



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LETÍCIA BIANCA PEREIRA

IMPACTO DO ESTRESSE HÍDRICO NA MICROBIOTA
ASSOCIADA A RIZOSFERA DE DIFERENTES VARIEDADES
DE CANA-DE-AÇÚCAR

*IMPACT OF WATER STRESS IN THE MICROBIOTA ASSOCIATED
WITH THE RHIZOSPHERE OF DIFFERENT VARIETIES OF
SUGARCANE*

Campinas

2018

LETÍCIA BIANCA PEREIRA

**IMPACTO DO ESTRESSE HÍDRICO NA MICROBIOTA ASSOCIADA A
RIZOSFERA DE DIFERENTES VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR**

***IMPACT OF WATER STRESS IN THE MICROBIOTA ASSOCIATED WITH THE
RHIZOSPHERE OF DIFFERENT VARIETIES OF SUGARCANE***

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Doutora
em GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR na Área de GENÉTICA DE
MICRO-ORGANISMOS

Thesis presented to the Institute of
Biology of the State University of
Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of
Doctor, in the area of GENETICS AND
MOLECULAR BIOLOGY in the area of
GENETICS OF MICROORGANISMS

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA LETÍCIA BIANCA PEREIRA E
ORIENTADA PELA LAURA MARIA MARISCAL
OTTOBONI.

Orientadora: LAURA MARIA MARISCAL OTTOBONI

Coorientador: RENATO VICENTINI DOS SANTOS

Campinas

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/05929-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P414i Pereira, Leticia Bianca, 1989-
Impacto do estresse hídrico na microbiota associada a rizosfera de diferentes variedades de cana-de-açúcar / Leticia Bianca Pereira. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Laura Maria Mariscal Ottoboni.
Coorientador: Renato Vicentini dos Santos.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Sequenciamento de nova geração. 2. Bioinformática. 3. Rizosfera. 4. Comunidades microbianas. I. Ottoboni, Laura Maria Mariscal, 1955-. II. Vicentini, Renato, 1979-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Impact of water stress in the microbiota associated with the rhizosphere of different varieties of sugarcane

Palavras-chave em inglês:

Next-generation sequence

Bioinformatics

Rhizosphere

Microbial communities

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Valéria Maia Merzel

Fabiana Fantinatti Garboggini

Suzan Pantaroto de Vasconcellos

Edmilson Ricardo Gonçalves

Marcelo Falsarella Carazzolle

Data de defesa: 30-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 30 de agosto de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Valéria Maia Merzel

Profa. Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini

Profa. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos

Prof. Dr. Edmilson Ricardo Gonçalves

Prof. Dr. Marcelo Falsarella Carazzolle

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

À Carmem Nadir Sorato Marchetti

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Tania e Milton, pelo amor incondicional e por fazer de mim o que sou hoje.

Ao meu companheiro Yago por todo carinho, paciência e o apoio nessa caminhada.

A minha amiga Laura, por acompanhar de perto todos os momentos dessa caminhada e ser meu auxílio em vários momentos.

A toda minha família, pelo carinho e pela torcida.

A minha orientadora, Laura Ottoboni, pelas oportunidades que me deu, pela contribuição na minha formação profissional e pela confiança que depositou em mim.

Ao meu co-orientador Renato Vicentini, pelo auxílio e contribuição no meu trabalho.

À Escola de Ciências Naturais da Universidade Nacional da Irlanda-Galway e, especialmente, ao Dr. Alexandre Barretto de Menezes que me acolheu em seu laboratório e se dedicou a contribuir para a minha formação profissional.

A Dra. Silvana Perissatto Meneghin pela valiosa contribuição nesse trabalho.

A Dra. Alexandra Sawaya pelo auxílio nas análises de cromatografia.

Ao Msc. Victor Gambarini, que contribuiu imensamente nesse trabalho e me auxiliou em várias etapas.

A Dra. Camila Carlos, pela amizade e por sempre me ajudar, mesmo à distância, nas análises desse trabalho.

A Silvia Turcinelli, pela amizade e pelo auxílio nas atividades do laboratório.

Aos membros da banca pela contribuição dada ao trabalho.

À UNICAMP, ao CBMEG, à Pós-graduação do instituto de biologia da UNICAMP e a todos os seus funcionários pelo apoio institucional.

Agradeço à FAPESP e CAPES (Processo nº 2014/05929-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP) pelo financiamento da minha bolsa.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira e ao Centro de Ciências Agrárias da UFSCar pelo fornecimento do material vegetal.

Aos profissionais do SAPPE-UNICAMP e ao médico psiquiatra Alceu José Soares Junior, pelo apoio psicológico e pelo carinho pelo qual fui atendida em todas as consultas.

A todos os meus amigos do CBMEG pelo apoio e por tornar essa caminhada mais divertida.

Aos meus amigos da capoeira, pelo axé.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho.

RESUMO

A cana-de-açúcar tem grande importância econômica para o Brasil, principalmente para o Estado de São Paulo, onde se concentra a maior produção dessa cultura. No entanto, a emissão crescente de gás carbônico na atmosfera está ocasionando aumento na temperatura média e diminuição da quantidade de chuvas nas regiões produtoras de cana-de-açúcar. Na rizosfera, as bactérias do solo estão intimamente relacionadas com as plantas e podem promover o crescimento vegetal. Dessa forma, o estudo do efeito das mudanças ambientais na rizosfera de cana-de-açúcar poderá proporcionar novas informações a respeito da interação planta-microbiota e como os micro-organismos poderiam ajudar as plantas a sobreviverem em condições adversas. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do estresse hídrico na microbiota associada a rizosfera de duas variedades (CTC9001 e RB855536) de cana-de-açúcar por sequenciamento do metatranscriptoma. Além disso, a microbiota cultivável da rizosfera da variedade CTC9001 foi isolada e avaliada quanto a capacidade de promover crescimento vegetal. O Capítulo 1 deste trabalho apresentou os resultados do metatranscriptoma da rizosfera associada a variedade de cana-de-açúcar resistente a seca (CTC9001). Os resultados indicaram que a microbiota associada a rizosfera da variedade resistente é dominada principalmente por Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes e que o estresse hídrico provocou alterações nessas comunidades. Uma diminuição na expressão de genes relacionados ao crescimento e ao metabolismo energético ocorreu principalmente nas amostras submetidas a oito dias de estresse hídrico e foram relacionadas com os gêneros *Sorangium* e *Rhodanobacter*. Por outro lado, genes associados a funções celulares como mobilidade por flagelo, adesão celular e degradação de proteínas aumentaram sua expressão em oito dias de estresse hídrico e foram relacionadas ao gênero *Aequorivita*. Esse gênero também apresentou correlação positiva com os ácidos orgânicos exsudados pela planta. O mesmo experimento de estresse hídrico foi conduzido para a microbiota associada a rizosfera da variedade de cana-de-açúcar sensível a seca (RB855536). Assim sendo, o Capítulo 2 apresentou os resultados obtidos da comparação entre a microbiota da rizosfera associada às duas variedades de cana-de-açúcar (resistente x sensível). Esses resultados mostraram que a

