

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

THIANNY FERNANDA CARRELO VIANA

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E  
MOLECULAR DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E  
EPIFÍTICAS EM ESPÉCIES DE BROMELIACEAE DE  
BANCADAS LATERÍTIAS, CORUMBÁ, MATO GROSSO  
DO SUL**

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gecele Matos Paggi – UFMS/CPAN

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marivaine da Silva Brasil – UFMS/CPAN

Campo Grande - MS, fevereiro de 2016.

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

THIANNY FERNANDA CARRELO VIANA

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E  
MOLECULAR DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E  
EPIFÍTICAS EM ESPÉCIES DE BROMELIACEAE DE  
BANCADAS LATERÍTIAS, CORUMBÁ, MATO GROSSO  
DO SUL**

Dissertação apresentada como um dos  
requisitos para obtenção do grau de Mestre  
em Biologia Vegetal junto ao Centro de  
Ciências

Biológicas e da Saúde”

Campo Grande - MS, fevereiro de 2016.

*“Dedico este trabalho a minha mãe, Maria  
Fernanda Garcia Carrelo Viana, ao meu pai,  
Ronaldo Pereira Viana, e ao meu namorado,  
Heraldo Alves da Cunha, a vocês todo o meu amor”!*

### **Agradecimentos**

Durante toda a trajetória do mestrado eu tive o prazer de ter ao meu lado pessoas especiais que me ajudaram, me apoiaram, serviram de consolo e que me fizeram feliz e me tornaram uma pessoa melhor. Eu não conseguiria concluir o mestrado sem a ajuda dessas pessoas que, mesmo que eu não tenha contato futuramente, estarão sempre marcadas em minha memória e em meu coração.

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, sem ajuda Dele não teria saúde e nem paciência para lidar com os problemas enfrentados. Em segundo, a minha família Ronaldo Pereira Viana (pai), Maria Fernanda Garcia Carrelo Viana (mãe) e Ronaldo Pereira Viana Júnior (irmão), que me apoiaram psicologicamente e financeiramente nestes dois anos de aprendizado, agradeço vocês imensamente! Ao meu namorado por também me ajudar financeiramente e por sempre me passar tranquilidade, me mostrando que o desespero não leva a lugar nenhum. Mil vezes obrigada! A minha amiga Fátima, pelos almoços oferecidos quando não conseguia ir pra casa, por ter paciência nas etapas que me ausentei e mostrar estar ao meu lado sempre que precisei. Amiga/ irmã, muito obrigada!

Agradeço as minhas queridas orientadoras, Gecele Matos Paggi (orientadora) e Marivaine da Silva Brasil (coorientadora), pela dedicação e ensinamentos passados, pela paciência em corrigir esta dissertação e pelo apoio moral. Obrigada por acreditarem em mim! A FUNDECT por financiar o projeto paralelo a este e a CAPES por fornecer a bolsa de mestrado durante estes dois anos.

A Embrapa Agrobiologia, especialmente a Vera Baldani e Ivo Baldani, por me ajudarem nos experimentos práticos do projeto, por passarem o conhecimento de vocês para mim e pela amizade nos meses que residi em Seropédica (RJ). Sou eternamente grata a vocês!

Agradeço as amizades que adquiri no alojamento da Embrapa Agrobiologia, sem o companheirismo e amizade de vocês, os meses que passei fora de casa seriam desesperadores.

Aos meus colegas de laboratório, em especial a Analice, por ficar comigo altas madrugadas riscando placas, nunca vou me esquecer disso, muito obrigada! A Fernanda por me ajudar nos detalhes do trabalho, a sua delicadeza em arrumar as figuras é invejável.

E por fim, não mais que importante, aos meus colegas da pós-graduação, as disciplinas feitas com vocês foram as melhores, nos uniu e mostrou principalmente a qualidade de cada um, sei que posso contar com vocês sempre que precisar. E quem eu me esqueci de agradecer, saiba que sou eternamente grata!!!

### Resumo

A associação de bactérias com plantas é amplamente estudada em diferentes ambientes, principalmente com plantas cultivadas. Porém, é necessário expandir os estudos para a associação de bactérias com plantas silvestres. Os objetivos do presente trabalho foram isolar, caracterizar e identificar bactérias associadas a bromélias de cangas, e correlacionar a diversidade de bactérias com as diferentes espécies de plantas, com as características do solo e com as diferentes populações amostradas. Foi realizada a coleta de raízes de *Dyckia excelsa*, *Dyckia leptostachya* e *Deuterocohnia meziana* em três locais distintos: Fazenda São João, Parque Municipal de Piraputangas, e Sítio Arqueológico Lajedo, em Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. Para contagem e isolamento das bactérias epifíticas, as raízes foram imersas em tampão PBS e agitadas a 100 rpm. As bactérias endofíticas foram contadas e isoladas após a desinfecção superficial dos tecidos, que foram triturados em tampão PBS e submetidos à agitação de 150 rpm. As amostras foram diluídas em tampão PBS e semeadas em meio TSA 4% e incubadas a 28 °C. A caracterização morfológica baseou-se na forma, borda, brilho, elevação, cor e tamanho, que foram utilizados para análise de agrupamento. A análise de BOX-PCR consistiu na amplificação das regiões boxA. Isolados representativos de cada padrão de banda e os que não tiveram seu DNA amplificado pela técnica de BOX-PCR, tiveram a região 16S rDNA sequenciada. A árvore filogenética foi construída utilizando o programa MEGA6 com o método Neighbor-Joining. Foram feitas análises de correlação para verificar a biodiversidade com as características do solo, com as espécies vegetais e com o tamanho das ilhas de solo. Os resultados das características morfológicas mostraram que existe alta diversidade fenotípica em sistemas radiculares que foi confirmada através da técnica de BOX-PCR, a qual mostrou variabilidade

intra-genérica e intra-específica nas bactérias isoladas das bromélias. Os resultados do sequenciamento da subunidade 16S rRNA mostraram que o gênero *Bacillus* (54%) foi o mais representativo dentre as sequências obtidas, seguido pelo gênero *Alcaligenes*, *Lysinibacillus* e *Paenibacillus*. Foi observada uma correlação positiva da biodiversidade bacteriana com algumas características físico-químicas do solo: ferro, fósforo e argila. O índice de Shannon-Wiener mostrou que existe uma diversidade moderada de bactérias de acordo com as populações de bromélias amostradas. Um grande número de bactérias identificadas com o gênero *Bacillus* é encontrado em ambientes semelhantes a cangas, pois este gênero possui adaptações para sobrevivência em ambientes hostis, como a produção de endósporos, capacitando-o para sobreviver em ambientes com mudanças dramáticas de temperatura. Em conclusão as análises de BOX-PCR complementou a técnica de sequenciamento, mostrando uma diversidade intra-genérica e intra-específica entre os isolados.

**Palavras-chave:** bactérias, bromélias, sequenciamento

### Abstract

The association of bacteria with plants is widely studied in different environments, especially in cultivated plants. However, it is necessary to expand the studies to the association of bacteria with wild plants. The aims of this study were to isolate, characterize and identify bacteria associated with bromeliads from “cangas”, and correlate the diversity of bacteria with the different species of plants, with soil characteristics and with the different populations sampled. It was collected roots of *Dyckia excelsa*, *Dyckia leptostachya* and *Deuterocohnia meziana* in three distinct

localities: Farm São João, Parque Municipal Piraputangas and Sítio Arqueológico Lajedo in Corumbá, Mato Grosso do Sul State, Brazil. To count and isolation of epiphytic bacteria, the roots were immersed in PBS buffer and agitated at 100 rpm. The endophytic bacteria were counted and isolated after surface disinfection of tissues, which were macerated in PBS buffer and subjected to agitation of 150 rpm. Samples were diluted in PBS buffer and plated on trypticase soy agar 4% and incubated at 28 °C. Morphological characterization was based on the shape, border, glossiness, elevation, color and size, which were used for cluster analysis. The BOX-PCR analysis was to amplify the regions boxA. Representative isolates of each fingerprint and those who did not have their DNA amplified by BOX-PCR, had the 16S rDNA sequenced. The phylogenetic tree was constructed using the MEGA6 program with the neighbor-joining method. Correlation analyzes were made to verify the biodiversity with the characteristics of the soil, with the plant species and the size of the soil islands. The results of the morphological characteristics showed that there is high phenotypic diversity in root systems, confirmed by BOX-PCR analysis, which showed intrageneric and intraspecific variability in bacteria isolated from bromeliads. The sequencing results showed that the genus *Bacillus* (54%) was the most representative among the sequences obtained, followed by the genus *Alcaligenes*, *Lysinibacillus* and *Paenibacillus*. The results showed a positive correlation of bacterial biodiversity with some physical and chemical characteristics of the soil: iron, phosphorus and clay. The Shannon-Wiener index showed that there was a moderate range of bacteria according to the populations sampled bromeliads. A large number of bacteria identified as *Bacillus* is found in similar environments to sarongs because this genre has adaptations for survival in hostile environments such as the production of endospores, enabling it to survive in

environments with dramatic temperature changes. In conclusion the BOX-PCR analysis complemented the sequencing technique, showing a intragenérica and intraspecific diversity among the isolates.

**Keywords:** bacteria, bromeliads, sequencing.

## Sumário

Introdução geral .....	9
Associação de microrganismos endofíticos/epifíticos às plantas .....	9
Família Bromeliaceae.....	13
Bancadas lateríticas .....	15
Objetivo Geral.....	17
Objetivos Específicos .....	18
Referências Bibliográficas .....	18
Artigo: BACTÉRIAS ASSOCIADAS A BROMÉLIAS DE CANGAS DE CORUMBÁ, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL.....	26
Considerações Finais.....	67
Anexos .....	68

## **Introdução geral**

### **Associação de microrganismos endofíticos/epifíticos às plantas**

O estabelecimento de espécies dentro de um ecossistema, muitas vezes, envolve a associação e interação com outros organismos, como por exemplo, a relação mutualística com fungos micorrízicos e com bactérias fixadoras de nitrogênio (Peixoto Neto et al. 2003). Dentre os organismos associados aos vegetais, existem aqueles que vivem dentro de tecidos de vegetais que podem ser neutros, benéficos ou patogênicos, os chamados endofíticos (Sikora et al. 2007). E também existem os organismos epifíticos, que colonizam e se reproduzem na superfície do tecido vegetal (Bonatelli 2012) e juntamente com os endofíticos benéficos podem gerar uma resposta positiva da planta.

A produção de hormônios vegetais por bactérias endofíticas e epifíticas é um tipo de relação que geralmente promove uma resposta benéfica à planta. Algumas bactérias tem a capacidade de induzir resistência a doenças melhorando a saúde e nutrição de plantas em resposta a associação (Giongo et al. 2013), prevenindo a atividade e crescimento de patógenos (Tewari e Arora 2013). Os microrganismos associados podem ainda atuar direta e indiretamente na sobrevivência de plantas submetidas a estresses abióticos (Compant et al. 2010). Como, por exemplo, o que acontece nas interações simbióticas entre organismos epifíticos e fungos micorrízicos, assim como a colonização de raízes por bactérias biocontroladoras e promotoras de crescimento vegetal (Bais et al. 2006).

Estes organismos podem ser considerados associativos e benéficos, e também podem ser encontrados livremente convivendo com outros microrganismos na rizosfera, local de intensa atividade microbiana graças à existência de exsudatos radiculares, que

são compostos orgânicos presentes em vegetais, como açúcares, aminoácidos, vitaminas, enzimas e ácidos orgânicos e até mesmo células da borda das raízes (Oliveira et al. 2003; Rocha et al. 2004; Dakora e Phillipis 2002).

O conhecimento das espécies que fazem parte da comunidade bacteriana associada às plantas é importante para a compreensão de como os processos biológicos relacionados às plantas são influenciados de acordo com os fatores ambientais, podendo corroborar com a ideia que solos de ambientes naturais possuem uma alta diversidade microbiana associada, em comparação a solos de ambientes manipulados (Kuklinsky - Sobral 2003; Compant et al. 2010).

Para o conhecimento da comunidade de organismos, existem várias técnicas que são utilizadas para o diagnóstico da diversidade de microrganismos. A revisão de Kent & Triplett (2002) apresenta várias técnicas para acesso a comunidades microbianas, tais como ITS - RFLP (Comprimentos de restrição de fragmentos polimórficos), RAPD (Amplificação aleatória de DNA polimórfico) e ARDRA (Análise de Restrição do DNA amplificado). Para análises de diversidade de microrganismos também é utilizada a técnica de DGGE que permite caracterizar a comunidade bacteriana, identificando espécies microbianas não observadas no isolamento (Lacava et al. 2006). Além dessas técnicas, também são usadas sequências repetitivas do DNA genômico de procaríotos, pois essas regiões apresentam elevado grau de polimorfismo e podem estar envolvidas em processos evolutivos na adaptação de microrganismos a ambientes extremos (van Berkum 1999).

Uma dessas sequências repetitivas é o chamado BOX, cuja sequência é composta por três subunidades (boxA, boxB e boxC), sendo considerada a subunidade A altamente conservada em diversas espécies de bactérias e geralmente ausente em bactérias Gram positivas (Koeuth et al. 1995). Segundo Hungria et al. (2008b) e Menna

et al. (2009), a técnica de BOX – PCR é eficiente, pois resulta em perfis com maior bandejamento, além de ser uma técnica barata por utilizar somente um *primer*, sendo possível a identificação da diversidade intragenérica ou intraespecífica.

