Plant and soil* 273: 91-99.

- Lane D.J.** (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-147. John Wiley & Sons, Chichester.
- Lara A. C. F., Fernandes G. W.** (1994) Distribuição de galhas de *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae) em *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Revista Brasileira de Biologia* 54: 661-668.
- Larsen N., Vogensen F.K., van den Berg F.W., Nielsen D.S., Andreasen A.S., Pedersen B.K. et al** (2010) Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 5: 1-10.
- Lavire C., Normand P., Alekhina I., Bulat S., Prieur D., Birrien J., Fournier P., Hänni C., Petit J.** (2006) Presence of *Hydrogenophilus thermoluteolus* DNA in accretion ice in the subglacial Lake Vostok, Antarctica, assessed using rrs, cbb and hox. *Environmental Microbiology* 12: 2106–2114.
- Lebuhn M., Thierry H.T., Hartmann A.** (1997) Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology* 22: 325-334.
- Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis R.E., Bartozsyk, I.M.** (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1153-1169.
- Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I.** (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022-1023.
- Leys N.M.E.J., Ryngaert A., Bastiaens L., Verstraete W., Top E.M., Springael D.** (2004). Occurrence and Phylogenetic Diversity of *Sphingomonas* Strains in Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1944-1955.
- Li J., Zhao G., Varma A., Qin S., Xiong Z., Huang H., Zhu W., Zhao L., Xu L., Zhang S., Li W.** (2012) An Endophytic *Pseudonocardia* Species Induces the Production of Artemisinin in *Artemisia annua*. *Plos One* 7: 1-9.
- Li J.H., Wang E.T., Chen W.F.** (2008) Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 238-246.
- Li Y.H., Liu Q.F., Liu Y., Nan Zhu J., Zhang Q.** (2010) Endophytic bacterial diversity in roots of *Typha angustifolia* L. in the constructed Beijing Cuihu Wetland (China). *Research in Microbiology* 162:124-131.

- Liam J., Wang Z., Zhou S.** (2008) Response of endophytic bacterial communities in banana tissue culture plantlets to *Fusarium* wilt pathogen infection. *The Journal of General and Applied Microbiology* 54: 83-92.
- Liu Y., Jin J., Liu Y., Zhou Y., Liu Z.** (2010) *Dongia mobilis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Rhodospirillaceae* isolated from a sequencing batch reactor for treatment of malachite green effluent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 2780-2785.
- Liu Y., Zuo S., Xu L., Zou Y., Song W.** (2012). Study on diversity of endophytic bacterial communities in seeds of hybrid maize and their parental lines. *Archives of Microbiology* 194 (12):1001-12.
- Liu Y., Zuo S., Zou Y., Wang J., Song W.** (2013) Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L., Nongda108) at different growth stages. *Annals of Microbiology* 63:71–79.
- Liu Z., Lozupone C., Hamady M., Bushman F.D., Knight R.** (2007) Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research* 35: 1 - 10.
- Liu, Y. Song X., Jiang J., Liu Y., Xu C., Li H., Liu Z.** (2011) *Hydrocarboniphaga daqingensis* sp. nov., isolated from a freshwater lake. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 61: 408-411.
- Llop P., Murillo J., Lastra B., López M.M.** (2009) Recovery of nonpathogenic mutant bacteria from tumors caused by several *Agrobacterium tumefaciens* strains: a frequent event?. *Applied and environmental microbiology* 75: 6504-6514.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld J., Porteus F., Moore E.R.B., Taghavi S., Mezgeay M., van der Lelie D.** (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21: 583-606.
- Lu H., Fujimura R., Sato Y., Nanba K., Kamijo T., Ota H.** (2008) Characterization of *Herbaspirillum* -and *Limnobacter* - Related Strains Isolated from Young Volcanic Deposits in Miyake-Jima Island, Japan. *Microbes Environment* 23: 66-72.
- Lu H., Sato Y., Fujimura R., Nishizawa T., Kamijo T., Ota H.** (2011). *Limnobacter litoralis* sp. nov., a thiosulfate-oxidizing, heterotrophic bacterium isolated from a volcanic deposit, and emended description of the genus *Limnobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 404-407.
- Ludueña L.M., Taurian T., Tonelli M.L., Angelini J.G., Anzuay M.S., Valetti L., Muñoz V., Fabra A.I.** (2012) Biocontrol bacterial communities associated with diseased peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants. *European Journal of Soil Biology* 53:48-55.