microbiota da variedade sensível de cana-de-açúcar apresentou respostas diferentes em comparação aos dados obtidos para a variedade resistente. Essa diferença na resposta da microbiota entre as duas variedades de cana-de-açúcar foi observada mesmo em tempos mais curtos de estresse hídrico (dois dias). A variedade sensível apresentou modificações na expressão de genes associados a proteínas de ligação ao DNA e ao ribossomo, ao longo de todo o período de estresse hídrico avaliado. Nessa variedade, o gênero *Streptomyces* e a família Polyangiaceae apresentaram os maiores valores de expressão gênica aos 12 dias de estresse hídrico, provavelmente devido a capacidade de formarem esporos ou responderem mais rápido as mudanças ambientais. *Streptomyces* também apresentou vários transcritos correlacionados de forma negativa com os ácidos orgânicos exsudados pela planta, os quais podem ter atuado como sinalizadores para mudanças na expressão de alguns de seus genes. Finalmente, os resultados do isolamento de bactérias da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001 foi apresentado no Capítulo 3. As análises revelaram uma grande abundância de bactérias do gênero *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Microbacterium* e *Bacillus*. Muitos isolados apresentaram resultados positivos para a capacidade de crescimento vegetal e crescimento sob estresse hídrico (na presença de PEG), sugerindo que os isolados poderiam ser utilizados como componentes de biofertilizantes comerciais para a agricultura. Testes de crescimento vegetal em plantas de tomate revelaram que o isolado *Pseudomonas* sp. WS02-30 aumentou o comprimento das raízes das plantas, provavelmente devido à sua capacidade de produzir ácido indol acético (IAA) e 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase.

ABSTRACT

Sugarcane is a very important crop for the Brazilian economy, especially for the State of São Paulo, where the largest production of this crop is concentrated. However, the emission of carbon dioxide in the atmosphere is promoting an increase in the average temperature and a decrease in the rainfall in the sugarcane producing regions. In the rhizosphere, soil bacteria are closely related to plants and they can promote plant growth. Thus, the study of the effect of environmental changes on sugarcane rhizosphere could provide new informations about plant-microbiota interaction and how the microorganisms could help plants to survive in adverse conditions. Therefore, the aim of the present work was to evaluate the effect of water stress on the associated-rhizosphere microbiota of two sugarcane varieties (CTC9001 and RB855536) by metatranscriptome sequencing. In addition, the cultivable rhizosphere microbiota of CTC9001 variety was isolated and evaluated for the ability to promote plant growth. Chapter 1 of this work presented the results of rhizosphere metatranscriptome of the dry-resistant sugarcane variety (CTC9001). The results indicated that Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes dominated the bacterial community associated with rhizosphere of the dry-resistant sugarcane variety and that water stress caused changes in these communities. A decrease in the expression of genes related to growth and energy metabolism occurred mainly in the samples submitted to eight days of water stress and were related to the *Sorangium* and *Rhodanobacter* genera. On the other hand, genes associated with functions such as flagella mobility, cell adhesion and protein degradation increased their expression in eight days of water stress and were related to the genus *Aequorivita*. This genus also showed a positive correlation with the organic acids exuded by the plant. The same water stress experiment was performed for the rhizosphere-associated microbiota of the dry-sensitive sugarcane RB855536. Thus, Chapter 2 presented the results obtained from the comparison between the rhizosphere-associated microbiota to the two sugarcane varieties (resistant x sensitive). These results showed that the microbiota of dry-sensitive sugarcane variety presented different responses compared to the data obtained for the resistant one. This difference in microbial response between the two sugarcane varieties was observed even in short times of water stress (two days). The dry-sensitive variety showed changes in the expression of genes

associated with DNA and ribosome binding proteins, throughout the entire period of drought stress evaluated. In this variety, the genus *Streptomyces* and the family Polyangiaceae showed the highest values of gene expression at 12 days of water stress, probably due to the ability to form spores or respond faster to environmental changes. *Streptomyces* also presented several negatively correlated transcripts with organic acids exuded by the plant, which may have acted as signals for changes in the expression of some of its genes. Finally, the results of the isolation of bacteria from CTC9001 sugarcane rhizosphere were presented in Chapter 3. The analyzes revealed a high abundance of *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Microbacterium* and *Bacillus* genera. Many isolates showed positive results for plant growth capacity and growth under water stress (in the presence of PEG), suggesting that the isolates could be used as components of commercial biofertilizers for agriculture. Plant growth tests on tomato plants revealed that the isolate *Pseudomonas* sp. WS02-30 increased the root length of plants, probably due to its ability to produce indole acetic acid (IAA) and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
Mudanças climáticas e o impacto no regime de chuvas	14
Impacto da seca no cultivo de cana-de-açúcar	15
Importância da comunidade microbiana da rizosfera na promoção do crescimento vegetal sob condições normais e de estresse hídrico	16
<i>Produção de fito-hormônios</i>	17
<i>Produção da enzima 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase</i>	18
<i>Disponibilização de fósforo</i>	20
<i>Fixação de nitrogênio</i>	21
Composição e aplicabilidade da comunidade microbiana da rizosfera de cana-de-açúcar	22
OBJETIVOS	24
CAPÍTULO 1 – Respostas da microbiota associada a rizosfera de cana-de-açúcar ao estresse hídrico	
1.1. Introdução	26
1.2. Material e Métodos	27
1.2.1. Ensaio com cana-de-açúcar submetida ao estresse hídrico	27
1.2.2. Coleta de amostras da rizosfera	28
1.2.3. Medidas dos parâmetros morfológicos das plantas	29
1.2.4. Determinação e quantificação de exsudados radiculares	30
1.2.5. Análises estatísticas	31
1.2.6. Isolamento e sequenciamento do RNA	31
1.2.7. Processamento dos dados do metatranscriptoma	32
1.2.8. Análises estatísticas dos dados do metatranscriptoma	34
1.3. Resultados e Discussão	36
1.3.1. Monitoramento da quantidade de água no solo e do crescimento das plantas	36
1.3.2. Composição dos exsudatos radiculares da variedade de cana-de-açúcar CTC9001	39
1.3.3. Avaliação do pipeline para as análises de metatranscriptoma da variedade de cana-de-açúcar CTC9001	43
1.3.4. Composição taxonômica da microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001	46
1.3.5. Composição funcional da microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001	54
1.3.6. Expressão diferencial de genes na microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001 submetida a diferentes tempos de estresse hídrico	57
1.3.7. Perfil de expressão dos genes da microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001	67
1.3.8. Influência dos exsudados radiculares sobre o perfil de expressão gênica da microbiota associada a rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001	72
1.4. Conclusões	78
1.5. Referências Bibliográficas	79