A caracterização genotípica de bactérias associadas a tecidos vegetais é uma ferramenta útil na identificação dos isolados, sendo que uma das técnicas mais utilizadas que contribui para o posicionamento taxonômico das espécies microbianas é o sequenciamento das regiões 16S, 23S e 5S que codificam o RNA ribossomal, podendo ser usado também para estudos de diversidade, pois são moléculas universais, constantes, com funções específicas e estáveis durante todos os estágios da evolução, que não sofrem alterações de acordo com as mudanças ambientais (Woese 1992). Geralmente, o gene 16S rRNA é usado para estudos de diversidade de bactérias por ser um gene altamente conservado que permite a identificação de bactérias em nível de gênero e até mesmo de espécie (Garrity & Holt 2001). Assim, a análise do gene 16S deve ser preferencialmente aplicada em estudos de taxonomia e filogenia, porém muitas vezes não possibilitam a diferenciação de estirpes, havendo a necessidade de se buscar outros métodos (Hungria et al. 2008a).

Associada às técnicas moleculares de avaliação da diversidade e posicionamento taxonômico, os dados oriundos de cultivo *in vitro*, tais como dados morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, também são utilizadas para estudo de diversidade microbiana, apesar de não fornecerem detalhes sobre a diversidade genética dos isolados (Moreira et al. 2010).

Em espécies vegetais em geral, alguns trabalhos relatam a diversidade de bactérias endofíticas e epifíticas, como o de Brasil et al. (2005) que observaram grande diversidade em bactérias endofíticas e epifíticas em gramíneas no Pantanal Sul-Matogrossense. Uku et al. (2007) registraram alta diversidade associada a *Cymodocea*

*rotundata*, uma espécie vegetal marinha, que apresentou diferenças na composição de espécies associadas em dois locais diferentes. Okazaki et al. (2014) também relataram alta diversidade de bactérias localizadas na superfície de raízes de beterraba, com 531 cepas distribuídas em diferentes posições taxonômicas. Bhore et al. (2013), constataram uma alta diversidade de bactérias endofíticas associadas a espécies vegetais de importância medicinal. Assim como, Sun et al. (2008), relataram que existe uma diversidade abundante em sistemas radiculares de arroz. É importante ressaltar que a maioria dos estudos relacionados à diversidade de bactérias é voltada para espécies cultivadas, havendo uma escassez de estudos com espécies silvestres.

Com relação ao isolamento de bactérias em espécies pertencentes à família Bromeliaceae Juss., alguns trabalhos foram desenvolvidos com *Vriesea gigantea* Gaudchi. (Ambrosini et al. 2007) e *Tillandsia aeranthos* (Loiseleur) L.B. Smith (Giongo et al. 2013), por exemplo. O trabalho de Giongo et al. (2013), abordou a presença de bactérias provenientes de tanques de água e da superfície de folhas (*V. gigantea*) e de origem endofítica e da filosfera (*T. aeranthos*), os quais foram avaliados quanto a diferentes características com potencial para a promoção de crescimento vegetal, tais como produção de sideróforos e ácido indol-acético (AIA), assim como solubilização de fosfatos e amplificação do gene *nifH*. Mais de 90% dos isolados bacterianos foram capazes de solubilizar fosfatos, e mostraram uma alta diversidade morfológica, fisiológica e genética. A capacidade destes microrganismos de produzir sideróforos e solubilizar fosfato propicia a sobrevivência do vegetal em ambientes em que há uma escassez destes nutrientes, exercendo, portanto seu papel ecológico nos diferentes habitats (Giongo et al. 2013).

Reginatto (2008) encontrou maior diversidade de bactérias associadas às cisternas do que bactérias endofíticas em espécies de bromélias na Mata Atlântica,

assim como isolados fixadores de nitrogênio atmosférico, produtores de enzimas extracelulares e solubilizadores de fosfatos.

Reginatto (2008) também encontrou uma grande diversidade de bactérias endofíticas associadas a espécies de bromélias na Mata Atlântica, as quais apresentaram diferentes funções, desde a fixação biológica de nitrogênio e produção de enzimas, até a solubilização de fosfatos.

Desta forma, é importante pesquisar e conhecer as interações que existem entre espécies de bromélias e bactérias, verificando, como foi observado por Giongo et al. (2013) e Reginatto (2008), se existem espécies bacterianas que colaboram no estabelecimento das espécies vegetais em ambientes deficientes em nutrientes, e também se existe uma diversidade considerável em ambientes naturais.

### **Família Bromeliaceae**

A variedade de espécies de bromélias foi dividida recentemente em oito subfamílias: Brocchinioideae, Lindmanioideae, Tillandsioideae, Hechtioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Bromelioideae (Givnish et al. 2011). Bromeliaceae contém 3.350 espécies conhecidas e 58 gêneros (Luther 2012). É uma família de monocotiledôneas de grande importância ecológica na Mata Atlântica e nos campos rupestres (Lindholz et al. 2010).

Esta família é conhecida por ser dominada por espécies epífitas, porém também é representada por espécies terrestres, rupícolas e saxícolas (Versieux et al. 2008). São conhecidas espécies comestíveis como a *Ananas comosus* L., e também espécies com diferentes usos, como medicinais, utilizadas na indústria têxtil, ornamentais e de importância ecológica (Hornung-Leoni 2011). Possui restrição em sua distribuição geográfica e há um grande número de espécies endêmicas (Acebey et al. 2010). Com

exceção de *Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr., que ocorre no oeste da África (Porembski & Barthlott 1999), a família Bromeliaceae tem distribuição nas Américas, ocorrendo desde o Sul do Estados Unidos até o Norte da Patagônia, na Argentina (Givnish et al. 2004).

Dentre diferentes espécies que pertencem à família Bromeliaceae, estão incluídas as espécies *Dyckia excelsa* Leme, *Dyckia leptostachya* Baker e *Deuterocohnia meziana* Kuntze ex Mez, pertencentes à subfamília Pitcairnioideae (Smith & Downs 1974). A espécie *Dyckia excelsa* é saxícola, com caule curto a longo, propagando-se através de brotos, com altura entre 70 e 130 cm de altura, as folhas se distribuem em formato de uma roseta, com distribuição restrita, essa espécie só ocorre nos afloramentos rochosos, localizados nos municípios de Corumbá e Ladário, no leste de Mato Grosso do Sul (MS) (Paggi et al. 2015). A espécie *Dyckia leptostachya* é uma erva perene terrestre, medindo 0,3 m de altura, é utilizada como planta ornamental e como forrageira, rebrotando após as queimadas, possui distribuição nos estados de Mato Grosso, MS, Minas Gerais, Paraná e nos campos arenosos do litoral de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, ocorrendo também na Bolívia, Paraguai e Argentina (Pott & Pott 1994). *Deuterocohnia meziana* é encontrada em Corumbá (MS), no sudeste da Bolívia e no nordeste do Paraguai, suas folhas e flores possuem características variáveis, e as sépalas podem ser rosa, avermelhado, amarelo ou laranja, e as pétalas possuem um tom esverdeado (Schütz 2014). Todas as três espécies ocorrem em Corumbá (MS) nas bancadas lateríticas, apresentando características para adaptação nesses ambientes (Figura 1).



**Figura 1.** Ilhas de solo de espécies de Bromeliaceae em Corumbá-MS, Brasil. (A) *Deuterocohnia meziana*; (B) *Dyckia excelsa*; (C) *Dyckia leptostachya*.

### **Bancadas lateríticas**

No Brasil, as lateritas endurecidas, também conhecidas como cangas, ocorrem principalmente no Planalto Central e no Nordeste, enquanto na região amazônica sua distribuição se dá de forma mais ampla como plintita (laterita não endurecida) (Bigarella et al. 2007). As maiores reservas de minério de ferro do país encontram-se no Quadrilátero Ferrífero (Minas Gerais-MG), Serra de Carajás (Pará-PA), Caetité (Bahia-BA) e Morraria do Urucum (MS) (Carmo et al. 2012), mas a exploração econômica sem o devido planejamento ambiental tem sido a principal ameaça à flora destes habitats (Jacobi et al. 2007).

Nos afloramentos rochosos podemos encontrar uma vegetação adaptada a condições com altos níveis de insolação, grande amplitude térmica, ausência de solo e escassez de água, além de ventos e enxurradas (Takahasi 2010). Esse tipo de vegetação

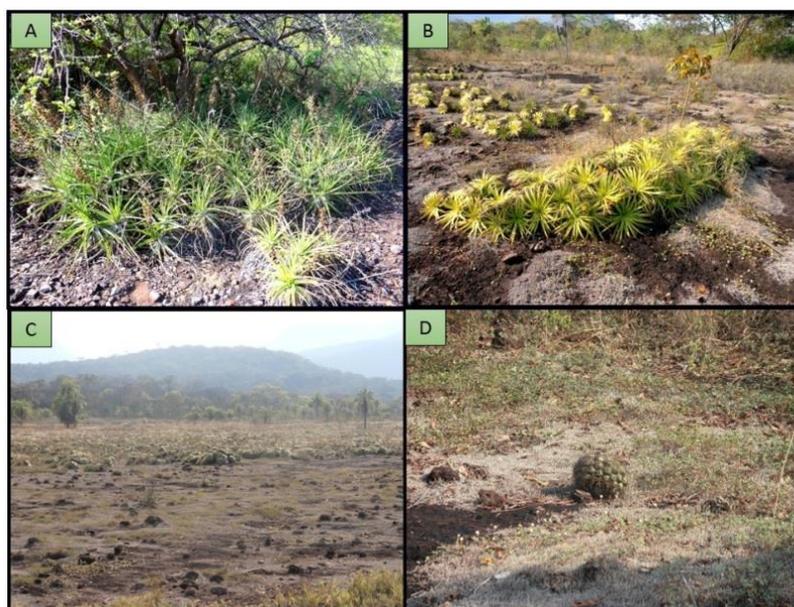
ocorre nas chapadas areníticas e quartizíticas do Centro-Oeste e Sul brasileiro, e são denominados campos ferruginosos (Rizzini 1997).

As bancadas lateríticas das Morrarias do Urucum e do Rabicho, em Corumbá, MS, localizam-se nas áreas de drenagem (em torno de 100 m de altitude) no sopé destes morros, possuem pequena declividade e são formadas por material laterítico endurecido de natureza ferrífera (Cardoso et al. 2000), com pouca aptidão para usos agrícolas ou pastoris (Pott et al. 2000). Estes substratos ferruginosos endurecidos podem ser considerados ecossistemas similares àqueles em afloramentos rochosos onde as plantas vasculares se estabelecem diretamente sobre o substrato endurecido ou entre fragmentos de rochas (plantas saxícolas) ou na forma de agrupamentos referidos em diversos estudos como ilhas de solo (Burbanck & Platt 1964, Shure & Ragsdale 1977, Philips 1981, Meirelles et al. 1999, Conceição et al. 2007, Ribeiro & Medina 2007, Sarthou et al. 2009, Takahasi 2010) (Figura 1).

A restrição ambiental nestes ambientes limita o número de espécies de plantas estabelecidas, contribuindo para o isolamento reprodutivo destas populações e, por sua vez, conferindo um elevado grau de endemismo a estes ambientes (Porembski 2007). No Brasil, isso parece ser consistente para espécies saxícolas dos gêneros *Coleocephalocereus*, *Melocactus* (Cactaceae) (Barthlott et al. 1993, Porembski et al. 1998) e *Alcantarea* (Bromeliaceae Juss.) (Porembski et al. 1998), assim como para Velloziaceae (Barthlott et al. 1993), destacando-se a ocorrência do centro de dispersão para estes dois últimos táxons no sudeste brasileiro.

Segundo Takahasi (2010), devido às características ambientais nesses afloramentos, as plantas dessas áreas apresentam características morfológicas e fisiológica que permitirão sua adaptação, como por exemplo, plantas suculentas e presença de caules volumosos, assim como a presença de espinhos para evitar a perda

de água (Barthlott et al. 1993). A vegetação é composta inicialmente por algas e líquens, espécies pioneiras na colonização de ambientes rochosos, e posteriormente por plantas pecilohídricas ou suculentas, que se instalam nas depressões preenchidas por sedimentos, materiais orgânicos e decomposição da rocha matriz, como por exemplo, cactos e bromélias (Hamblen 1964, Meirelles et al. 1999) (Figura 2).



**Figura 2.** Regiões caracterizadas como bancadas lateríticas, apresentando uma vegetação característica, Corumbá-MS, Brasil. (A) e (B) ilhas de bromélias; (C) bancada laterítica; (D) indivíduo de Cactaceae.

### Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar morfológica e molecularmente as bactérias endofíticas e epifíticas associadas a indivíduos de *Dyckia excelsa*, *Dyckia leptostachya* e *Deuterocohnia meziana*, que ocorrem em bancadas lateríticas da região da Morraria do Urucum em Corumbá-MS.

### Objetivos Específicos

- ✓ Isolar e caracterizar morfológicamente os isolados endofíticos e epifíticos obtidos;
- ✓ Avaliar a diversidade intragenérica ou intraespecífica dos isolados por meio da técnica de BOX-PCR;
- ✓ Identificar taxonomicamente bactérias isoladas através do sequenciamento do gene 16S rRNA;
- ✓ Relacionar, comparar e correlacionar a diversidade de bactérias às espécies de plantas em estudo, aos locais onde as plantas foram coletadas, ao tamanho insular e as características físico-químicas do solo, respectivamente.

### Referências Bibliográficas

- Acebey A, Krömer T, Maass BL, Kessler M. 2010. Ecoregional distribution of potentially useful species of Araceae and Bromeliaceae as non-timber forest products in Bolivia. *Biodiversity Conservation* 19:2553-2564.
- Ambrosini A, Giongo A, Beneduzi A, Cobalchini N, Friedrich L, Passaglia LMP. 2007. Bactérias promotoras de crescimento vegetal em *Vriesea gigantea* Gaudchi. (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Biociências* 5 (2):1169-1170.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. 2006. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annual Reviews of Plant Biology* 57:233-266.
- Barthlott W, Grogger A, Porembski S. 1993. Some remarks on the vegetation of tropical inselbergs: diversity and ecological differentiation. *Biogéographica* 69:17-36.