Makkar N.S., Casida L.E. (1987) *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *International journal of systematic bacteriology* 37: 323–326.

Makkar N.S., Casida L.E. (1987) *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov., a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. *International journal of systematic bacteriology* 37: 323–326.

Malhotra A., Dolma K., Kaur N., Rathore Y.S., Mayilraj A.S., Choudhury A.R. (2013) Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using a novel marine strain of *Stenotrophomonas*. *Bioresource Technology* 142: 727–731.

Mano H., Morisaki H. (2008) Endophytic bacteria in the rice plant. *Microbes Environment*, 23: 109-117.

Mao Y., Xia Y., Zhang T. (2013) Characterization of *Thauera*-dominated hydrogen-oxidizing autotrophic denitrifying microbial communities by using high-throughput sequencing. *Bioresource Technology* 128: 703-710.

Marco S., Rulloa R., Albino A., Masullo M., De Vendittis E., Amato M. (2013). The thioredoxin system in the dental caries pathogen *Streptococcus mutans* and the food-industry bacterium *Streptococcus thermophiles*. *Biochimie* 95: 2145-2156.

Mardis E.R. (2008) Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Genomic and Human Genetics*. 9:387- 402.

Massignani J.J., Lemos M., Maistro E.L., Schaphauser H.P., Jorge R.F., Sousa J.P., Bastos J.K., de Andrade S.F. (2010) Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. *Phytotherapy Research* 23: 1355-60.

McNear Jr., D. H. (2013) The Rhizosphere - Roots, Soil and Everything In Between. *Nature Education Knowledge* 4: 1.

Médigue C., Krin E., Pascal G. et al. (2005) Coping with cold: the genome of the versatile marine Antarctica bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Genome Research* 15: 1325-1335.

Mendes, R., Pizzirani-Kleiner A.A., Araujo W.L., Raaijmakers J.M. (2007) Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied and environmental microbiology* 73: 7259-7267.

Miché L., Balandreau J. (2001) Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. *Applied and environmental microbiology* 67: 3046-3052.

- Miyake D., Ichiki S., Tanabe M., Oda T., Kuroda H., Nishihara H., Sambongi Y.** (2007). Thiosulfate oxidation by a moderately thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenophilus thermoluteolus*. Archives of Microbiology. 188:199-204.
- Molina L.G., Fonseca G.C., Margis R.** (2012) Metatranscriptomic analysis of small RNAs present in soybean deep sequencing libraries. Genetics and Molecular Biology 35 : 292-303.
- Monciardini P. Cavaletti L., Schumann P., Rohde M., Donadio S.** (2003) *Conexibacter woesei* gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class Actinobacteria. International journal of systematic and evolutionary microbiology 53: 569-576.
- Montanez M., Blancob A.R., Barlocco C., Beracochea M., Sicardi M.** (2012) Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays L.*) and their inoculation effects *in vitro*. Applied Soil Ecology 58:21–28.
- Moore, F.P., Barac T., Borremans B., Oeyen L., Vangronsveld J., van der Lelie D., Campbell C.D., Moore E.R.B.** (2006) Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. Systematic and applied microbiology 29: 539-556.
- Moreira I.S., Carvalho M.F. Amorim C.L., Janssen D.B., Castro P.M.L.** (2012a) Degradation of difluorobenzenes by the wild strain *Labrys portucalensis*. Biodegradation 23: 653-662.
- Mulla S.I., Talwar M.P.Z., Bagewadi Z.K., Hoskeri R.S., Ninnekar H.Z.** (2013) Enhanced degradation of 2-nitrotoluene by immobilized cells of *Micrococcus* sp. strain SMN-1. Chemosphere 90: 1920-1924.
- Mumper C.K., Ostermeyer A., Sempriani L., Radniecki T.S.** (2013) Influence of ammonia on silver nanoparticle dissolution and toxicity to *Nitrosomonas europaea*. Chemosphere 93: 2493-2498.
- Nascimento A.M.A** (2011) Use of the rRNA operon and genomic repetitive sequences for the identification of bacteria. In: Bruijn J., Willey J. Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches 800p.
- Navarro-Noya Y.E., Jan-Roblero, J., González-Chávez M., Hernández-Gama R. Hernández-Rodríguez C.** (2010). Bacterial communities associated with the rhizosphere of pioneer plants (*Bahia xyloperda* and *Viguiera linearis*) growing on heavy metals-contaminated soils Antonie van Leeuwenhoek 97: 335-349.
- Naveed M., Mitter B., Reichenauer T.M., Wieczorek K., Sessitsch A.** (2014) Increased drought stress resilience of maize through endophytic colonization by