Anexo I	95
Anexo II	96

CAPÍTULO 2 – *Influência da variedade de cana-de-açúcar na microbiota da rizosfera submetida ao estresse hídrico*

2.1. Introdução	98
2.2. Material e Métodos	99
2.2.1. Variedades de cana-de-açúcar utilizadas	99
2.2.2. Ensaio com cana-de-açúcar submetida ao estresse hídrico	100
2.2.3. Análise dos dados	100
2.2.4. Análises estatísticas	101
2.3. Resultados e discussão	102
2.3.1. Monitoramento do crescimento das plantas de cana-de-açúcar RB855536	102
2.3.2. Composição dos exsudatos radiculares da variedade de cana-de-açúcar RB855536 e comparação com a variedade de cana-de-açúcar CTC9001	105
2.3.3. Dados do sequenciamento do metatranscriptoma da rizosfera de cana-de-açúcar RB855536	110
2.3.4. Efeito da variedade de cana-de-açúcar na composição taxonômica da microbiota associada a rizosfera em diferentes condições de estresse hídrico	114
2.3.5. Efeito da variedade de cana-de-açúcar na composição funcional da microbiota associada a rizosfera em diferentes condições de estresse hídrico	119
2.3.6. Influência dos exsudatos radiculares sobre o perfil de expressão da microbiota associada a rizosfera de cana-de-açúcar RB855536	129
2.4. Conclusões	132
2.5. Referências Bibliográficas	133
Anexo I	141
Anexo II	142
Anexo III	143
Anexo IV	144

CAPÍTULO 3 – *Diversidade e promoção do crescimento vegetal por bactérias isoladas da rizosfera de cana-de-açúcar sob diferentes níveis de estresse hídrico*

Abstract	146
Introduction	147
Materials and Methods	148
Sampling of the sugarcane rhizosphere	148
Isolation of bacteria associated with the sugarcane rhizosphere	149
Screening of root-associated bacteria with potential for plant growth promoting activities	149
<i>Indole acetic acid (IAA) production assays</i>	149
<i>ACC deaminase activity assays</i>	149

<i>Bacterial inorganic phosphate solubilization assays</i>	150
<i>Nitrogen fixation assays</i>	150
<i>Osmotolerance assays</i>	150
16S rDNA sequencing-based identification of the isolated bacteria	150
Phylogenetic analysis	151
Plant growth assays	151
Statistical analysis	152
Results and Discussion	152
Cultivable bacterial diversity in the sugarcane rhizosphere samples	152
Plant growth promoting activity of the sugarcane rhizosphere isolates	156
Plant growth promotion activity of the bacterial isolates	160
References	164
Table S1	173
Table S2	174
CONCLUSÕES GERAIS	175
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	177
ANEXO 1	181
ANEXO 2	182

INTRODUÇÃO

Mudanças climáticas e o impacto no regime de chuvas

As mudanças climáticas são alterações no estado do clima, as quais podem ser identificadas (usando testes estatísticos) por modificações na média e/ou na variação das suas propriedades (temperatura, pluviosidade), que persistem durante um longo período de tempo, tipicamente por décadas ou mais. Essas mudanças podem ser devido a alterações naturais do clima ou como resultado da atividade humana. As mudanças climáticas que ocorrem naturalmente são causadas, por exemplo, por alterações na radiação solar, fenômenos vulcânicos e eventos climáticos naturais (El Niño e La Niña). As mudanças climáticas de fonte antropogênica, por sua vez, são causadas pelo aumento da emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa, como o gás carbônico (IPCC, 2007).

Segundo o *Intergovernmental Panel on Climate Change* a emissão global dos gases do efeito estufa devido às atividades humanas vem crescendo desde os tempos pré-industriais (baseado em registros de 1750 a 2011). No entanto, metade dessa emissão ocorreu somente nos últimos 40 anos. Os gases de longa duração emitidos são dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O) e hidrocarbonetos halogenados (um grupo de gases que contêm flúor, cloro ou bromo em sua composição) e são provenientes da queima de combustíveis fósseis, pecuária, atividade industrial, queima de biomassa e desmatamento (IPCC, 2014).

Entre os efeitos causados pelas mudanças climáticas podemos citar a diminuição da camada de gelo e neve no Ártico, a ocorrência de eventos climáticos extremos como furacões e estiagens prolongadas, o aumento da temperatura média e a mudança no regime pluviométrico, causando seca em determinadas regiões e aumento de chuvas em outras (Le Houerou, 1996; Hardy, 2003; IPCC, 2007).

No Brasil, o primeiro Relatório de Avaliação Nacional (RAN1) do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas (PBMC, 2014, atualizado em novembro de 2016) revelou um aumento da temperatura média e alterações no regime pluviométrico brasileiro. Segundo o relatório, é estimada uma diminuição significativa das chuvas em grande parte do território brasileiro no próximo século, aumentando o número de eventos de seca extrema e estiagens prolongadas. Na região do Cerrado, por

exemplo, espera-se um aumento de 1°C na temperatura e uma diminuição de 10% a 20% na precipitação até 2040, o que poderá ocasionar seca em algumas regiões, principalmente no Norte e no Nordeste do país.

Um relatório atual divulgado pelo Ministério do Meio Ambiente, em parceria com o *World Wildlife Fund* (WWF) – Brasil, estima que a região Sudeste também irá apresentar períodos de seca no futuro. Apesar das mudanças previstas nessa região serem menores comparadas com os demais estados brasileiros, essas pequenas variações no clima podem apresentar grandes problemas para o meio ambiente e para a agricultura da região (MMA, 2017).