- Bhore SJ, Komathi V, Kandasamy KI. 2013. Diversity of endophytic bacteria in medicinally important *Nepenthes* species. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* 4:431-434.
- Bigarella JJ, Becker RD, Santos GF. 2007. Estrutura e origem das paisagens tropicais e subtropicais. 2 ed. Florianópolis: Ed. da UFSC.
- Bonatelli ML. 2012. Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não cultivadas do guaranazeiro e o controle de antracnose. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- Brasil MS, Baldani JI, Baldani VLD. 2005. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 29:179-190.
- Burbanck MP, Platt RB. 1964. Granite outcrop communities of the piedmont plateau in Georgia. *Ecology* 42:292-306.
- Cardoso EL, Oliveira H, Amaral JAM, Ker JC, Pereira NR, Santos RD, Tôsto SG, Spera ST, Carvalho Jr W. 2000. Pedologia. *In* Zoneamento ambiental da Borda Oeste do Pantanal: maciço do Urucum e adjacências (JSV Silva, org.). Brasília, DF, Comunicação para transferência de tecnologia, p. 95-109.
- Carmo FF, Carmo FF, Campos IC, Jacobi CM. 2012. Cangas: ilhas de ferro estratégicas para a conservação. *Ciência Hoje* 29:48-5.
- Compant S, Clément C, Sessitsch A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology & Biochemistry* 42 (5):669-678.
- Conceição AA, Pirani JR, Meirelles ST. 2007. Floristics, structure and soil of insular vegetation in four quartzite-sandstone outcrops of "Chapada Diamantina" northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 30: 641-656.

- Garrity GM, Holt JG. 2001. The road map to the Manual. *In* Bergey's manual of systematic bacteriology (GM Garrity, DR Boone, RW Castenholz, eds.). New York: The Williams & Wilkins/Springer-Verlag 2nd ed., p. 119-154.
- Giongo A, Beneduzi A, Gano K, Vargas LK, Utz L, Passaglia LMP. 2013. Characterization of plant growth-promoting bacteria inhabiting *Vriesea gigantea* Gaud. and *Tillandsia aeranthis* (Loiseleur) L B Smith (Bromeliaceae). *Biota Neotropica* 13 (3):80-85.
- Givnish TJ, Millam KC, Evans TM, Hall JC, Pires JC, Berry PE, Sytsma KJ. 2004. Ancient Vicariance or Recent Long-Distance Dispersal? Inferences about Phylogeny and South American–African Disjunctions in Rapateaceae and Bromeliaceae Based on *ndhF* Sequence Data. *International Journal of Plant Sciences* 165 (4):35-54.
- Givnish TJ, Barfuss MHJ, Ee BV, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ. 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in 24 Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* 98 (5):872-895.
- Hambler, D.J. 1964. The vegetation of granitic outcrops in western Nigeria. *Journal of Ecology* 52:573-594.
- Hornung-Leoni CT. 2011. Avances sobre Usos Etnobotánicos de las Bromeliaceae en Latinoamérica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10 (4):297-314.
- Hungria M, Chueire LM, Menna P, Bangel EV. 2008a. Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCR. *Comunicado Técnico, Embrapa, Londrina – PR*, p. 1-12.

- Hungria M, Menna P, Bangel EV, Barcellos FG, Grange L, Pinto FGS, Ribeiro RA, Batista JSS, Binde DR, Plotegher F, Kaschuk G, Alberton A, Loureiro MF, Campo RJ, Chueire LMO. 2008b. Identificação das metodologias mais adequadas para a análise da diversidade genética intra e interespecífica em rizóbios. *In: RELARE*, 14, Bonito, 2008. Programa e resumos s.l.: Embrapa Agropecuária Oeste.
- Jacobi CM, Carmo FF, Vincent RC, Stehmann JR. 2007. Plant communities on ironstone outcrops - adverse and endangered Brazilian ecosystem. *Biodiversity and Conservation* 16:2185-2200.
- Kent AD, Triplett EW. 2002. Microbial Communities and their interactions in Soil and Rhizosphere Ecosystems. *Annu. Rev. Microbiol* 56:211-36.
- Koeuth T, Versalovic J, Lupski JR. 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Research* 5:408-418.
- Lacava PT, Andreote FD, Araújo WL, Azevedo JL. 2006. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41:637-642.
- Lindholz CG, Silva AP, Silva RM. 2010. Caracterização da biodiversidade procariótica e fúngica presente em fitotelmos de bromélias em uma área de Mata Atlântica no sul do Brasil. *In Anais XI Salão de Iniciação Científica PUCRS*.
- Luther HE. 2012. An alphabetical list of bromeliad binomials. Singapore, The Marie Selby Botanical Gardens and Bromeliad Society International 13th ed., p. 1-44.
- Meireles ST, Pivello VR, Joly CA. 1999. The vegetation of granite rock outcrops in Rio de Janeiro, Brazil, and the need protection. *Environmental Conservation* 26:10-20.

- Menna P, Pereira AA, Bangel EV, Hungria M. 2009. Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis* 48:120-130.
- Moreira FMS, Silva K, Nóbrega RSA, Carvalho F. 2010. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae* 1(2):74-99.
- Peixoto Neto PA de S, Azevedo JL, Araújo WL. 2003. Microrganismos Endofíticos. *Biotechnology, Ciência & Desenvolvimento* 29:70-84.
- Nóbrega RSA, Moreira FMS, Siqueira JO, Lima AS. 2004. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 28:269-279.
- Okazaki K, Iino T, Kuroda Y, Taguchi K, Takahashi Y, Ohwada T, Tsurumaru H, Okubo T, Minamisawa K, Ikeda S. 2014. An Assessment of the Diversity of Culturable Bacteria from Main Root of Sugar Beet. *Microbes and Environments* 29(2):220-223.
- Oliveira ALM, Urquiaga S, Baldani JV. 2003. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica: Embrapa Agrobiologia.
- Paggi GM, Louzada RB, Ishii IH, Takahasi A, Arruda RO, Lorenz-Lemke AP. 2015. Rediscovering *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae) in Mato Grosso do Sul, Brazil: taxonomy, geographic distribution, and notes on leaf anatomy. *Systematic Botany*, 40(1):129-135.
- Philips DL. 1981. Sucession in granite outcrop shrub-tree communities. *The American Midland Naturalist* 106:313-317.

- Porembski S, Martinelli G, Ohlemüller R, Barthlott W. 1998. Diversity and ecology of saxicolous vegetation mats on inselbergs in the Brazilian Atlantic rainforest. *Diversity and Distributions* 4:107-119.
- Porembski S, Barthlott W. 1999. *Pitcairnia feliciana*: the only indigenous African bromeliad. *Harvard Papers in Botany* 4:175-184.
- Porembski S. 2007. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Revista Brasileira de Botânica* 30:579-586.
- Pott A, Pott VJ. 1994. Plantas do Pantanal. Embrapa-SPI.
- Pott A, Silva JSV, Salis SM, Pott JV, Silva MP. 2000. Vegetação e uso da terra. In: Zoneamento Ambiental da borda oeste do Pantanal: Maciço do Urucum e Adjacências (JSV Silva, org.). Comunicação para transferência de tecnologia, p. 95-109.
- Reginatto TSC. 2008. Diversidade de bactérias associadas a bromélias do Parque Estadual de Itapuã/RS. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde.
- Ribeiro KT, Medina BMO. 2007. Estrutura, dinâmica e biogeografia das ilhas de vegetação sobre rocha do Planalto do Itatiaia, RJ. *Boletim do Parque Nacional do Itatiaia* 10:1-82.
- Rizzini CT. 1997. Tratado de Fitogeografia do Brasil 2nd ed. Aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos. Âmbito Cultural Edições Ltda.
- Rocha FS, Campos V P, Dutra MR, Silva JRC. 2004. Exsudatos radiculares e de culturas de células de diversas plantas na reprodução de *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Brasileira* 28:207-213.

- Sarthou C, Kounda-Kiki C, Vaçulik A, Mora P, Ponge JF. 2009. Successional patterns on tropical inselbergs: A case study on the Nouragues iselbergs (French Guiana). *Flora* 204:396-407.
- Shure D, Ragsdale HL. 1977. Patters of primary succession on granite outcrop surfaces. *Ecology* 58:993-1006.
- Schütz N. 2014. *Deuterocohnia meiziana* (Bromeliaceae): subspecies classification and the description of the new subspecies *D. meiziana* subsp. *vogtii* from northern Paraguay. *Phytotaxa* 162(1):18-30.
- Sikora RA, Schäfer K, Dababat AA. 2007. Modes of action associated with microbially induced in planta suppression of plantparasitic nematodes. *Australasian Plant Pathology* 36:124-134.
- Smith LB, Downs RJ. 1974. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica* 14:1-662.
- 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.
- Takahasi A. 2010. Ecologia da Vegetação em Bancadas Lateríticas em Corumbá, MS. Tese de Doutorado em Ecologia. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo Departamento de Ecologia.
- Tewari S, Arora NK. 2013. Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances. *In*: NK Arora (ed.) Chapter 1 Transactions Among Microorganisms and Plant in the Composite Rhizosphere Habitat Springer New Delhi Heidelberg New York Dordrecht London, p. 2-28.
- Uku J, Björk M, Bergman B, Díez B. 2007. Characterization and comparison of prokaryotic epiphytes associated with three East African seagrasses. *Journal of Phycology* 43:768-779.

- Van Belkum P. 1999. Short sequence repeats in microbial pathogenesis and evolution. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56:729-734.
- Versieux LM, Wendt T, Louzada RB, Wanderley MGL. 2008. Bromeliaceae da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4:126-138.
- Woese CR. 1992. Prokaryote systematics: the evolution of a science. *In* (A Ballows, HG Trüper, M Dworkin, W Harder, K-H Schleifer, eds.). *The Prokaryotes*, vol. 1, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, p. 3-18.

**Artigo: BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS  
A BROMÉLIAS DE CANGAS, MATO GROSSO DO SUL,  
BRASIL**

# BIODIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A BROMÉLIAS DE CANGAS, MATO GROSSO DO SUL, BRASIL

Artigo a ser submetido para a revista *Microbial Ecology*

THIANNY FERNANDA CARRELO VIANA<sup>1, 3</sup>, ANALICE PAULA DE SOUSA CAMPELO<sup>3</sup>, GECELE MATOS PAGGI<sup>1, 2\*</sup>, MARIVAINÉ DA SILVA BRASIL<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, CEP 79070-900 Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>2</sup>Ciências Biológicas, Laboratório de Genética e Laboratório de Ecologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, *Campus* do Pantanal - UFMS/CPAN, CEP 79304-902, Corumbá, MS, Brasil.

<sup>3</sup>Ciências Biológicas, Laboratório de Microrganismos e Biologia Molecular, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, *Campus* do Pantanal - UFMS/CPAN, CEP 79304-902, Corumbá, MS, Brasil.

Título Resumido: Biodiversidade bactérias associadas a bromélias

\*E-mail para correspondência: [gecele.paggi@ufms.br](mailto:gecele.paggi@ufms.br)

## RESUMO

A diversidade de bactérias associadas a espécies vegetais silvestres ainda é pouco relatada, principalmente aquelas crescidas em associação com bromélias. Neste trabalho foram isoladas e identificadas bactérias epifíticas e endofíticas de raízes de *Dyckia excelsa*, *Dyckia leptostachya* e *Deuterocohnia meiziana*, que ocorrem em cangas no Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil. A diversidade de bactérias foi correlacionada com diferentes aspectos populacionais, espécies de plantas e características do solo. Foram isoladas bactérias epifíticas das raízes lavadas e bactérias endofíticas de raízes desinfestadas superficialmente. Diluição seriada dos tecidos macerados foi semeada em meio Tryptic Soy Agar a 4% para a contagem e isolamento das bactérias. As regiões boxA foram amplificadas utilizando o *primer* A1R. Bactérias representativas de cada padrão de bandas, e aquelas que não apresentaram produto de amplificação, foram selecionadas para o sequenciamento da região 16S rRNA, utilizando os *primers* 27F e Amp2. Os resultados de BOX-PCR revelaram a presença de diversidade intragenérica e intraespecífica, diferenciando as estirpes. Foi detectada uma alta diversidade fenotípica e genética utilizando as técnicas de morfologia e BOX-PCR, que permitiu um maior acesso à diversidade intragenérica e intraespecífica, possibilitando a diferenciação de estirpes. O sequenciamento e a filogenia mostraram um número menor de bactérias pertencentes ao gênero *Microbacterium* e *Brevibacterium*, e maior identificação de isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, que é bastante conhecido pela capacidade de esporulação e maior tempo de sobrevivência em áreas mais hostis. Além disso, maior biodiversidade foi observada com o aumento na concentração de ferro, fósforo e argila nos solos amostrados.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Bacillus*, cangas, diversidade, endofíticas, epifíticas.

ABSTRACT

The diversity of bacteria associated with wild plant species is still underreported, especially those grown in association with bromeliads. In this work we were isolated and identified epiphytic and endophytic bacteria roots *Dyckia excelsa*, *Dyckia leptostachya* and *Deuterocohnia meiziana* occurring in “cangas” in the Pantanal South Mato Grosso, Brazil. The diversity of bacteria was correlated with various aspects population, species of plants and soil characteristics. They were isolated epiphytic bacteria from washed roots and endophytic bacteria sterilized roots surface. Serial dilution of macerated tissue was plated on Tryptic Soy Agar medium at 4% for counting and isolating the bacteria. The boxA regions were amplified using the *primer* A1R. Bacteria representative of each pattern of bands, and those who did not have amplicon, were selected for the sequencing of the 16S rRNA region using the *primers* 27F and AMP2. The BOX-PCR data showed the presence of intragenérica and intraspecific diversity, differentiating the strains. A high phenotypic and genetic diversity using morphological techniques and BOX-PCR, which allowed greater access to intragenérica and intraspecific diversity, enabling the differentiation of strains was detected. The sequencing and phylogeny showed less bacteria belonging to the genus *Mycobacterium* and *Brevibacterium*, and greater identification of isolates belonging to the genus *Bacillus*, which is well known for sporulation capacity and longer survival in hostile locations. Furthermore, most biodiversity was observed with increasing concentration of iron, phosphorus and clay in the soil sampled.