Burkholderia phytofirmans PsJN and *Enterobacter* sp. FD17. Environmental and Experimental Botany 97: 30-39.

Nejad, P., Johnson P.A. (2000) Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. Biological Control 18: 208-215.

Nielsen P., Sorensen J. (1997) Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology 22: 183-192.

Oh Y., Roh D. (2012) *Phenylobacterium muchangponenses* sp. nov., isolated from beach soil, and emended description of the genus *Phenylobacterium*. International Journal of Medical Microbiology 62: 977-983.

Oh Y.M., Kim M., Lee-Cruz L., Lai-Hoe A., Go R., Ainuddin N., Rahim R.A., Shukor N., Adams J.M. (2012) Distinctive Bacterial Communities in the Rhizoplane of Four Tropical Tree Species. Microbial Ecology 64:1018-1027.

Oki Y., Soares N., Belmiro M.S. Júnior A.C. Fernandes G.W. (2009) The influence of the endophytic fungi on the herbivores from *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). Neotropical Biology and Conservation 4: 83-88.

Olivares F.L., Baldani V.L.D., Reis V.M., Baldani J.I., Döbereiner J. (1996). Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. Biology and Fertility of Soils 21: 197-200.

Oliveira M.F., da Silva M.G., Sueli T., Van Der Sand (2010) Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18(6), a potential biocontrol agent. Research in Microbiology 161: 565-572.

Palleroni, N.J. Port A. M., Chang H., Zylstra G.J. (2004) Hydrocarboniphaga effusa gen. nov., sp. nov., a novel member of the γ -Proteobacteria active in alkane and aromatic hydrocarbon degradation. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 1203-1207.

Patel J., Zhang Q., McKay R.M.L., Vincent R., Xu Z. (2010) Genetic engineering of *Caulobacter crescentus* for removal of cadmium from water." Applied biochemistry and biotechnology 160: 232-243.

Patt T. E., Cole G. C., Hanson R. S. (1976). *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 26: 226-229.

Peleg A.Y., Seifert H., Paterson D.L. (2008) *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. Clinical Microbiology Reviews 21: 538-582.

Philipp B., Kemmler D., Hellstern J., Gorny N., Caballero A., Schink B. (2002) Anaerobic degradation of protocatechuate (3,4-dihydroxybenzoate) by *Thauera aromatica* strain AR-1. FEMS Microbiology Letters 212: 139-143.

Phillips, L.A., Germida J.J., Farrell R.E., Greer C.W. et al. (2008) Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. Soil Biology and Biochemistry 40: 3054-3064.

Piutti S., Semon E., Landry D., Hartmann A., Dousset S., Lichtfouse E., Topp E., Soulas G., Laurent F.M. (2003) Isolation and characterisation of *Nocardioides* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk and maize rhizosphere soil. FEMS Microbiology Letters 221: 111-117.

Prasad B., Suresh S. (2012). Biodegradation of Phthalate Esters by *Variovorax* sp APCBEE Procedia 1: 16-21.

Puente M., Ching E., Li E., Bashan Y. (2009) Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. Environmental and experimental botany 66: 402-408.