Impacto da seca no cultivo de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é amplamente conhecida por seu uso na produção de energia, etanol e açúcar, sendo o Brasil o maior produtor mundial. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONABE) é esperado que a cultura de cana-de-açúcar ocupe 8,74 milhões de hectares na safra 2017/18, principalmente no Estado de São Paulo, com uma produção de 635,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (CONABE, 2017).

Devido à grande importância da cultura de cana-de-açúcar no país e sua alta demanda por água, as mudanças no regime de chuvas previstas para os próximos anos podem prejudicar sua produção. No Nordeste brasileiro, por exemplo, a escassez de água nas regiões canavieiras está prejudicando a produção de cana-de-açúcar na região, pois não há umidade suficiente no solo para o desenvolvimento da planta (Inman-Bamber & Smith, 2005; CONABE, 2013; CONABE, 2017).

A capacidade de sobrevivência da cana-de-açúcar em ambientes restritivos em água é bastante variável entre as diferentes variedades comerciais. Assim, um melhor conhecimento da fisiologia e genética das plantas resistentes e susceptíveis pode auxiliar nos programas de melhoramento e seleção de sementes em locais onde há seca. Em variedades resistentes à seca, por exemplo, foi possível observar um aumento na expressão de genes associados à organização celular, metabolismo de proteínas, sinalização celular, transcrição e sistemas antioxidantes, que contribuem para uma resposta eficiente da planta sob situações de estresse e ameniza os efeitos deletérios da seca (Prabu *et al.*, 2011; Boaretto *et al.*, 2014).

Muitos estudos vêm sendo conduzidos para entender os mecanismos de resposta ao estresse hídrico da cana-de-açúcar. No entanto, o desenvolvimento de novas variedades mais resistentes ainda é desafiador e requer longos períodos de estudos, principalmente devido à complexidade genética dessa planta, como o grande número de cromossomos ($2n = 100-130$) e a poliploidia (8-10x). (Kossmann, 2012; Scortecci *et al.*, 2012; De La Fuente *et al.*, 2013). Uma outra abordagem para amenizar os efeitos do estresse hídrico em culturas de cana-de-açúcar é explorar os mecanismos de associação entre essa cultura e os micro-organismos da rizosfera e saber qual é o papel desta comunidade microbiana na saúde e crescimento das plantas. Nesse caso, o estudo dos exsudatos radiculares liberados pelas raízes é importante para compreender a interação planta-micro-organismos (Compant *et al.*, 2010; Mehnaz, 2013; Pieterse, 2016).

Importância da comunidade microbiana da rizosfera na promoção do crescimento vegetal sob condições normais e de estresse hídrico

O termo rizosfera se refere à porção do solo influenciada diretamente pelas raízes das plantas através da liberação de exsudatos radiculares. Esses exsudatos são fontes de nutrientes e vitaminas os quais são utilizados por diferentes bactérias e estimulam o desenvolvimento de comunidades microbianas. As bactérias presentes na rizosfera formam um grupo heterogêneo que podem estar presentes na forma livre no solo, na superfície das raízes ou associadas a elas (endofíticas) (Smalla *et al.*, 2006; Compant *et al.*, 2010).

Fatores como o genótipo da planta e o seu estágio de desenvolvimento influenciam diretamente a comunidade microbiana presente na rizosfera por meio dos exsudatos radiculares, formando uma comunidade com diversidade e características próprias (Chaparro *et al.*, 2013; Cotta *et al.*, 2014). A comunidade microbiana da rizosfera é geralmente menos diversa daquela que está presente no restante do solo devido à capacidade da planta de selecionar os micro-organismos mais apropriados para colonizar sua rizosfera (Berendsen *et al.*, 2012).

Muitas bactérias presentes na rizosfera são conhecidas como bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR, do inglês, *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*). As PGPRs estão ganhando destaque devido aos inúmeros benefícios que promovem nas plantas hospedeiras como maior crescimento, melhor

desenvolvimento e proteção contra patógenos. Dessa forma, é cada vez mais comum a exploração dessas interações benéficas para melhorar a produtividade de plantas comerciais (Pritchard, 2011). Essa exploração tornou-se particularmente importante em situações onde os cultivares sofrem algum tipo de estresse. Situação essa que vem se tornando cada vez mais comum, devido os efeitos das mudanças climáticas. Entre as características mais importantes das PGPRs estão a produção de fito-hormônios, enzimas e disponibilização de nutrientes.

Produção de fito-hormônios

Muitas bactérias presentes na rizosfera são capazes de produzir diferentes hormônios de plantas como auxinas, giberelinas, citoquininas, além de ácido abscísico e etileno. Os fito-hormônios produzidos por bactérias são importantes sinalizadores que regulam diferentes mecanismos das plantas como crescimento, desenvolvimento e defesa contra agentes bióticos e abióticos (Fuentes-Ramirez & Caballero-Mellado, 2006; Ahemad & Kibret, 2013).

Entre as auxinas, o ácido indol acético (IAA) é um dos fito-hormônios mais importante e mais produzido pelas plantas, além disso, ele também é produzido por várias bactérias da rizosfera. O IAA, quando em níveis adequados, é capaz de estimular o crescimento de raízes laterais e adventícias ou promover o alongamento da raiz, o que melhora a captação de nutrientes e água do solo pelas plantas, conferindo maior tolerância à seca (Bal *et al.*, 2012).

Marulanda *et al.* (2009) avaliaram a eficiência das bactérias *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sp.* e *Bacillus megaterium*, isoladas a partir de solos secos, quanto a capacidade de estimular o crescimento em plantas de *Trifolium repens* sob estresse hídrico. A inoculação de cada uma das bactérias aumentou a biomassa e o conteúdo de água, principalmente quando associadas a fungos micorrízicos. Segundo os autores, a produção de IAA pelas bactérias foi responsável pelos resultados obtidos nas plantas testadas. Além disso, *P. putida* e *B. megaterium* também apresentaram tolerância a estresse osmótico devido ao maior conteúdo de prolina, um aminoácido envolvido na adaptação osmótica, no interior das bactérias, necessário quando a diminuição dos teores de água provoca aumento no teor salino do solo.

Bal *et al.* (2012) avaliaram a influência de bactérias produtoras de fito-hormônios no crescimento de raízes de arroz. Todas as bactérias testadas foram

capazes de promover o aumento do comprimento e do peso seco das raízes em até 57% em comparação com a condição controle. Além disso, análises estatísticas revelaram que o alongamento das raízes estava relacionado positivamente com a produção de IAA.