KEYWORDS: *Bacillus*, “cangas”, diversity, endophytic, epiphytic.

## INTRODUÇÃO

A diversidade de bactérias está relacionada com o ambiente em que estes organismos vivem, dentro de seus habitats e entre os habitats (Fierer e Lennon 2011), integrando a comunidade microbiana que participa de interações que ocorrem dentro de um ecossistema, como é o caso das relações planta-bactéria (Kuske *et al.* 2002; Peixoto Neto *et al.* 2003). Estas relações podem trazer respostas positivas, neutras ou prejudiciais para um ou ambos os organismos envolvidos, dependendo do tipo de associação. As bactérias podem estar presentes dentro dos tecidos vegetais, como folhas e raízes, ou apenas superficialmente, habitando a rizosfera, local onde há intensa atividade microbiana devido à presença de substâncias exsudadas pelas raízes das plantas (Oliveira *et al.* 2003; Sikora *et al.* 2007; Bonatelli 2012).

A diversidade de bactérias associadas a plantas é estudada amplamente em espécies cultivadas, como pastagens, arroz, beterraba, soja e plantas medicinais (Kuklinsky- Sobral *et al.* 2004; Brasil *et al.* 2005; Sun *et al.* 2008; Bhore *et al.* 2013; Okazaki *et al.* 2014), dentre outras espécies de interesse econômico devido a necessidade de buscar inoculantes bacterianos que possam ser utilizado nas lavouras, para procurar reduzir o uso de adubos químicos que prejudicam o meio ambiente, porém o estudo com plantas silvestres é pouco relatado e explorado.

Para a caracterização e análise da diversidade bacteriana, geralmente o sequenciamento da região 16S que codifica o RNA ribossomal é utilizado, por ser capaz de identificar bactérias no nível de gênero e até mesmo de espécie, ser uma região conservada dentro das espécies de bactérias, ser uma molécula universal, constante, com funções específicas e por ter estabilidade durante os processos evolutivos, não sofrendo alterações com as mudanças ambientais (Woese 1992; Garrity e Holt 2001; Fierer e

Lennon 2011). Assim, sua utilização é eficaz nos estudos de taxonomia e filogenia, porém há a necessidade de se buscar outras técnicas que diferenciam estirpes (Hungria *et al.* 2008a), auxiliando as análises de filogenia do gene 16S rRNA. Para este caso, sequências repetitivas do DNA genômico de bactérias podem ser utilizadas, pois apresentam grande polimorfismo e podem possivelmente estar envolvidas na adaptação destes organismos a ambientes hostis (van Belkum 1999). As sequências repetitivas BOX, por exemplo, são compostas por três subunidades boxA, boxB e boxC, em que a subunidade boxA é a mais conservada nas espécies bacterianas, resultam num maior número de bandas, e além disso, a técnica chamada BOX-PCR pode ser desenvolvida com baixo custo devido a utilização de apenas um primer (Koeuth *et al.* 1995; Hungria *et al.* 2008b; Menna *et al.* 2009).

Sabendo-se das características que podem ser identificadas através das diferentes técnicas, há a necessidade de buscar trabalhos relacionados com espécies de plantas não cultivadas, buscando entender a relação bactéria – planta nos seus ambientes naturais, relatar a existência de espécies ainda não catalogadas para a região e descrever a associação de bactérias já registradas com outras espécies de plantas, como por exemplo, espécies pertencentes à família Bromeliaceae Juss.

Os estudos envolvendo a relação bactéria-planta em Bromeliaceae foram registrados em alguns trabalhos, porém em regiões de Mata Atlântica, como os trabalhos de Ambrosini *et al.* (2007) e Giongo *et al.* (2013), que desenvolveram estudos com *Vriesea gigantea* Gaudchi. e *Tillandsia aeranthos* (Loiseleur) L.B. Smith. Giongo *et al.* (2013), isolou bactérias provenientes de tanques de água e da superfície de folhas (*V. gigantea*) e de origem endofítica e da filosfera (*T. aeranthos*). Os isolados foram submetidos a testes que identificam o potencial para a promoção de crescimento vegetal, como produção de sideróforos e ácido indol-acético (AIA), e também testes

para verificar a capacidade de solubilizar fosfatos, além de verificar a presença de gene *nifH* nos isolados. Quase todos os isolados bacterianos foram capazes de solubilizar fosfatos (90%), e mostraram uma alta diversidade morfológica, fisiológica e genética, e uma boa porção foi identificada como *Bacillus*. O trabalho mostrou então a capacidade destes microrganismos sobreviver e facilitar o estabelecimento de espécies vegetais em ambientes em que há uma escassez destes nutrientes, exercendo, portanto seu papel ecológico nos diferentes habitats (Giongo et al. 2013).

Existem algumas espécies de plantas pertencentes à família Bromeliaceae, como a espécies *Dyckia excelsa* Leme, *D. leptostachya* Baker e *Deuterocohnia meiziana* Kuntze ex Mez., que ocorrem nos afloramentos rochosos dos municípios de Corumbá e Ladário, Mato Grosso do Sul (MS) e se encontram, na maioria das vezes, formando agrupamentos em ilhas de solo em regiões chamadas de cangas, ou bancadas lateríticas, que ocorrem principalmente no Planalto Central e no Nordeste brasileiro, os quais também já foram denominados de campos ferruginosos (Pott e Pott 1994; Rizzini 1997, Bigarella et al. 2007; Conceição et al. 2007; Schütz 2014; Paggi et al. 2015).

Tendo em vista a importância de se estudar microrganismos associados às plantas não cultivadas, o objetivo deste estudo foi isolar, caracterizar e identificar bactérias endofíticas e epifíticas associadas a indivíduos de *D. excelsa*, *D. leptostachya* e *D. meiziana*, pertencentes à família Bromeliaceae. Estas espécies ocorrem em bancadas lateríticas da região da Morraria do Urucum em Corumbá-MS. Para tanto foram utilizados a análise da morfologia das colônias, a técnica de BOX-PCR e o sequenciamento do gene 16S rRNA,. O conjunto de dados obtidos permitiu identificar, caracterizar e avaliar a diversidade intragenérica e intraespecífica dos isolados, relacionando a diversidade de espécies de bactérias encontradas com as plantas em estudo e entre as populações de bromélias. Além disso, foi feita a correlação da

diversidade de bactérias com o tamanho insular e com as características físico-químicas do solo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ÁREAS DE ESTUDO

A coleta do material vegetal foi feita em três locais diferentes em áreas de bancadas lateríticas localizados no município de Corumbá-MS, Brasil. Os locais foram: Fazenda São João (FSJ) (19°10'45,53"S e 57°32'17,67"W); Parque Municipal de Piraputangas (PMP) (19°14'37,27"S e 57°38'15,09"W); e Sítio Arqueológico Lajedo (SAL) (19°14'11,41"S e 57°38'44,81"W).

Foram coletados três indivíduos de *D. excelsa* (DE) na FSJ; nove indivíduos de *D. leptostachya* (DL) nas três localidades, três indivíduos por localidade; e seis indivíduos da espécie *Deuterocohnia meiziana* (DM), em duas localidades, PMP e SAL, três indivíduos por localidade, uma vez que a ocorrência das espécies de bromélias nas regiões é desigual. Foi coletado um indivíduo por ilha, sendo essas ilhas de tamanhos diferentes.

### ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS EPIFÍTICAS E ENDOFÍTICAS, E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A obtenção dos isolados bacterianos a partir das raízes foi feita seguindo instruções de Kuklinsky-Sobral (2003). As raízes foram coletadas em campo e armazenadas dentro de sacos plásticos em um isopor contendo gelo. As raízes foram

lavadas em água corrente para retirada do excesso de solo agregado às raízes e posteriormente pesadas.

Para a obtenção das bactérias epifíticas, 3g de raiz foram colocados em frascos de Erlenmeyer (250 mL), contendo 25 pérolas de vidro (0,1 cm de diâmetro) e 50 ml de tampão PBS (1,44 g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,20 g L<sup>-1</sup> de KCl; 8,00 g L<sup>-1</sup> de NaCl; pH 7,4). Os frascos contendo as raízes foram submetidos à agitação (100 rpm) a 28° C por 1 h. Em seguida, as amostras foram diluídas (10<sup>-2</sup> a 10<sup>-5</sup>) em tampão PBS e semeadas em placas de petri contendo o meio TSA 4% (Tryptic Soy Agar, Kasvi), suplementado com um fungicida Cercobin 700WP (50 µg mL<sup>-1</sup>), utilizando três repetições por diluição seriada.

Após a retirada das bactérias epifíticas, as bactérias endofíticas foram isoladas por meio de desinfecção superficial dos tecidos, que consistiu das seguintes etapas: lavagem por 1 min em etanol 70%, 3 min em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% de cloro ativo (v/v) acrescido de Tween 20 (1 mL L<sup>-1</sup>) e 30 s em etanol 70%, seguido de duas lavagens em água destilada esterilizada. Os tecidos foram triturados em 10 mL de tampão PBS com o auxílio de cadinho e almofariz. Em seguida, todo o material foi transferido para tubos Falcon de 15 mL e incubados sobre agitação (150 rpm) a 28° C por 1 h. Diluições seriadas (10<sup>-2</sup> a 10<sup>-5</sup>) em tampão PBS foram semeadas em placas de petri contendo TSA 4% suplementado com fungicida Cercobin 700WP (50 µg mL<sup>-1</sup>), utilizando três repetições por diluição seriada.

As placas foram incubadas a 28° C e avaliadas aos dois e oito dias de crescimento. Para confirmar se o processo de desinfecção foi bem feito, alíquotas da água destilada utilizada na última lavagem foram semeadas em placas de petri contendo TSA 4% suplementado com fungicida Cercobin 700WP (50 µg mL<sup>-1</sup>) e incubadas a 28° C por oito dias.

A população bacteriana por grama de tecido vegetal fresco foi estimada pela contagem de colônias cultivadas em meio TSA 4%. A caracterização morfológica da colônia (tamanho, borda, cor, formato, elevação, brilho) foi utilizada para separar os isolados em grupos primários seguindo recomendações do Bergey's Manual<sup>®</sup> of Systematic Bacteriology (Garrity *et al.* 2004). Estas características foram utilizadas para a criação de dendrogramas através do programa PAST versão 2.17 (Hammer *et al.* 2001), utilizando Jacard como coeficiente de similaridade. Colônias características de cada tipo morfológico foram purificadas, repicadas e estocadas em duas formas diferentes de armazenamento, em frascos de 5 ml contendo TSA 4% suplementado com glicerol 100% e armazenados a temperatura ambiente, e em microtubos contendo glicerol 50% e armazenados a -70° C.

#### AMPLIFICAÇÃO BOX-PCR E SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA

Os isolados foram divididos em grupos através da semelhança morfológica e utilizadas para amplificação da região *boxA*, utilizando o *primer A1R* (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3) (Versalovic *et al.* 1994). Colônias isoladas e purificadas foram suspensas em 100 µL de água miliQ e misturadas em vórtex. Para a amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) das regiões genômicas foi utilizado 1 µL da suspensão de células. O volume final da reação foi de 25 µL contendo 1X tampão, 1,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM de dNTP, 1 µM de *primer A1R* e 0,75 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen<sup>TM</sup>). As amplificações foram feitas em termociclador Veriti 96-poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando o programa de ciclos: um ciclo a 96° C por 10 min, 40 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 53° C e 8 min a 65° C; e 16 min a 65° C. O produto amplificado foi observado em gel de agarose 2% a 60 V por 6 h e fotografados com o Sistema KODAK Gel Logic 100 (Eastman Kodak

Company, 2002-2005). Os perfis dos amplicons foram analisados através do software GelCompar II® versão 6.5 (Applied Maths, Bélgica), gerando uma matriz com dados binários, os quais foram submetidos a um agrupamento hierárquico, utilizando Jacard como coeficiente de similaridade, o algoritmo Ward e a distância euclidiana como unidades de medida.

Isolados representativos de cada perfil obtido a partir da técnica de BOX-PCR, ou seja, com padrões de bandas semelhantes, tiveram o seu gene 16S rRNA amplificado para o sequenciamento total. Todos os isolados que não tiveram seu DNA amplificado pela técnica de BOX-PCR, devido a não amplificação da região boxA, também foram selecionados para o e sequenciamento do gene 16S rDNA.

A extração de DNA destinado ao sequenciamento bacteriano foi feita seguindo protocolo de extração de Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Após a extração, o gene 16S rDNA foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') (Furushita *et al.* 2003) e Amp2 (5'-AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA-3') (Wang *et al.* 1993), que geram um *amplicon* com 1500 pb. O volume total da reação foi de 50µL contendo: 1X tampão, 1,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25mM de dNTP, 0,20 µM de *primer* 27F e de *primer* Amp2, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) e 1µL rDNA (200ng/µL). A reação de PCR foi feita em termociclador Veriti 96-poços (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), com o seguinte protocolo de amplificação: uma etapa inicial de desnaturação (94° C por 3 min), seguido por 30 ciclos intermediários (94° C por 1 min, 60° C por 1 min, 72° C por 1 min e 30 s) e uma etapa final de extensão (72° C por 5 min). Após a amplificação, foi feita a análise em gel de agarose (1 %) a 80 V por 1 h 30 min e fotografados utilizando o Sistema KODAK Gel Logic 100 (Eastman Kodak Company, 2002-2005). Os produtos da PCR

foram precipitados com acetato de amônia 7M (NH<sub>4</sub>Ac), etanol absoluto e etanol 70%, e enviados para sequenciamento na empresa Macrogen, Coréia do Sul.