Puyen, Z. M., Vilagrasa E., Maldonado J., Esteve I., Solé A. (2012) Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant *Micrococcus luteus* DE2008. Bioresource technology 126: 233-237.

Qin S., Zhu W., Jiang J., Klenk H., Li J., Zhao G., Xu L., Li W. (2010) *Pseudonocardia tropica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the stem of *Maytenus austroyunnanensis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60: 2524-2528.

Qin S., Yuan B., Zhang Y., Bian J., Tamura G.K., Sun T.B., Li W., Jiang J. (2012) *Nocardioides panzhihuaensis* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from medicinal plant *Jatropha curcas*. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology 102: 353-360.

Quan Z.X., Im W.T., Lee S.T. (2006) *Azonexus caeni* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from sludge of a wastewater treatment plant. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 1043-1046.

Quirino B.F., Pappasa G.J., Tagliaferroa A.C., Collevattia R.G., Netoa E.L., Silva M.R., Bustamante M.M.C., Krügera R.H. (2009) Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. Microbiological Research 164: 59-70.

Rachid C.T.C.C., Santos A.L., Piccolo M.C., Balieiro F.C., Coutinho H.L.C, Peixoto R.S., Tiedje J.M., Rosado A.S. (2013) Effect of Sugarcane Burning or Green Harvest Methods on the Brazilian Cerrado Soil Bacterial Community Structure. Plos One 8:1 - 8.

- Ramalho V. F. e Silva A. G.** (2010) Modificações bioquímicas e estruturais induzidas nos tecidos vegetais por insetos galhadores. *Natureza on line*. 8: 117-122.
- Raman A., Wheatley W., Popay A.** (2012) Endophytic fungus-vascular plant-insect interactions. *Environmental Entomology* 41: 433-47.
- Sanz J. L., Köchling T.** (2007) Molecular biology techniques used in wastewater treatment: an overview. *Process Biochemistry*. 42: 119–133.
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T. et al.** (2009). Introducing Mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7537-7541.
- Seghers D., Wittebolle L., Top E.M., Verstraete W., Siciliano S.D.** (2004) Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Applied and Environmental Microbiology* 70:1475-1482.
- Seki T., Matsumoto A., Shimada R., Inahashi Y., Omura S. Takahashi Y.** (2012) *Conexibacter arvalis* sp. nov., isolated from a cultivated field soil sample. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 62: 2400-2404.
- Sharp R.G., Chen L., Davies W.J.** (2011) Inoculation of growing media with the rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2 reduces unwanted stress responses in hardy ornamental species. *Scientia Horticulturae* 129: 804-811.
- İnceoğlu O., Sablayrolles C., van Elsas J.D., Salles J.F.** (2013) Shifts in soil bacterial communities associated with the potato rhizosphere in response to aromatic sulfonate amendments. *Applied Soil Ecology* 63: 78-87.
- Sheng X., Xia J., Jiang C., He L., Qian M.** (2008) Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution* 156:1164–1170.
- Shnit-Orland M., Kushmaro A.** (2009) Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defense. *FEMS microbiology ecology* 67: 371-380.
- Silva H.S.A., Tozzi J. P.L., Terrasan C. R.F., Bettiol W.** (2012) Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. *Biological Control* 63: 62–67.
- Singleton D.R., Furlong M., Peacock A.D., White D.C., Coleman D.C. Whitman W.** (2003) *Solirubrobacter pauli* gen. nov., sp. nov., a mesophilic bacterium within the *Rubrobacteridae* related to common soil clones. *International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology* 53: 485-490.
- Soares G.L.G., Isaias R.M.S., Gonçalves S.J.M.R., Christiano J.C.S.** (2000) Alterações químicas induzidas por coccídeos galhadores (Coccoidea: *Brachyscelidae*) em

folhas de *Rollinia laurifolia* Schdtl. (Annonaceae). *Revista Brasileira de Zoociências* 2: 103-116

Souza H.A.V., Muller L.A.C., Brandão R.L., Lovato M.B. (2012). Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis*. *Genetics and Molecular Research* 11: 756-764

Spain, J.C. Gibson D.T. (1991) Pathway for biodegradation of p-nitrophenol in a *Moraxella* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 812-819.