Goswami *et al.* (2014) isolaram bactérias produtoras de IAA da rizosfera de *Suaeda fruticosa*, uma planta comum no deserto salino da Índia. De todos os isolados selecionados, *Bacillus licheniformis* A2 apresentou as características mais proeminentes de promoção de crescimento vegetal *in vitro* e foi testado *in vivo* para promoção de crescimento de amendoim (*Arachis hypogaea*) sob condições de solo salino. Os resultados mostraram um aumento de biomassa fresca, do comprimento total da planta e do comprimento da raiz tanto na presença quanto na ausência de estresse salino.

Abbamondi *et al.* (2016) sugeriram uma relação entre a capacidade de produção de IAA por bactérias isoladas da rizosfera de diferentes variedades de tomates e a estimulação do desenvolvimento de raízes radiculares em *Arabidopsis thaliana*. Ambreetha *et al.* (2018), por sua vez, estudaram o efeito da rizobactéria *Bacillus altitudinis* FD48 (conhecida pela produção de IAA, e outros fito-hormônios) no crescimento de plantas de arroz variedade Co51. Os autores observaram um aumento da concentração de IAA nas raízes das plantas quando inoculadas com *B. altitudinis*, além de um aumento significativo da espessura da raiz e do aparecimento de raízes laterais.

Produção da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase

Em condições de estresse, as plantas modulam a expressão de vários hormônios, os quais induzem a expressão de genes relacionados à proteção da planta contra os efeitos deletérios. Um dos hormônios das plantas que aumenta sua concentração em resposta ao estresse é o etileno. No entanto, quando o nível de etileno se encontra muito elevado, conhecido como etileno de estresse, o crescimento e o desenvolvimento das plantas são prejudicados, causando, por exemplo, desfolhação, inibição do alongamento da raiz e senescência das folhas (Glick, 2007; Singh *et al.*, 2015).

Uma alternativa para reduzir os níveis de etileno nas plantas é inocular bactérias capazes de produzir a enzima ACC deaminase na rizosfera. Essa enzima

utiliza como substrato o ACC, precursor direto do etileno, convertendo-o em α -cetobutirato e amônia. A capacidade dessas bactérias em aliviar os sintomas do estresse nas plantas é conhecida como tolerância sistêmica induzida (Yang *et al.*, 2009; Glick, 2014).

Barnawal *et al.* (2017) isolaram três bactérias a partir de amostras de rizosfera de *Withania somnifera*, uma planta medicinal indiana, capazes de produzir ACC deaminase. Esses isolados (duas do gênero *Pseudomonas* e uma do gênero *Enterobacter*) foram inoculadas em plantas de papoula (*Papaver somniferum*) acometidas por infecção fúngica. Os resultados mostraram que as plantas inoculadas tinham cerca de 50% mais biomassa em comparação com aquelas que não receberam inóculo, além de reduzirem o teor de etileno, diminuindo os efeitos do estresse.

Sarkar *et al.* (2018) isolaram a bactéria *Enterobacter* sp. P23, produtora de ACC deaminase, a partir de amostras de rizosfera de arroz. Essa bactéria foi inoculada em plântulas de arroz em condições normais e sob estresse salino. Os resultados mostraram que, com a inoculação da bactéria, houve uma melhora significativa nos parâmetros morfológicos da parte aérea e da raiz das plântulas, além de uma maior quantidade de clorofila, em ambas as condições testadas. Para correlacionar a produção de ACC deaminase pela bactéria e o crescimento das plântulas, os autores também utilizaram como inóculo uma linhagem de bactéria mutante para o gene *acdS* (codificante para ACC deaminase), incapaz de produzir a enzima. Quando esta linhagem mutante foi inoculada em plântulas de arroz na presença de NaCl, observou-se que a quantidade de etileno produzida era semelhante à das plantas não inoculadas. Isto sugere que a atividade de ACC deaminase da linhagem selvagem *Enterobacter* sp. P23 contribuiu para diminuir a quantidade de etileno nas plantas. Os efeitos no crescimento de plantas de trigo por outras três linhagens de *Enterobacter* sp. produtoras de ACC deaminase foram testadas por Zhang *et al.* (2018). Os resultados mostraram que todas as bactérias promoveram o crescimento das plantas sob estresse hídrico intermediário, e uma delas, teve efeito positivo sob as plantas na condição de seca severa.

Disponibilização de fósforo

O fósforo é um componente essencial para a nutrição das plantas e está presente no solo na forma de fosfatos orgânicos ou na forma inorgânica (precipitado com cátions ou ainda adsorvidos pelas partículas do solo). No entanto, as plantas não são capazes de absorver o fósforo quando estão nessas formas. Por causa dessa baixa disponibilidade de fósforo nos solos, as culturas agrícolas são constantemente suplementadas com fertilizantes fosfatados. Porém, essa prática tem um alto custo financeiro e ambiental, uma vez que esses fertilizantes são obtidos de fontes não renováveis de fósforo (Graham & Vance, 2003). Muitos micro-organismos são capazes de produzir ácidos orgânicos e solubilizar os compostos fosfatados, para que os componentes sejam disponibilizados no solo e utilizados pelas plantas, possibilitando a diminuição do uso de fertilizantes (Marschner *et al.*, 2006).

Anzuay *et al.* (2015) analisaram o efeito da inoculação de 18 bactérias solubilizadoras de fosfato no crescimento do amendoim (*Arachis hypogaea L.*) e na obtenção de fósforo, utilizando um solo com baixo teor desse nutriente. Os resultados obtidos indicaram que a inoculação das bactérias levou a um aumento principalmente na parte aérea das plantas (comprimento e peso seco da parte aérea).

Ortiz *et al.* (2015) avaliaram a capacidade de alguns micro-organismos (em consórcios ou isolados) em melhorar o crescimento de *Trifolium repens* em condições de seca. Entre os isolados testados, a bactéria *Pseudomonas putida* foi avaliada devido a sua alta eficiência em solubilizar fósforo, além de produzir fito-hormônios. Com a inoculação de *P. putida*, juntamente com outros micro-organismos, houve um alongamento das raízes das plantas e maior eficiência em capturar nutrientes e água do solo, dessa forma, a planta foi capaz de se desenvolver mesmo em condições áridas.

Kudoyarova *et al.* (2017) testaram os efeitos das bactérias solubilizadoras de fosfato *Pseudomonas extremaustralis* IB-Ki13-1A e *Paenibacillus illinoisensis* IB-1087 em plantas de trigo. Os autores observaram um aumento da concentração de fósforo nas plantas inoculadas, sugerindo o aumento da capacidade de aquisição eficiente de compostos de fósforo devido a solubilização desse nutriente pelas bactérias estudadas.