As sequências foram analisadas no programa BLASTn contra a base de dados do NCBI (National Center for Biothenology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)). Para construção da árvore filogenética, as sequências foram alinhadas usando o programa Clustal W (Thompson *et al.* 1994) e a árvore baseada na comparação das sequências foi construída usando o método Neighbor-Joining (Saitou e Nei 1987). A distância evolucionária foi computada usando o método Kimura 2-parâmetros (Kimura 1980) com *bootstrap* de 1000 repetições e a análise filogenética foi conduzida no programa MEGA6 (Tamura *et al.* 2013).

## CARACTERÍSTICAS DO SOLO

Amostras de solo de cada ilha foram coletadas e submetidas a análises físico-químicas. Para a análise granulométrica foi utilizado o Método da Pipeta que consiste na velocidade de queda das partículas que compõem o solo (Embrapa 1997). E para as análises químicas (pH, fósforo e ferro), foi utilizado o método Mehlich (Volkweiss e Raij 1977).

## ÍNDICE DE DIVERSIDADE DE SHANNON-WIENER

Para análises de correlação da diversidade com o tamanho das ilhas e com as características físico-químicas do solo, foi utilizada a correlação de Pearson pelo programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.* 2007). A estimativa da diversidade foi feita através do índice de Shannon-Wiener calculando-se o número de espécies bacterianas (riqueza) obtidos através do sequenciamento do gene 16S rRNA, a abundância relativa e o índice calculado através da fórmula:  $H = -\sum (P_i \ln [ P_i ] )$ , em que  $P_i$  é o número de

indivíduos de cada espécie, dividido pelo número total de indivíduos de todas espécies. A relação entre as espécies detectadas foi avaliada pelo índice de Equitabilidade, utilizando a fórmula:  $E = H / [\ln S]$ , em que S é o número de espécies detectadas e H é o índice de Shannon-Wiener.

## RESULTADOS

### CONTAGEM DO NÚMERO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E EPIFÍTICAS

O número estimado de bactérias endofíticas presente em *D. leptostachya* foi de  $30 \times 10^5$  bactérias /g tecido fresco enquanto que o de bactérias epifíticas foi de  $25,7 \times 10^5$  de bactérias /g tecido fresco. Já em *D. excelsa*, foram contabilizadas  $42 \times 10^7$  bactérias endofíticas e  $84 \times 10^5$  bactérias epifíticas, ambas as espécies vegetais localizadas na Fazenda São João. No Parque Municipal de Piraputangas, contabilizaram-se  $1,45 \times 10^7$  bactérias epifíticas e  $3,98 \times 10^6$  endofíticas associadas a *D. leptostachya* enquanto que foi observada uma população de  $1 \times 10^5$  bactérias epifíticas, porém nenhuma de bactérias endofíticas em *D. meiziana*. No Sítio Arqueológico Lajedo foram observadas  $7,95 \times 10^6$  bactérias endofíticas e  $39 \times 10^7$  epifíticas associadas em *D. leptostachya*, e  $8,2 \times 10^5$  bactérias epifíticas e  $9,9 \times 10^7$  endofíticas em *D. meiziana*. Foram obtidos um total de 39 bactérias endofíticas e 71 bactérias epifíticas que apresentaram diferentes tipos morfológicos. Das 71 bactérias epifíticas, 28 foram isoladas da espécie *D. leptostachya*, 29 isoladas de *D. meiziana* e 14 de *D. excelsa*. Dentre as 39 bactérias endofíticas, 23 foram isoladas de *D. leptostachya*, 14 de *D. meiziana* e duas de *D. excelsa* (Tabela 1).

## CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

A caracterização das bactérias com base na morfologia das colônias permitiu o agrupamento de grupos semelhantes e a visualização da diversidade fenotípica. O dendrograma do agrupamento morfológico mostrou que há maior diversidade de bactérias endofíticas do que epifíticas, mesmo que o número de isolados bacterianos endofíticos tenha sido menor (Figura 1).

As bactérias epifíticas formaram quatro grupos enquanto que as bactérias endofíticas apresentaram cinco grupos sendo que o grupo 3 das bactérias epifíticas e o grupo 4 das endofíticas formaram aqueles que apresentam maior dissimilaridade (Figura 1). Apesar de ter menos grupos entre os isolados epifíticos, ocorreu a formação de mais subgrupos, totalizando 16 subgrupos, com o subgrupo 3 apresentando maior número de isolados e com 100% de similaridade entre si (Figura 1). Dentro dos grupos de bactérias endofíticas foi observado a formação de 11 subgrupos, com o subgrupo 6 apresentando maior número de isolados e também com 100% de similaridade entre si (Figura 1). Os dados morfológicos não são determinantes para observação da real diversidade de organismos epifíticos e endofíticos, entretanto eles mostram a diversidade fenotípica e indicam que há uma diversidade ainda maior ao nível genético para as bactérias isoladas das raízes das plantas em estudo.

## BOX-PCR

As análises genéticas de BOX-PCR foram realizadas em 40% dos isolados, pois alguns dos isolados foram perdidos por contaminação devido ao transporte até o Laboratório Multiusuário da EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica, RJ. Além disso, alguns isolados não apresentaram produto de amplificação por PCR da região boxA.

Os isolados analisados pela técnica de BOX-PCR revelaram mais diversidade dentro dos grupos formados quando comparados às análises morfológicas (Figura 2A e B). A análise dos grupos separadamente mostra que há uma diversidade intragenérica ou mesmo intraespecífica (Figura 3). Por exemplo, os gêneros *Bacillus* e *Lysinibacillus*, representados na Figura 3 pelos isolados ERP05 e ERP10(1), e LRP12(2), MRP10(2) e LRN18(1A), respectivamente, apresentaram padrões de bandas diferentes. De maneira similar, a espécie *Proteus mirabilis*, representados na pelos isolados MRP22(2), ERP01(2), MRP01(2) e LRN18(2), também apresentou padrões de bandas diversificados (Figura 3).

Dos dendrogramas gerados pelo BOX-PCR, que foram diferentes dos gerados pelos dados morfológicos, apenas um subgrupo apresentou 100% de similaridade, que está sendo representado no primeiro gel, pelos isolados LRN19(2) e MRP09 (Figura 2A).

#### SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA

Das 74 sequências analisadas (36 oriundas dos diferentes perfis gerados da região BOX e 38 que não foram amplificadas pela técnica BOX-PCR), 55% foram semelhantes ao gênero *Bacillus*, sendo que 45,5% deles foram semelhantes a *B. thuringiensis* ou *B. mycoides* com 43% de similaridade, 3% foram semelhantes a *B. subtilis* com 41% de similaridade, outros 1,2% semelhantes a *B. amyloliquefaciens* com 65% de similaridade, 1,2% semelhantes a *B. safensis* com 33% de similaridade, 1,2% semelhante a *B. altitudinis* e *B. aerius* com 59% de similaridade com cada espécie, 1,2% semelhante a *B. stratosphericus* com 67% de similaridade e 1,2% semelhante apenas com o gênero *Bacillus* com 100% de similaridade (Figura 4A). Das sequências

restantes, 13% foram semelhantes ao gênero *Alcaligenes* com 100% de similaridade, em que 2,6% foram semelhantes em 29% de similaridade com *Alcaligenes faecalis* (Figura 4B), seguido pelo gênero *Lysinibacillus*, em que 9% dos isolados se assemelharam com o gênero e com as espécies *L. fusiformis* e *L. sphaericus* com 99% de similaridade (Figura 4C). *Paenibacillus* teve 6,4% de representatividade, com 100% de similaridade com o gênero (Figura 4D). E *Proteus* teve 3,8% de representatividade com 100% de semelhança com o gênero (Figura 4E). Os outros gêneros mostrados na árvore tiveram pouca representatividade, de 1 a 3% (Tabela 2; Figura 4).

#### DIVERSIDADE BACTERIANA E ESPÉCIES DE BROMÉLIAS

As análises de relação de diversidade bacteriana com as espécies vegetais foram feitas relacionando o número de espécies de bactérias que ocorreram em cada espécie vegetal dividido pelo número de espécies de bactérias totais que foram identificadas através do sequenciamento do gene 16S rRNA. A Tabela 3 mostra que as três espécies de bromélias apresentaram diferentes médias tanto em relação ao número isolados em nível de gênero, quanto ao número de gêneros encontrados em cada planta. Porém, pode-se observar que a média de *D. leptostachya* (média 4,0) foi maior que as médias das outras duas espécies de bromélias, isso pode ser explicado devido ao número amostrado de plantas dessa espécie, que foi maior em relação às outras espécies, devido à sua ocorrência nas três localidades.

#### DIVERSIDADE BACTERIANA E POPULAÇÕES DE BROMÉLIAS

Os resultados mostraram diferenças nos índices de diversidade de Shannon-Wiener nas três populações estudadas (Tabela 4). O maior índice foi observado na

população do SAL ( $H= 1,63$ ), que, portanto, foi mais diverso que as outras duas populações. Além disso, o SAL teve uma maior Equitabilidade ( $E= 0,54$ ) do que as outras duas populações, mostrando que existe um equilíbrio na distribuição de espécies bacterianas neste local, e que nas populações do PMP e da FSJ existem espécies dominantes, como por exemplo, isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, que foi o mais representativo em todos os locais.

Vale ressaltar que em todos os locais foram amostrados 6 indivíduos de plantas (3 de cada espécie ocorrente), mostrando que a diversidade do local não está sendo influenciada pela amostragem, mas sim pelas características do local, que influenciam diretamente na presença ou ausência de certas espécies de bactérias.

#### DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS COM O TAMANHO INSULAR DAS BROMÉLIAS E COM AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SOLO

Os resultados mostraram que não existe correlação da diversidade de bactérias com o tamanho insular ( $r=0,05$ ). Com relação às características físico-químicas do solo, os resultados mostraram que existe correlação da diversidade com a concentração de ferro, fósforo e argila ( $r= 0,62$ ;  $r=0,78$ ; e  $r=0,68$ , respectivamente). Estes resultados indicam que o aumento na concentração destes componentes do solo pode ter influenciado no aumento da diversidade de bactérias encontradas. O pH, mesmo sendo uma condição que geralmente influencia a diversidade, não mostrou relação com a diversidade de bactérias no presente estudo (Tabela 5).

## DISCUSSÃO

### BIODIVERSIDADE MICROBIANA: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A contagem dos isolados bacterianos variou de  $10^5$  a  $10^7$  por grama de tecido vegetal, nas diferentes espécies de bromélias considerando bactérias epifíticas e endofíticas, respectivamente. Esses números corroboram com os resultados observados em um trabalho feito com bambu, no qual foi obtido de  $10^5$  a  $10^7$  bactérias por grama de tecido vegetal fresco e por grama de solo da rizosfera de bactérias isoladas do rizopiano, da rizosfera e do interior dos tecidos vegetais (Han *et al.* 2009). A contagem também corroborou com trabalhos feitos com espécies cultivadas, como o estudo de Silva *et al.* (2012), com cana-de-açúcar, que encontraram  $10^2$  e  $10^9$  bactérias epifíticas e endofíticas, respectivamente, por grama de tecido vegetal fresco, utilizando o meio TSA. Também semelhantes ao trabalho de Kuklinsky-Sobral *et al.* (2004), que utilizaram o mesmo meio para quantificar e isolar bactérias epifíticas e endofíticas de plantas de soja e observaram a presença de  $10^4$  de bactérias endofíticas a  $10^6$  de epifíticas. E outro trabalho relatou um número de  $10^3$  a  $10^6$  bactérias por grama de tecido vegetal fresco, associadas a plantas saudáveis de *Citrus sinensis* (Trivedi *et al.* 2011).

As análises morfológicas mostraram que há diversidade bacteriana em sistemas radiculares de bromélias, apesar de ter sido utilizado para o isolamento das bactérias, um meio de cultura rico que favorece bactérias de crescimento rápido, o que pode ter impedido o crescimento de bactérias de crescimento lento pelo fato das bactérias de crescimento rápido utilizarem todo o nutriente do meio (Döbereiner *et al.* 1999).

A caracterização morfológica das colônias bacterianas é considerada importante por ser a primeira etapa para estudos de diversidade de populações microbianas e

contribui para uma melhor caracterização da comunidade bacteriana (Neiverth 2012, Lacava *et al.* 2006). Nóbrega *et al.* (2004) relataram alta diversidade fenotípica de bactérias associativas diazotróficas isoladas de áreas reabilitadas de mineração de bauxita.

No entanto, na ecologia microbiana do solo, os dados fenotípicos dos microrganismos podem representar pouca informação devido às interações bióticas e abióticas que ocorrem no ambiente, como por exemplo, a presença de diferentes espécies de microrganismos ainda desconhecidos e das condições edáfico-climáticas (Torsvik e Ovreas 2002). Porém, com o excesso de dados genotípicos disponíveis na literatura, a correlação das características fenotípicas com as genotípicas, facilita no processo de descrição de novos gêneros e espécies bacterianas (Straliotto e Rumjanek 1999).

O índice de Shannon-Weiner foi maior na população do SAL ( $H= 1,63$ ), assim como a Equitabilidade, mostrando que as espécies bacterianas que ocorrem estão distribuídas de modo equilibrado dentro da população. Segundo Roesch *et al.* 2007, o índice de diversidade de Shannon-Weaver indica a diferença na diversidade em espécies de bactérias entre as comunidades, assim como nas espécies bacterianas presentes em determinada região, o que também foi possível ser visualizado no presente trabalho. Porém, o índice não revela a diferenciação genética entre duas comunidades diferentes (Martin 2002), havendo a necessidade do uso das técnicas biomoleculares.