Spring S., Kämpfer P., Schleifer K.H. (2001) *Limnobacter tioxidans* gen. nov., sp. nov., a novel thiosulfate-oxidizing bacterium isolated from freshwater lake sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1463–1470.

Stolz A., Schmidt-Maag C., Denner E.B., Busse H.J., Egli T., Kämpfer P. (2000) Description of *Sphingomonas Xenophaga* sp. nov. for strains BN6T and N, N which degrade xenobiotic aromatic compounds. *Internacional Journal of Systematic Evolucionary Microbiology* 50: 35-41.

Stone G.N., Schönrogge K. (2003) The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 512-522.

Sun L., Qiu F., Zhang X., Dai X., Dong X., Song W. (2008) Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. *Microbial Ecology* 55:415–424.

Sun L., Zhang Y., He L., Chen Z., Wang Q., Qian M., Sheng X. (2010) Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. *Bioresource Technology* 101:501–509.

Sun W., Liu W., Cui L., Zhang M., Wang B. (2013) Characterization and identification of a chlorine-resistant bacterium, *Sphingomonas* TS001, from a model drinking water distribution system. *Science of the Total Environment*, 458:169-175.

Tehrani A, Nezami B, Gewirtz A, Srinivasan S (2012) Obesity and its associated disease: a role for microbiota? *Neurogastroenterology & Motility* 24: 305-311.

Teixeira E.W., Negri G., Meira R.M.S.A., Message D., Salatino A. (2005) Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. *E CAM* 2: 85–92.

Terato H., Kobayashi M., Yamamoto O., I de H. (1999) DNA strand breaks induced by ionizing radiation on *Rubrobacter radiotolerans*, an extremely radio resistant bacterium. *Microbiological Research* 154: 173-178.

Thomas P., Kumari S., Swarna G.K., Gowda T.K. (2007) Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from in vitro cultures and host-endophyte interaction in vitro and *in vivo*. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 380-90.

Tiago I., Mendes V., Pires C., Morais P.V., Veríssimo A. (2005) *Phenylobacterium falsum* sp. nov., an Alphaproteobacterium isolated from a nonsaline alkaline groundwater, and emended description of the genus *Phenylobacterium*. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 295-302.

Timmusk S., Grantcharova N., Wagner E.G.H. (2005) *Paenibacillus* Invades Plant Roots and Forms Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 71:7292-7300.

Timmusk S., Nicandera B., Granhallb U., Tillberga E. (1999) Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1847-1852.

Timmusk S., Wagner E.G.H. (1999) The Plant-Growth-Promoting *Rhizobacterium polymyxa* Induces Changes in *Arabidopsis thaliana* Gene expression: A Possible Connection between Biotic and Abiotic Stress Responses. *MPMI* 12: 951–959.

Topp E., Mulbry W.M., Zhu H., Nour S.M., Cuppels D. (2000) Characterization of S-Triazine Herbicide Metabolism by a *Nocardioide*s sp. Isolated from Agricultural Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3134-3141.

Trivedi P., Duan Y., Wang N. (2010) Huanglongbing, a Systemic Disease, restructures the Bacterial Community Associated with Citrus Roots. *Applied and environmental microbiology* 76: 3427-3436.

Trivedi P., He Z., Wang N. (2012) Huanglongbing alters the structure and functional diversity of microbial communities associated with citrus rhizosphere. *The ISME Journal* 6: 363:383.

Ulrich K., Ulrich A., Dietrich E. (2008) Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS microbiology ecology* 63: 169-180.

Vedler E., Heinaru E., Jutkina J., Viggor S., Koressaar T., Remm M., Heinaru A. (2013) *Limnobater* spp.as newly detected phenol-degraders among Baltic Sea Surface water bacteria characterized by comparative analysis of catabolic genes. *Systematic and Applied Microbiology* 36: 525-532.

Vega FE, Posada F, Aime MC, Pava-Ripolli M, Infante F (2008) Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* 46: 72-82.