Zhang *et al.* (2017) isolaram 13 bactérias a partir de resíduos de cogumelos que foram testadas para a capacidade de solubilização de fósforo e produção de

outros compostos. Os três isolados que apresentaram maior taxa de dissolução de fosfato foram avaliados quanto aos seus efeitos benéficos no crescimento inicial de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. Wanza 15). Os três isolados aumentaram significativamente a matéria seca da parte aérea e a massa seca da raiz. Com base nas comparações da sequência do gene de rRNA 16S as bactérias foram identificadas como *Acinetobacter* (dois isolados) e *Ochrobactrum* (um isolado).

Fixação de nitrogênio

O nitrogênio é um importante macronutriente e é geralmente adicionado ao solo por meio de fertilizantes. O uso de inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico pode aumentar a disponibilidade desse nutriente para a planta e promover a redução do uso de fertilizantes químicos, os quais podem causar sérios problemas ambientais como a contaminação do solo e águas superficiais e subterrâneas (Vargas *et al.*, 2014).

Em leguminosas, a associação simbiótica entre bactérias fixadoras de nitrogênio e as plantas, através de nódulos nas raízes, é amplamente conhecida. No entanto, plantas não leguminosas não possuem esse tipo de associação (Puri *et al.*, 2018). Apenas em 1961, pesquisadores brasileiros reportaram a presença de bactérias diazotróficas em rizosfera de plantas não leguminosas como a cana-de-açúcar (Döbereiner, 1961). Desde então, estudos vêm reportando uma grande diversidade de bactérias capazes de fixar nitrogênio em várias plantas de interesse comercial. Assim sendo, Creus *et al.* (2004) avaliaram o comportamento de plantas de trigo em condições de seca inoculadas com a bactéria fixadora de nitrogênio *Azospirillum brasilense*. Os resultados mostraram um maior teor de água nas plantas inoculadas em relação às plantas controle, além de uma menor perda de rendimento dos grãos. Puri *et al.* (2015) inocularam plantas de canola com a bactéria diazotrófica *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R. Através da determinação do conteúdo do nitrogênio foliar (N e ¹⁵N), foi possível observar que cerca de 20% do nitrogênio teve origem atmosférica nas plantas inoculadas, indicando uma interação planta-bactéria. Pham *et al.* (2017) avaliaram a capacidade da bactéria fixadora de nitrogênio *Pseudomonas stutzeri* A15 em promover o crescimento de plantas de arroz, comparando com o efeito de bactérias mutantes, deficientes em fixação de nitrogênio. Os resultados mostraram um aumento do peso e do comprimento das plantas inoculadas com a linhagem

selvagem, em comparação com a linhagem mutante ou com as plantas não inoculadas, demonstrando que a habilidade de fixar nitrogênio pela rizobactéria pode contribuir para o melhor desenvolvimento da planta hospedeira.

Composição e aplicabilidade da comunidade microbiana da rizosfera de cana-de-açúcar

Devido à importância econômica da cana-de-açúcar, a microbiota associada a esse cultivar tem sido alvo de vários estudos. Sabe-se que a comunidade microbiana associada à rizosfera de cana-de-açúcar é bastante diversa. Nesse ambiente pode ser encontrada grande abundância de Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes e outros filos bacterianos em menor proporção. Essas bactérias podem se relacionar com a planta, de forma benéfica ou não, promovendo crescimento ou causando doenças (Pisa *et al.*, 2011; Mehnaz, 2013).

Entre as bactérias patogênicas, os seis gêneros mais conhecidos são *Acidovorax*, *Herbaspirillum*, *Leifsonia*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, responsáveis por causar diferentes doenças em cana-de-açúcar, ocasionando grandes prejuízos em lavouras em todo o mundo (Mehnaz, 2013). Entre as bactérias benéficas presentes na rizosfera de cana-de-açúcar, podemos citar as fixadoras de nitrogênio como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia* e *Klebsiella*. *Gluconacetobacter* também foi isolada de rizosfera de cana-de-açúcar e, além da capacidade de fixação de nitrogênio, esse gênero também pode produzir fitohormônios. *Pseudomonas* é um gênero bacteriano frequentemente associado à cana-de-açúcar e é conhecido pela capacidade de solubilização de fosfato, produção de hormônios, sideróforos e compostos anti-fúngicos (Tejera *et al.*, 2005; Mehnaz, 2013).

Recentemente, com o advento das novas tecnologias de sequenciamento e obtenção de dados em larga escala foi possível não apenas obter informações mais detalhadas sobre a composição taxonômica, mas também conhecer a função desempenhada pelos micro-organismos associados à cana-de-açúcar. Assim sendo, Lin *et al.* (2013) usou metaproteômica para avaliar as proteínas em solos rizoféricos de cana-de-açúcar e de cana-soca (cana crescida a partir de raízes que sobram no campo após o corte da planta). Os resultados mostraram que as proteínas microbianas que apresentaram diferença na expressão nos dois tipos de cana-de-

açúcar estavam relacionadas com metabolismo de carboidrato e energia, transdução de sinal, transporte de membrana e metabolismo de aminoácidos, indicando que os diferentes tipos de cana-de-açúcar ocasionam uma mudança diferente na atividade da microbiota do solo.

De Souza *et al.* (2016) descreveram a comunidade de bactérias e fungos associados à diferentes ambientes da cana-de-açúcar por sequenciamento parcial do gene de rRNA 16S e ITS (*Internal Transcribed Spacer*), utilizando a plataforma Illumina. Nesse trabalho, a microbiota endofítica e exofítica da raiz, talos e folhas, além da rizosfera e do solo foram avaliadas. Os resultados mostraram que a microbiota associada à cana-de-açúcar se origina de micro-organismos presentes no solo, os quais colonizam a planta já nos primeiros estágios de desenvolvimento. Além disso, a comunidade da rizosfera apresentou maior riqueza de OTUs (*Operational Taxonomic Unit*), com muitos membros pouco estudados como as famílias Chitinophagaceae e Rhodospirillaceae, além de grupos taxonômicos comumente conhecidos por sua capacidade de promoção do crescimento vegetal como, por exemplo, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium* e *Enterobacter*.