## BIODIVERSIDADE MICROBIANA: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

Através das técnicas de BOX-PCR e sequenciamento, foi observado que a diversidade de bactérias epifíticas e endofíticas associada às raízes de bromélias é ainda

maior, do que apontaram os dados morfológicos. Além disso, as análises genéticas desempenham um papel importante na identificação de gênero e/ou espécie, pois tem uma alta credibilidade no fornecimento dos dados. Análises de genes ribossomais, tais como sequenciamento do gene 16S rDNA, são geralmente utilizados em estudos de taxonomia e filogenia de bactérias, porém há a necessidade de se procurar outras técnicas que poderão preencher as lacunas existentes nos diferentes estudos (Garrity *et al.* 2004). Freitas *et al.* (2007) relata ainda que há a necessidade de se buscar um maior número de marcadores genotípicos que, aliados às características morfológicas, produzam dados mais completos.

Neste estudo também observamos que a associação de dados morfológicos e genéticos é mais eficiente para a obtenção de resultados mais conclusivos em relação à identificação de estirpes e sua diversidade. Observamos a formação de diferentes subgrupos obtidos na análise de BOX-PCR, com apenas um subgrupo contendo bactérias intimamente relacionadas (100% de similaridade) (Figura 2), mostrando também a presença de diferentes padrões de bandas em bactérias do mesmo gênero ou até mesmo da mesma espécie (Figura 3). Os resultados indicaram que a análise da região boxA possibilitou a diferenciação de estirpes, a qual foi, posteriormente, complementada pelas análises de sequenciamento.

O sequenciamento identificou diferentes isolados como pertencentes ao mesmo gênero e/ou espécie. Porém, foi observado que no BOX-PCR isolados identificados como a mesma espécie apresentaram diversidade genética intraespecífica (estirpes). Comparando as análises de sequenciamento e BOX-PCR, Nayak *et al.* (2011) mostraram que a técnica de BOX-PCR corroborou com análises da árvore filogenética e que o sequenciamento, diferente da análise de BOX-PCR, foi incapaz de distinguir estirpes conhecidas dentro de uma espécie e de discriminar isolados ambientais. Além

da utilização para análise de diversidade, a técnica de BOX-PCR serviu também como um “*screening*” para seleção de estirpes para o sequenciamento.

## BIODIVERSIDADE MICROBIANA: IMPORTÂNCIA AMBIENTAL

Nos resultados do sequenciamento, observou-se uma frequência maior (54%) de isolados identificados como *Bacillus* (Tabela 1; Figura 4). Um estudo com bactérias da rizosfera, do rizoplano e endofíticas de Bambu Moso (*Phyllostachys edulis*) também foi registrado grande representatividade para o gênero *Bacillus* (Han *et al.* 2009). Em *Citrus sinensis* o gênero *Bacillus* também se destacou como um dos gêneros mais frequentes em plantas saudáveis (Trivedi *et al.* 2011). Assim como os estudos de diversidade genética em plantas medicinais que mostrou que a maioria dos isolados (59,4%) pertencia à classe Bacilli (Bhore *et al.* 2013).

A coleta dos isolados foi feita em ambientes considerados extremos, com exposição a altas amplitudes térmicas e a desidratação. Neste sentido, as bancadas lateríticas assemelham-se a ambientes áridos, podendo ter sua comunidade bacteriana semelhante a estes ambientes.

Alguns estudos registraram a presença de *Bacillus* em áreas da Caatinga, com a identificação de capacidade de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), produção de Ácido Indolacético (AIA) e Solubilização de Fosfato de Cálcio (SFCa), sendo que o fósforo é considerado um dos nutrientes limitantes para o desenvolvimento de plantas (Fernandes-Júnior *et al.* 2015, Nautiyal 1999). Além das atividades de FBN, AIA e SFCa, as espécies de *Bacillus* podem produzir sideróforos e formar endósporos, bem como serem tolerantes a altas concentrações de zinco e chumbo em ambientes contaminados (Grönemeyer *et al.* 2012, Kavamura 2012, Moura 2014, Ikeda *et al.*

2013), características que indicam a capacidade deste gênero de promover o crescimento vegetal e de atuarem como bioindicadores.

Espécies de *Bacillus* são conhecidas por sobreviverem em regiões áridas que sofrem com pressões de temperatura (Andrew *et al.* 2012). Este dado pode oferecer uma característica determinante para o isolamento das espécies bacteriana descritas neste trabalho, em função das características climáticas da área de estudo.

Outros estudos também mostraram que *Bacillus* pode ser interessante devido o seu potencial na produção de compostos biotecnologicamente valiosos, como enzimas (amilase, celulase e catalase – enzimas hidrolíticas de decomposição) e antimicrobianos, além de atuarem como biocontroladores de nematóides da soja (cisto da soja) e de fungos (Parvathi *et al.* 2009, Araújo *et al.* 2002; Matsuno *et al.* 1992).

O sequenciamento do gene 16S rDNA também revelou a existência um número considerável de isolados pertencentes a *Alcaligenes* (Tabela 1). Existem microrganismos raros na natureza, tais como as espécies de *Alcaligenes*, que são capazes de degradar substâncias poluentes, como os herbicidas, assim, esses microrganismos desempenham papel fundamental no equilíbrio ambiental (Don e Pemberton 1981). O gênero também pode apresentar outras características de suma importância ambiental, como a FBN e a resistência a metais pesados (Roesch *et al.* 2007, Mergeay *et al.* 1985).

Um gênero que foi pouco representativo, com apenas cinco isolados, mas que tem grande importância biotecnológica foi *Paenibacillus*, espécies deste gênero são consideradas candidatas atrativas para aplicações biotecnológicas, devido à presença de características de promoção de crescimento vegetal (Zeigler 2013). Também são considerados candidatos para aplicação de controle biológico em sistemas agrícolas e

florestais, por serem patogênicos para insetos e outros invertebrados, com potencial biopesticida devido à atividade de endonucleases (Grönemeyer *et al.* 2012).

## CONCLUSÕES

O presente estudo revelou a presença de uma diversidade moderada, com relação ao índice de Shannon-Weaver, de bactérias endofíticas e epifíticas associadas às espécies *D. leptostachya*, *D. excelsa* e *D. meiziana*, que foram escolhidas para o isolamento de bactérias. A biodiversidade observada não se correlacionou com o tamanho da ilha de vegetação em que as plantas foram coletadas, tendo relação somente com alguns componentes do solo, como ferro, fósforo e argila. Apesar de o pH geralmente influenciar na presença ou ausência de determinadas espécies bacterianas, não mostrou influência na biodiversidade bacteriana identificada neste estudo.

Observou-se que a maioria dos isolados identificados através do sequenciamento total do gene 16S rDNA, pertenciam ao gênero *Bacillus*, com 54% de representatividade, o que pode ser justificado pelas características do local em que as espécies de bromélias vivem. O sequenciamento resultou na identificação de todos os isolados em nível de gênero, e a técnica de BOX-PCR auxiliou na identificação da diversidade de bactérias isoladas no presente estudo.

## AGRADECIMENTOS

Presto meus agradecimentos às agências de fomento FUNDECT e CAPES, por financiar o projeto e fornecer a bolsa de pós-graduação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambrosini A, Giongo A, Beneduzi A, Cobalchini N, Friedrich L, Passaglia LMP (2007) Bactérias promotoras de crescimento vegetal em *Vriesea gigantea* Gaudchi. (Bromeliaceae). *Revista Brasileira de Biociências* 5(2): 1169-1170.
- Andrew DR, Fitak RR, Munguia-Vega A, Racolta A, Martinson VG, Dontsova K (2012) Abiotic Factors Shape Microbial Diversity in Sonoran Desert Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 7527-7537.
- Araújo FF, Silva JFV, Araújo ASF (2002) Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. *Ciência Rural* 32: 197-202.
- Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AA (2007) Bioestat - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém, PA.
- Bhore SJ, Komathi V, Kandasamy KI (2013) Diversity of endophytic bacteria in medicinally important *Nepenthes* species. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* 4: 431-434.
- Bigarella JJ, Becker RD, Santos GF (2007) Estrutura e origem das paisagens tropicais e subtropicais 2nd edn. Florianópolis: Ed. da UFSC.
- Bonatelli ML (2012) Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não cultivadas do guaranazeiro e o controle de antracnose. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Brasil MS, Baldani JJ, Baldani VLD (2005) Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 29: 179-190.

- Conceição AA, Pirani JR, Meirelles ST (2007) Floristics, structure and soil of insular vegetation in four quartzite-sandstone outcrops of "Chapada Diamantina" northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 30: 641-656.
- Döbereiner J, Andrade VO, Baldani VL (1999) Protocolos para preparo de meios cultura da Embrapa Agrobiologia. Embrapa, Seropédica-RJ.
- Don RH, Pemberton JM (1981) Properties of Six Pesticide Degradation Plasmids Isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology* 145: 681-686.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro Nacional de Pesquisa de Solos (1997) Manual de Métodos de Análise de Solo 2nd edn.
- Fernandes-Júnior PI, Aidar ST, Morgante CV, Gava CAT, Zilli JÉ, Souza LSB, Marinho RCN, Nóbrega RSA, Brasil MS, Seido SL, Martins LMV (2015) The Resurrection Plant *Tripogon spicatus* (Poaceae) harbors a diversity of plant growth promoting bacteria in northeastern Brazilian Caatinga. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 39: 993-1002.
- Fierer N, Lennon JT (2011) The generation and maintenance of diversity in microbial communities. *American Journal of Botany* 98: 439-448.
- Freitas ADS, Vieira CL, Santos CERS, Stamford NP, Lyra MCCP (2007) Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. *Bragantia* 66: 497-504.
- Furushita M, Shiba T, Maeda T, Yahata M, Kaneoka A, Takahashi Y, et al. (2003) Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 5336-5342.
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's manual ® of Systematic Bacteriology. Michigan State University.

- Garrity GM, Holt JG (2001) The road map to the Manual. In: Garrity GM, Boone DR, Castenholz RW (eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology* The Williams & Wilkins/Springer-Verlag, 2nd edn. New York, pp. 119-154.
- Giongo A, Beneduzi A, Gano K, Vargas LK, Utz L, Passaglia LMP (2013) Characterization of plant growth-promoting bacteria inhabiting *Vriesea gigantea* Gaud. and *Tillandsia aeranthos* (Loiseleur) L B Smith (Bromeliaceae). *Biota Neotropica* 13(3): 80-85.
- Grönemeyer JL, Burbano CS, Hurek T, Reinhold-Hurek B (2012) Isolation and characterization of root-associated bacteria from agricultural crops in the Kavango region of Namibia. *Plant Soil* 356: 67-82..
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9.
- Han JG, Xia DL, Li LB, Sun L, Yang K, Zhang LP (2009) Diversity of culturable bacteria isolated from root domains of Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Microbial Ecology* 58: 363-373.
- Hungria M, Chueire LM, Menna P, Bangel EV (2008a) Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCR. Comunicado Técnico, Embrapa, Londrina – PR.
- Hungria M, Menna P, Bangel EV, Barcellos FG et al. (2008b) Identificação das metodologias mais adequadas para a análise da diversidade genética intra e interespecífica em rizóbios. In: RELARE, 14, Bonito, 2008. Programa e resumos s.l.: Embrapa Agropecuária Oeste.
- Ikeda AC, Bassani LL, Adamoski D, Stringari D, Cordeiro VK, Glienke C, Steffens MBR, Hungria M, Galli-Terasawa LV (2013) Morphological and genetic

characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. *Microbial Ecology* 65: 154–160.

Kavamura VN (2012) Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico. Tese Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

Kimura MA (1980) Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide-sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.

Koeuth T, Versalovic J, Lupski JR (1995) Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Research* 5: 408-418.

Kuklinsky-Sobral J (2003) A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.

Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology* 6: 1244-1251.

Kuske CR, Ticknor LO, Miller ME, Dunbar JM, Davis JA, Barns SM, Belnap J (2002) Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1854–1863.

Lacava PT, Andreote FD, Araújo WL, Azevedo JL (2006) Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 637-642.

- Martin AP (2002) Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Applied Environmental Microbiology* 68: 3673-3682.
- Matsuno Y, Ano T, Shoda M (1992) Cloning of a gene responsible production iturin of an antifungal antibiotic iturin with n-C16- $\beta$ - Amino Acid Residue. *The Journal of General and Applied Microbiology* 32: 505-509.
- Menna P, Pereira AA, Bangel EV, Hungria M (2009) Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis* 48: 120-130.
- Mergeay M, Nies D, Schlegel HG, Gerits J, Charles P, Gijsegem FV (1985) *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with Plasmid-Bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology* 162: 328-334.
- Moura AJ (2014) Microrganismos endofíticos associados à planta de ambientes impactados e não impactados pela drenagem ácida de mina de carvão (DAM). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 265-270.
- Nayak BS, Badgley B, Harwood VJ (2011) Comparison of Genotypic and Phylogenetic Relationships of Environmental Enterococcus isolates by BOX-PCR Typing and 16S rRNA Gene Sequencing. *Applied Environmental Microbiology* 77: 5050-5055.
- Neiverth W (2012) Diversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas de solos de diferentes classes e manejos de cultivo. Dissertação de Mestrado, UNIOESTE, Marechal Cândido Rondon.

- Nóbrega RSA, Moreira FMS, Siqueira Lima AS (2004) Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 28: 269-279.
- Okazaki K, Iino T, Kuroda Y, Taguchi K, Takahashi Y, Ohwada T, Tsurumaru H, Okubo T, Minamisawa K, Ikeda S (2014) An Assessment of the Diversity of Culturable Bacteria from Main Root of Sugar Beet. *Microbes and Environments* 29 (2): 220-223.
- Oliveira ALM, Urquiaga S, Baldani JV (2003) Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*.
- Paggi GM, Louzada RB, Ishii IH, Takahasi A, Arruda RO, Lorenz-Lemke AP (2015) Rediscovering *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae) in Mato Grosso do Sul, Brazil: taxonomy, geographic distribution, and notes on leaf anatomy. *Systematic Botany* 40(1): 129-135.
- Parvathi A, Krishna K, Jose J, Joseph N, Nair S (2009) Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 269-275.
- Peixoto Neto PA de S, Azevedo JL, Araújo WL (2003) Microrganismos Endofíticos. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento* 29: 70-84.
- Pott A, Pott VJ (1994) *Plantas do Pantanal*. Embrapa-SPI.
- Reginatto TSC (2008) *Diversidade de bactérias associadas a bromélias do Parque Estadual de Itapuã/RS*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde.