Videira S.S Pereira e Silva M.C. Galisa P.S.,Dias A.C.F., Nissinen R., Divan V.L.B., van Elsas J.D., Baldani J.I., Salles J.F. (2013) Culture-independent molecular approaches reveal a mostly unknown high diversity of active nitrogen-fixing bacteria associated with *Pennisetum purpureum*—a bioenergy crop." *Plant and Soil* 373: 1-18.

- Videira S.S., de Araujo J.L., Rodrigues L. , Baldani V.L., Baldani J.I.** (2009) Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. *FEMS Microbiol Letters* 293: 11-9.
- Viti C., Giovannetti L.** (2005) Characterization of cultivable heterotrophic bacterial communities in Cr-polluted and unpolluted soils using Biolog and ARDRA. *Applied Soil Ecology* 28: 101-112.
- Von Rozycki T., Nies D.H.** (2009) *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek* 96: 115-139.
- Ward N., Challacombe J.F., Janssen P.H. et al.** (2009). Three Genomes from the Phylum *Acidobacteriaprovide* Insight into the Lifestyles of These Microorganisms in Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2046-2056.
- Whiteley A.S., Jenkins S., Waite I., Kresoje N., Payne H., Mullan B., Allcock R., O'Donnell A.** (2012) Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. *Journal of Microbiological Methods* 91: 80–88.
- Wilson D.** (1995) Fungal endophytes wich invade insect galls: inset pathogens, benign saprophytes, or fungal inquilines? *Oecologia* 255-260.
- Wittich R. M., Wilkes H., Sinnwell V., Francke W., Fortnagel P.** (1992) Metabolism of dibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Applied and Environmental Microbiol* 58: 1005.
- Woese C. R.** (1987) Bacterial Evolution. *Microbiol Reviews* 51: 221-271.
- Xiong, Z. , Zhang J., Zhang D., Zhou Z., Liu M., Zhu W., Zhao L., Li W.** (2013) *Rothia endophytica* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from *Dysophylla stellata* (Lour.) Benth. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 63:1964 – 3969.
- Yang Z., Ni Y., Lu Z., Liao X., Zheng Y., Sun Z.** (2011). Industrial production of S-2, 2-dimethylcyclopropanecarboxamide with a novel recombinant R-amidase from *Delftia tsuruhatensis* Process Biochemistry 46: 182-187.
- Yim M., Yau Y.C.W., Matlow A., So J., Zou J., Flemming C.A., Schraft H., Leung K** (2013). A novel selective growth medium-PCR assay to isolate and detect *Sphingomonas* in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* 82:19-27.
- Yoon J., Kang S., Lee S., Lee J., Park S.** (2011) *Ohtaekwangia koreensis* gen. nov., sp. nov. and *Ohtaekwangia kribbensis* sp. nov., isolated from marine sand, deep-branching members of the phylum *Bacteroidetes*. *Internacional Journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology* 61: 1066-1072.

Zhang X., Shi Y., Wang X., Zhang W., Lou K. (2011) Isolation, identification and insecticidal activity of endophyte from *Achnatherum inebrians*. *Acta microbiologica Sinica* 50: 530-536.

Zhang L., He D., Chen J., Liu Y. (2010) Biodegradation of 2-chloroaniline, 3-chloroaniline, and 4-chloroaniline by a novel strain *Delftia tsuruhatensis* H1. *Journal of Hazardous Materials* 179: 875-882.

Zhang Y., Li W., Zhang K., Tian X., Jiang Y., Xu L., Jiang C. Lai R. (2006) *Massilia dura* sp. nov., *Massilia albidiflava* sp. nov., *Massilia plicata* sp. nov. and *Massilia lutea* sp. nov., isolated from soils in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 459–463.

Zhao G., Li J., Zhu W., Li X., Tian S., Zhao L., Xu L., Li W. (2011) *Pseudonocardiabannaensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the surface-sterilized roots of *Artemisia annual*. *Antonie van Leeuwenhoek* 100: 35–42.

Zhu X., Xu Y., Peng B D., Zhang Y., Huang T., Wang J. Zhou M., (2013) Detection and characterization of bismethiazol-resistance of *Xantomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Crop Protection*, 47: 24-29.