O efeito das mudanças climáticas sobre as culturas de cana-de-açúcar no país incentiva a busca de micro-organismos capazes de minimizar os danos do estresse hídrico quando inoculados às plantas. Assim sendo, Vargas *et al.* (2014) estudaram os efeitos da associação da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 e da cana-de-açúcar em condições de seca. Os resultados mostraram que *G. diazotrophicus* PAL5 foi capaz de aumentar a tolerância da planta à seca. A análise dos genes diferencialmente expressos na planta mostra uma inibição de alguns genes envolvidos na sua resposta ao estresse hídrico, uma vez que a bactéria pode estar suavizando o efeito do estresse.

Devido à grande diversidade de bactérias associadas a cana-de-açúcar que ainda é desconhecida e o importante papel econômico dessa cultura para o Brasil, fica claro a necessidade de estudos detalhados das comunidades microbianas presentes na rizosfera dessa planta. Essa importância se deve ao fato de que os micro-organismos podem contribuir para manutenção da saúde das plantas em situações normais ou sob estresse. As técnicas independentes de cultivo, aliadas ao isolamento e a caracterização de micro-organismos da rizosfera da cana-de-açúcar fornecem novas alternativas para amenizar os efeitos das condições adversas sobre o cana-de-açúcar e melhorar sua produtividade.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o impacto do estresse hídrico e da variedade de cana-de-açúcar na microbiota associada à rizosfera. Além disso, o trabalho teve como objetivo isolar e identificar bactérias promotoras de crescimento vegetal presentes na rizosfera de cana-de-açúcar, em condições normais e de estresse hídrico.

Objetivos específicos

- Avaliar o transcriptoma da microbiota associada à rizosfera de diferentes variedades comerciais de cana-de-açúcar (CTC9001 e RB855536) em condições normais e sob estresse hídrico;
- Determinar e quantificar os exsudados radiculares de diferentes variedades comerciais de cana-de-açúcar (CTC9001 e RB855536) em condições normais e sob estresse hídrico;
- Isolar e identificar bactérias promotoras de crescimento vegetal da rizosfera da cana-de-açúcar CTC9001 em condições normais e sob estresse hídrico;
- Caracterizar a produção de compostos de interesse agrônômico nas bactérias isoladas da rizosfera da cana-de-açúcar CTC9001;
- Testar a inoculação de bactérias isoladas da rizosfera da cana-de-açúcar CTC9001 na promoção do crescimento vegetal em plântulas de tomate.

CAPÍTULO 1

RESPOSTAS DA MICROBIOTA ASSOCIADA À RIZOSFERA DE CANA-DE-AÇÚCAR AO ESTRESSE HÍDRICO

1.1. Introdução

Abordagens “meta-ômicas” são comumente utilizadas nos estudos de comunidades microbianas diretamente de amostras ambientais, sem a necessidade de cultivar os micro-organismos. Para isso, são aplicados sequenciamentos em larga escala os quais permitem uma maior abordagem da diversidade e da função dos organismos presentes no ambiente. Nesse sentido, o metatranscriptoma de uma comunidade microbiana consiste no sequenciamento em larga escala do seu RNA (mensageiro e/ou não codantes), fornecendo informações a respeito da expressão gênica dessa comunidade no momento da coleta (Segata *et al.*, 2013; Franzosa *et al.*, 2015).

Os primeiros estudos utilizando abordagem de metatranscriptoma foram realizados em microbiomas de água doce e marinha. Esses estudos demonstraram que, além de obter informações sobre a atividade microbiana, o sequenciamento do RNA produziu uma grande quantidade de novas sequências, incluindo genes com baixo número de cópias. Além disso, o sequenciamento do metatranscriptoma forneceu um meio para detectar e quantificar os vírus de RNA, pouco explorados até o momento (Poretzky *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Gilbert *et al.*, 2008).

Apesar do número crescente de trabalhos utilizando abordagem metatranscriptômica para explorar comunidades microbianas, o uso dessa abordagem ainda enfrenta desafios, principalmente em ambientes com alta complexidade, como o solo. Entre esses desafios podemos citar a grande quantidade de sequências de RNA ribossomal nos dados (independente do enriquecimento de RNA mensageiro) e a montagem *de novo* de dados complexos, os quais podem produzir sequências quimeras ou ambíguas (Stewart *et al.*, 2010; Pignatelli & Moya, 2011, Carvalhais *et al.*, 2013). Dessa forma, os estudos de metatranscriptoma requerem um *pipeline* de bioinformática e estatística confiáveis para converter efetivamente os dados iniciais em informações biologicamente relevantes (Leimena *et al.*, 2013).

Estudos da microbiota da rizosfera utilizando análises de metatranscriptoma já foram previamente aplicados em plantas de aguapé (Luo *et al.*, 2015), milho (Newman *et al.*, 2016), citrus (Zhang *et al.*, 2017), cevada (Baraniya *et al.*, 2017) e salgueiro (Yergeau *et al.*, 2018). Esses estudos visavam avaliar o efeito de contaminantes químicos ou doenças na planta na microbiota associada às raízes. Em cana-de-açúcar, no entanto, estudos do metatranscriptoma da rizosfera em

condições normais e de estresse ainda não foram reportados. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o impacto do estresse hídrico na microbiota associada à rizosfera de cana-de-açúcar, utilizando a abordagem metatranscriptômica.

1.2. Material e Métodos

1.2.1. Ensaios com cana-de-açúcar submetida ao estresse hídrico

O experimento foi conduzido na casa-de-vegetação do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Campinas, São Paulo. Para a realização dos ensaios, foi utilizada a variedade comercial de cana-de-açúcar CTC9001, cedida pelo Centro de Tecnologia Canavieira de Piracicaba, São Paulo. A variedade comercial CTC9001 foi lançada em 2012 e é conhecida pelo seu rápido crescimento e desenvolvimento nas fases iniciais, alta produtividade e tolerância à seca. É estimado um aumento da área de plantio dessa variedade em 8.000 hectares até 2020 (Sesso, 2014; de Souza *et al.*, 2016; Violante, 2016). Nesse trabalho, as amostras provenientes desse cultivar foram identificadas pela letra R (Resistente à seca).

Para o cultivo das plantas em casa de vegetação, foram utilizados vasos de polietileno de 50 litros, com substrato comercial Biomix®. Os valores de pH, condutividade elétrica (CE), macro e micronutrientes do substrato foram determinados pelo Laboratório de Análise de Solo e Planta, do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em duplicata, e são apresentados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros químicos do solo utilizado no experimento. As concentrações estão expressas em mg/L. A condutividade elétrica está expressa em dS/m.