- Rizzini CT (1997) Tratado de Fitogeografia do Brasil. Aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos 2nd edn. Âmbito Cultural Edições Ltda.
- Roesch LFW, Passaglia LMP, Bento FM, Triplett EW, Camargo AO (2007) Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. Revista Brasileira de Ciência do Solo 31: 1367-1380.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406–425.
- Schütz N (2014) *Deuterocohnia meziana* (Bromeliaceae): subspecies classification and the description of the new subspecies *D. meziana* subsp. *vogtii* from northern Paraguay. Phytotaxa 162(1): 18-30.
- Sikora RA, Schäfer K, Dababat AA (2007) Modes of action associated with microbially induced in planta suppression of plant - parasitic nematodes. Australasian Plant Pathology 36: 124–134.
- Silva MO, Freire FJ, Lira Junior MA, Sobral JK, Costa DP, Cadete LL (2012) Isolamento e prospecção de bactérias endofíticas e epifíticas na cana de-açúcar em áreas com e sem cupinicida. Revista Brasileira de Ciência do Solo. 36: 1113–1121.
- Straliootto R, Rumjanek NG (1999) Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB.
- 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.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S (2013) Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *NCBI* 22(22): 4673-80.
- Torsvik V, Ovreas L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 5: 240-245.
- Trivedi P, Spann T, Wang N (2011) Isolation and Characterization of Beneficial Bacteria Associated with Citrus Roots in Florida. *Microbial Ecology* 62: 324–336.
- Van Belkum P (1999) Short sequence repeats in microbial pathogenesis and evolution. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56: 729-734.
- Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cell Biology* 5: 25-40.
- Volkweiss SJ, Raij B. van (1977). Retenção e disponibilidade de fósforo em solos. *In: Simpósio sobre o cerrado: bases para a utilização agropecuária*, 4, 1976, Brasília, São Paulo, EDUSP. Ed. Itatiaia, p.317-32.
- Wang H, Qi M, Cutler AJ (1993) A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Research* 21: 4153-4154.
- Woese CR (1992) Prokaryote systematics: the evolution of a science. In: Ballows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H (eds) *The Prokaryotes*, vol. 1, 2nd edn. Springer-Verlag, New York, pp 3-18.
- Zeigler DR (2013) The Family Paenibacillaceae . *Bacillus Genetic Stock Center*.

LISTA DE LEGENDAS

**Fig. 1** Dendrogramas gerados com o coeficiente de similaridade de Jacard a partir de características morfológicas das colônias isoladas. Epifíticos: LRP02(1) -1; MRP19(2) -2; LRP13 -3; MRP13 -4; LRP02(2A) -5; MRP20- 6; LRP11(2)- 7; LRP06(2) -8; MRP10(1) -9; MRP08 -10; LRP03 -11; MRP17 -12; MRP18 -13; LRP16 -14; LRP05 -15; MRP05 -16; MRP12 -17; MRP18 -18; LRP07 -19; MRP17 -20; LRP19 -21; LRP04 -22; LRP08 -23; LRP15 -24; LRP01(1) -25; LRP12(3) -26; LRP12(1) -27; MRP04 -28; MRP03(2) -29; MRP03(1) -30; ERP02(2) -31; LRP02(3)- 32; ERP03 -33; MRP01(2) -34; ERP01(2) -35; MRP01(1) -36; MRP10(2) -37; MRP03(3) -38; LRP10 -39; LRP06 -40; ERP05 -41; MRP11 -42; LRP11(1) -43; ERP04 -44; MRP22(2) -45; LRP18(1A) -46; RP12(2) -47; MRP21 -48; ERP07 -49; ERP12(2) -50; LRP09 -51; ERP09 -52; MRP02 -53; ERP10(1) -54; LRP06(1) -55; MRP15 -56; MRP13(1) -57; MRP16 -58; MRP09 -59; ERP12(1) -60; ERP08(2B) -61; ERP08(1) -62; MRP22(1) -63; ERP11 -64; ERP08(2A) -65; LRP02(2B) -66; LRP02(4) -67; MRP14(2) -68; MRP19(1) -69; LRP01(2) -70; LRP15(1) -71. Endofíticos: ERN02 -1; LRN16(2) -2; LRN11 -3; LRN04 -4; MRN09 -5; LRN13 -6; LRN12 -7; LRN14 -8; LRN09 -9; MRN02 -10; MRN03 -11; MRN06 -12; MRN12 -13; MRN01(1) -14; MRN01(2) -15; MRN08(2) -16; MRN04(2) -17; MRN04(1) -18; MRN10 -19; MRN07(2) -20; LRN07 -21; LRN21 -22; LRN18(2) -23; LRN15 -24; LRN02 -25; MRN07(1) -26; LRN17 -27; LRN10 -28; LRN19(2) -29; LRN05 -30; LRN06 -31; LRN06(1) -32; LRN03 -33; LRN21(2) -34; LRN16(1) -35; MRN03 -36; ERN01 -37; LRN01 -38; LRN18(1A) -39.

**Fig. 2** Comparação de agrupamentos: **A)** Programa GelCompar II® versão 6.5, utilizando o BOX-PCR como ferramenta para gerar os perfis. **B)** Programa Past versão 2.17, em que as características morfológicas das colônias foram utilizadas como ferramenta. A seta indica os isolados que tiveram 100% de similaridade pela técnica.

**Fig. 3** Dendrograma gerado através do Programa GelCompar II® versão 6.5, em que pode-se observar gênero e espécies que podem ou não pertencer ao mesmo clado.

**Fig. 4** Árvore filogenética construída no Programa MEGA6. **(A)** Bactérias semelhantes com o gênero *Bacillus*; **(B)** Bactérias semelhantes ao gênero *Alcaligenes*; **(C)** Bactérias semelhantes com o gênero *Lysinibacillus*; **(D)** Bactérias semelhantes com o gênero *Paenibacillus*; **(E)** Bactérias semelhantes ao gênero *Proteus*.

Biodiversidade de bactérias associadas a bromélias

**Tabela 1.** Contagem de número de bactérias epifíticas e endofíticas nas diferentes populações de bromélias e número total de isolados bacterianos para cada espécie de bromélia.

Espécies de bromélias	Contagem no SAL epifíticas/endofíticas (x10 <sup>5</sup> )	Contagem no PMP epifíticas/endofítica s (x10 <sup>5</sup> )	Contagem na FSJ epifíticas/endofíticas (x10 <sup>5</sup> )	<b>Total de bactérias epifíticas</b>	<b>Total de bactérias endofíticas</b>
<i>D. excelsa</i>	-	-	84/4200	14	2
<i>D. leptostachya</i>	3900/79,5	145/39,8	25,7/30	28	23
<i>D. meziana</i>	8,2/990	1/0	-	29	14
<b>Total</b>	-	-	-	71	39

**Tabela 2.** Número de isolados identificados por gênero e a similaridade observada na árvore filogenética, utilizando o gene 16S r RNA, que foi analisado pelo programa MEGA6, pelo método Neighbor-Joining.

<b>Gênero</b>	<b>Número de isolados</b>	<b>Similaridade (%)</b>
<i>Bacillus</i>	42	100
<i>Alcaligenes</i>	10	100
<i>Lysinibacillus</i>	7	99
<i>Paenibacillus</i>	5	100
<i>Proteus</i>	3	100
<i>Staphylococcus</i>	2	100
<i>Lactococcus</i>	2	100
<i>Myroides</i>	2	100
<i>Brevundimonas</i>	2	100
<i>Microbacterium</i>	1	100
<i>Brevibacterium</i>	1	100
<b>Total/Média</b>	<b>77</b>	<b>99,9</b>
Análise	pelo programa	MEGA6, pelo método
		Neighbor-Joining.

Biodiversidade de bactérias associadas a bromélias

**Tabela 3.** Número total de bactérias identificados em associação com *D. excelsa*, *D. leptostachya* e *D. meziana*.

Gêneros de bactérias	<i>D. excelsa</i>	<i>D. leptostachya</i>	<i>D. meziana</i>	<b>Total</b>
<i>Alcaligenes</i>	1	2	7	10
<i>Bacillus</i>	6	21	16	43
<i>Brevibacterium</i>	0	1	0	1
<i>Brevundimonas</i>	2	1	0	3
<i>Lactococcus</i>	0	1	0	1
<i>Lysinibacillus</i>	4	4	6	14
<i>Microbacterium</i>	0	2	0	2
<i>Myroides</i>	0	3	0	3
<i>Paenibacillus</i>	0	3	0	3
<i>Proteus</i>	2	5	0	7
<i>Staphylococcus</i>	0	1	1	2
<b>Total</b>	15	44	30	89
<b>Média de isolados*</b>	1,36 c	4,0 a	2,73 b	-
<b>Média de gêneros</b>	0,45	1,0	0,36	-

\* Médias seguidas por letras diferentes são significativamente diferentes pela Análise de Variância de Kruskal-Wallis (5%;  $p = 0,08$ ).

Biodiversidade de bactérias associadas a bromélias

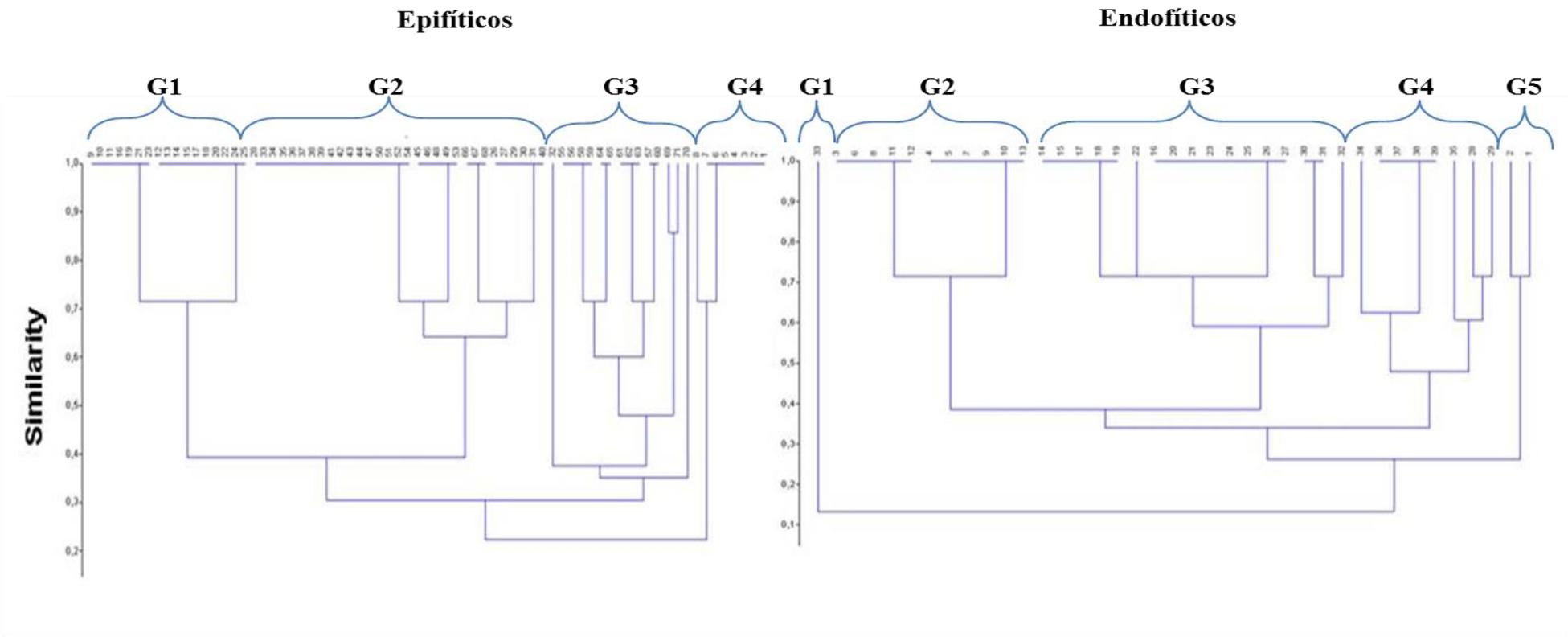
**Tabela 4.** Número de isolados/número de gêneros por espécie de planta nas três populações estudadas.

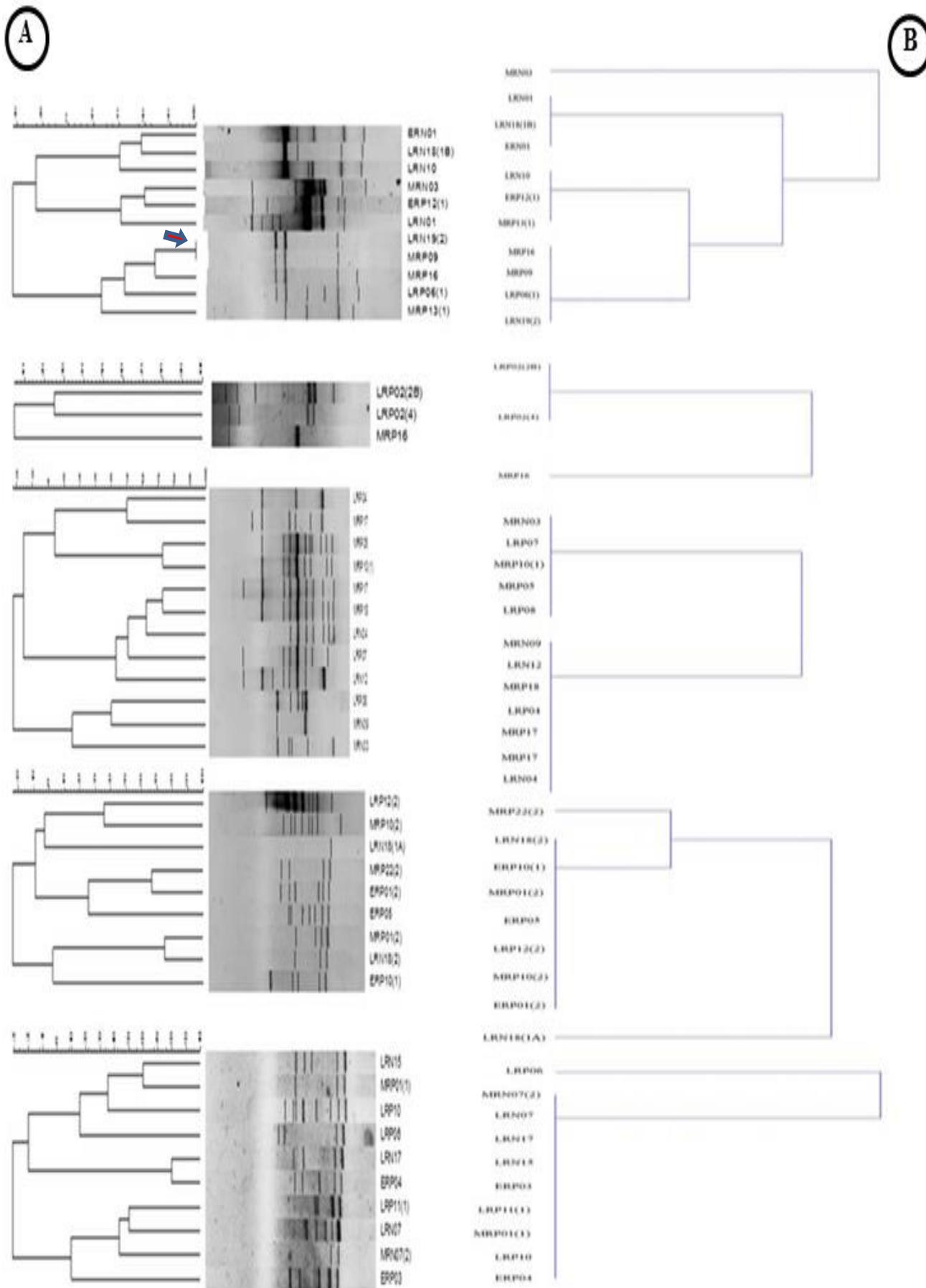
Populações de bromélias	<i>D. excelsa</i>	<i>D. leptostachya</i>	<i>D. meiziana</i>	<b>Total</b>	<b><i>H</i></b>	<b><i>E</i></b>
Fazenda São João	15/5	14/4	-	29/6	1,16	0,43
Parque Municipal de Piraputangas	-	7/3	13/3	20/4	0,94	0,42
Sítio Arqueológico Lajedo	-	23/10	17/4	40/10	1,63	0,54
<b>Total</b>	15/5	44/11	30/4	89/11	-	-
Valores do índice de Shannon-Weaver ( <i>H</i> ) e Equitabilidade ( <i>E</i> ).						

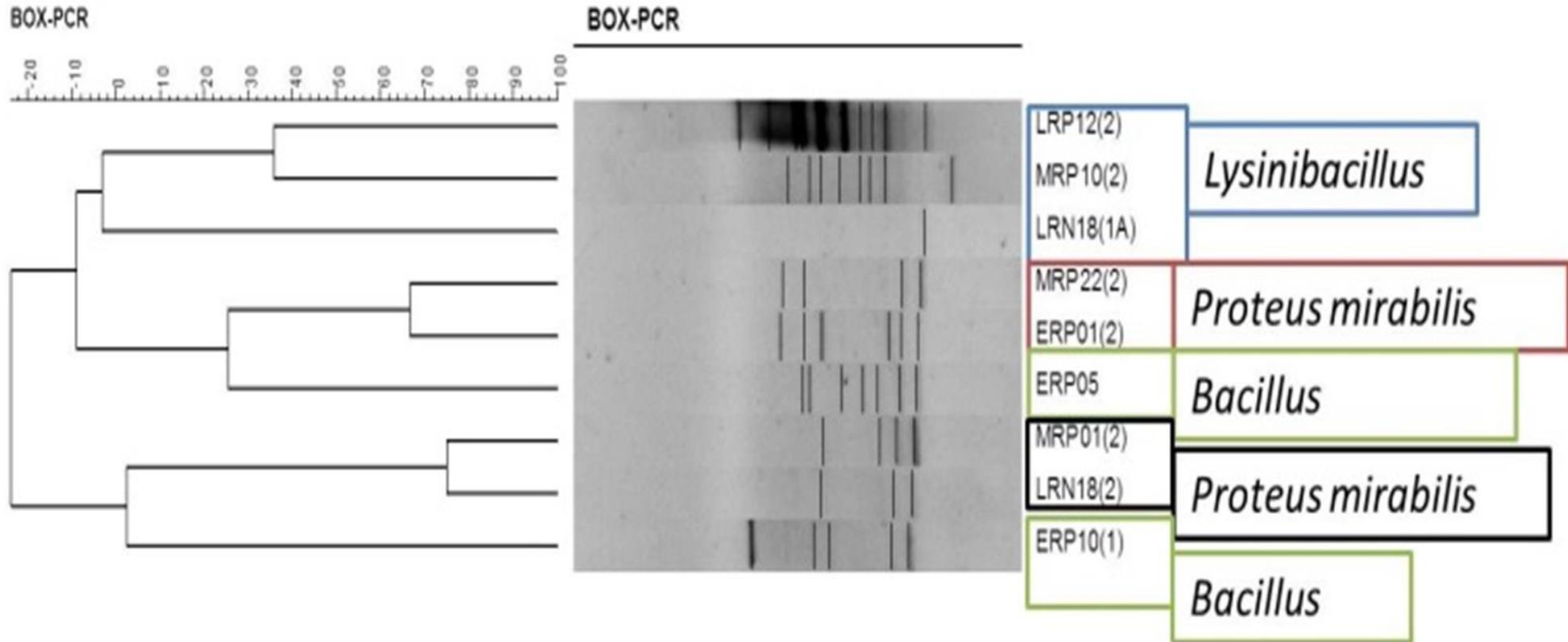
**Tabela 5.** Correlação dos componentes do solo com a diversidade de bactérias isoladas.

<b>Localidade</b>	<b>Ferro</b>	<b>Fósforo</b>	<b>pH</b>	<b>Argila</b>	<b>H</b>
<b>FSJ</b>	106,48	18,7	6,35	11,42	1,16
<b>PMP</b>	231,06	9,84	4,62	12,08	0,94
<b>SAL</b>	329,03	19,36	4,76	12,81	1,63
<b><i>r</i></b>	0,61381695	0,78525117	0,13290811*	0,688107133	-

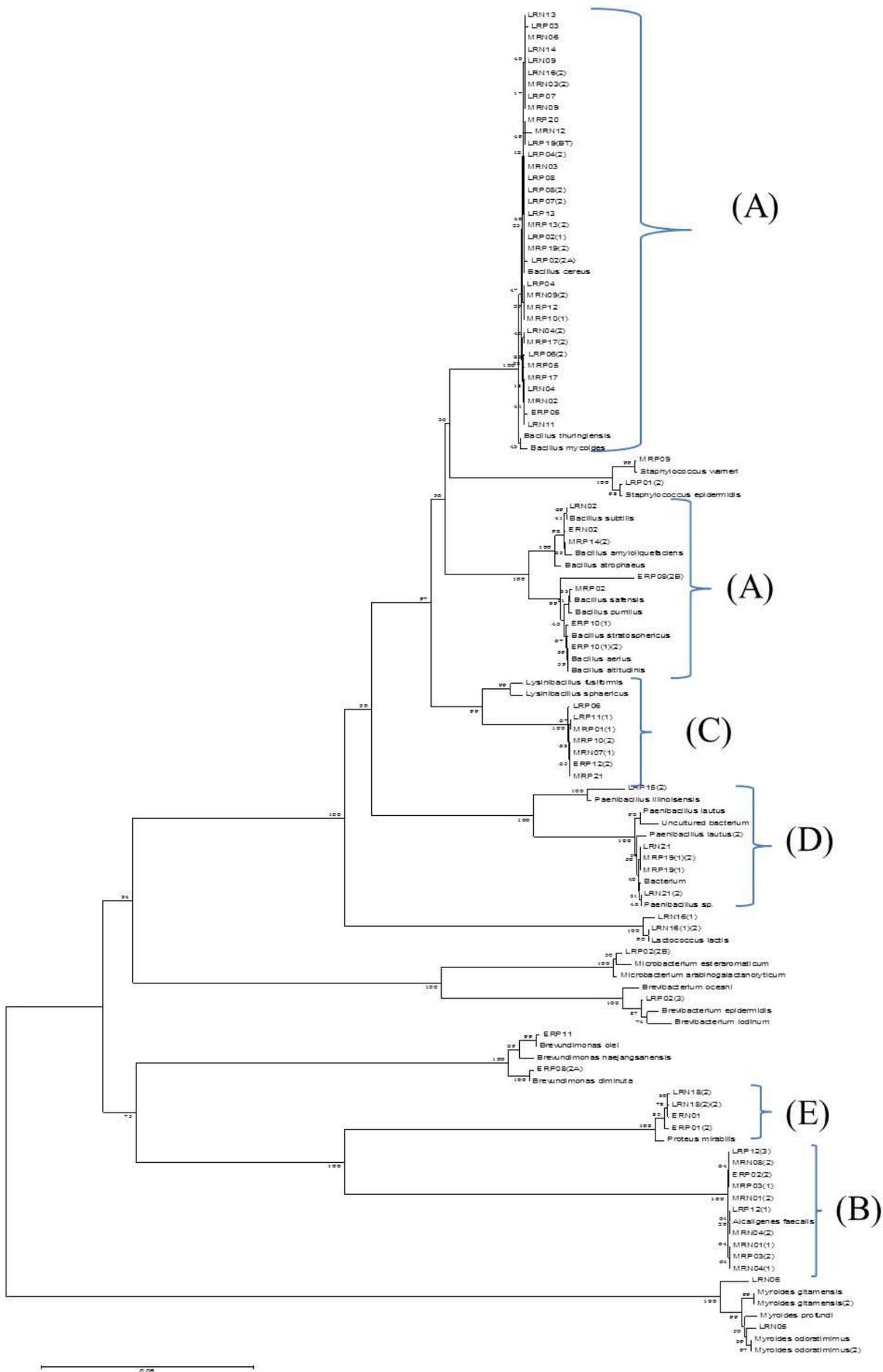
\*não teve correlação.







Biodiversidade de bactérias associadas a bromélias



### **Considerações Finais**

Os resultados do presente trabalho mostraram que existem diversas espécies bacterianas associadas a bromélias e que podem desempenhar papéis importantes dentro de um ecossistema. As técnicas utilizadas foram eficientes na identificação dos isolados, bem como, na verificação da variabilidade intragenérica e interespecífica que consideraram tanto as características morfológicas, quanto as genéticas.

A utilização de várias técnicas que auxiliam na identificação de isolados bacterianos presentes em um determinado local permite inferir a abundância e diversidade destes isolados, possibilitando verificar como está estruturada a comunidade bacteriana.

Os trabalhos relacionados com espécies de plantas silvestres mostram que há uma diversidade bacteriana que possuem potencial que melhoram a saúde e nutrição de plantas. Diante desse pressuposto, há a necessidade de averiguar as propriedades inerentes aos isolados bacterianos obtidos com possibilidades de promover o crescimento vegetal.

Caso os isolados apresentem alguma característica de promoção de crescimento, estes poderão ser utilizados em pesquisas e experimentos de inoculação utilizando espécies de interesse econômico, aproveitando o potencial biotecnológico desses microrganismos.

Anexos



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

**Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico**

Número: 45086-2	Data da Emissão: 08/07/2014 10:51
Dados do titular	
Nome: Thianny Fernanda Carrelo Viana	CPF: 043.480.291-30

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ESPECIE	Dyckia leptostachya, Dyckia excelsa, Deuterocohnia meziana

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 69649117



Página 1/1



RESOLUÇÃO Nº 13, DE 22 DE ABRIL DE 2014.

**O COLEGIADO DE CURSO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL** do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, no uso de suas atribuições, **resolve:**

Art. 1º - Estabelecer critérios para elaboração de dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal conforme seguem:

1. Capa contendo o nome da instituição e do curso de pós-graduação, nome do aluno, título da dissertação, nome do orientador e do coorientador (se houver)
2. Contracapa contendo o nome da instituição e do curso de pós-graduação, nome do aluno, título da dissertação e o seguinte texto: "Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal junto ao Centro de Ciências Biológicas e da Saúde"
3. Dedicatória (opcional)
4. Agradecimentos (obrigatória a inclusão das Agências de Fomento)
5. Resumo e palavras-chave (três)
6. *Abstract* e *keywords*
7. Lista de Figuras e Tabelas (opcional)
8. Lista de Abreviaturas (opcional)
9. Sumário
10. Introdução Geral (citações de acordo com a revista *Brazilian Journal of Botany*)
  - 10.1 Objetivos Gerais e Específicos
  - 10.2 Referências Bibliográficas (de acordo com a revista *Brazilian Journal of Botany*)
11. Artigo(s) em português ou inglês, segundo normas de periódico científico indexado, escolhido pelo aluno e pelo orientador
12. Considerações Finais (opcional)
13. Anexos (opcional)

Aline Pedroso Lorenz Lemke,  
Presidente.