Parâmetros	Média (desvio padrão)
pH	6,7 ($\pm 0,28$)
Condutividade elétrica	1,32 ($\pm 0,09$)
Boro	0,13 (± 0)
Cálcio	137,32 ($\pm 18,07$)
Cloreto	60,17 ($\pm 5,27$)
Cobre	0,01 ($\pm 7e-4$)
Enxofre	132,66 ($\pm 18,42$)
Ferro	0,08 ($\pm 0,02$)
Fósforo	0,56 ($\pm 0,04$)
Magnésio	28,52 ($\pm 0,48$)
Manganês	0,01 ($\pm 8e-6$)
Nitrogênio (Amônia)	7,36 ($\pm 0,50$)
Nitrogênio (Nitrato)	22,77 ($\pm 5,45$)
Potássio	56,96 ($\pm 1,65$)
Sódio	46,17 ($\pm 2,16$)
Zinco	0,007 ($1e-3$)

Um total de 24 plantas de cana-de-açúcar com 100 dias de idade foram mantidas em casa de vegetação com temperatura e fotoperíodo controlados para adaptação sob irrigação duas vezes ao dia, durante duas semanas. As plantas foram, então, submetidas ao estresse hídrico, permanecendo sem irrigação, durante um período de dois (amostras R2d), oito (R8d) e doze (R12d) dias (seis plantas por condição). Seis plantas permaneceram com irrigação normal (R0d) e foram utilizadas como condição controle. Um vaso contendo apenas solo também foi mantido na casa de vegetação sob irrigação normal durante todo o período do experimento.

1.2.2. Coleta de amostras da rizosfera

Das seis plantas utilizadas em cada tratamento de estresse hídrico, quatro foram utilizadas para a coleta de amostras da rizosfera e utilizadas no sequenciamento do metatranscriptoma. Para a coleta das amostras de rizosfera, as plantas foram

retiradas dos vasos e agitadas para a retirada de aglomerações de solo não associados às raízes. O solo ainda aderido às raízes foi retirado por agitação vigorosa em sacos plásticos estéreis, sendo imediatamente congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80°C para a extração dos ácidos nucleicos. O solo não rizosférico (NR) foi coletado na camada 0-10 cm do solo no vaso e também armazenado. Para as medidas de crescimento das plantas e para a coleta dos exsudatos, as seis plantas foram utilizadas.

A umidade do solo, utilizado no experimento em condições irrigadas e sob estresse hídrico (2, 8 e 12 dias), foi calculado com base na massa seca. Um total de 10 g do solo de cada vaso (n = 4) foi amostrado (massa total) e mantido em estufa à 100°C durante 48 horas. Após esse período, as amostras de solo foram pesadas (massa seca) e a porcentagem de água foi calculada conforme a equação:

$$\% \text{ água} = \frac{\text{Massa total} - \text{Massa seca}}{\text{Massa seca}}$$

1.2.3. Medidas dos parâmetros morfológicos das plantas

Após o período do experimento, as plantas foram analisadas quanto ao crescimento e teor de água. Para isso, foram determinadas a altura, largura e comprimento da folha +1, e a porcentagem de matéria seca da parte aérea e da raiz da planta. Para a determinação da porcentagem de matéria seca, foram determinadas a massa fresca (imediatamente após a coleta, M_f) e a massa seca (secas em estufa por 48 h à 70°C, M_s) de cada parte da planta. A porcentagem de matéria seca foi determinada segundo a equação:

$$\% \text{ Matéria seca} = \frac{M_s}{M_f}$$

Para avaliar o teor de água das plantas no momento da coleta, foram calculados o conteúdo relativo de água na folha (CRA), além do teor de água da parte aérea e o teor de água da raiz, ambas com base na massa túrgida. Para a determinação do CRA, discos foliares de 0,5 cm de diâmetro foram pesados imediatamente após a coleta (Massa fresca - M_f), após um período de quatro horas

mergulhados em água destilada (Massa túrgida - M_t) e após secagem em estufa por 48 h à 70°C (Massa seca – M_s). O CRA foi calculado segundo a equação (Abrahão *et al.*, 2014):

$$CRA (\%) = \frac{M_f - M_s}{M_t - M_s} \times 100$$

Para a determinação do teor de água da parte aérea e da raiz das plantas, foram utilizadas as medidas de massa fresca e massa seca (mencionadas acima). O cálculo foi realizado segundo a equação (Guimarães & Stone, 2008):

$$\text{Teor de água (\%)} = \frac{M_f - M_s}{M_f} \times 100$$

1.2.4. Determinação e quantificação de exsudatos radiculares

A composição e quantificação dos exsudatos radiculares foram determinadas segundo Abrahão *et al.* (2014), com modificações. Para isso, segmentos de 10 cm de raiz foram mergulhados em quatro mililitros de água destilada estéril por cinco minutos (com a raiz ainda na planta). As soluções foram imediatamente filtradas em membrana ultrafiltrante de 0,22 μm (Millipore) e congeladas. Os segmentos de raiz foram pesados para determinar a taxa de exsudação de compostos por grama de raiz. As soluções foram encaminhadas para o Departamento de Biologia Vegetal, do Instituto de Biologia da UNICAMP, para a determinação dos exsudatos radiculares por UPLC-MS (*Ultra-high Performance Liquid Chromatography*), Acquity UPLC-TQD (*Waters, Milford, MA, USA*). Os ácidos orgânicos utilizados como padrões nas análises foram: cítrico, isocítrico, láctico, málico, malônico, oxálico, succínico, tartárico, maleico e fumárico. Durante as análises, os ácidos maleico e fumárico não puderam ser separados por apresentarem tempos de retenção similares. Dessa forma, eles serão tratados nesse trabalho como maleico-fumárico.

Os compostos foram separados em uma coluna *Waters Acquity BEH C18* (2,1 x 50 mm) com tamanho de partícula de 1,7 μm a uma temperatura de 30°C. A fase móvel era composta por 0,1% (v / v) de ácido fórmico (fase A) e metanol (fase B)

em água Milli-Q. A taxa de fluxo foi de 0,2 ml min⁻¹ e o volume injetado foi de 10 µl. A eluição foi realizada usando um gradiente que começou com 99% de A, mantido por 2,5 minutos, passando para 50% de A em até 3 minutos e mantendo esta concentração por 4 minutos, retornando as condições iniciais e reequilibrando o sistema em até 6 minutos. Todos os dados foram processados com o programa MassLynxV4 (Waters). A taxa de exsudação foi determinada em unidade de massa do ácido orgânico detectado (em µg) por grama de raiz, por minuto.

1.2.5. Análises estatísticas

Os dados da quantidade relativa de água no solo, das medidas morfológicas das plantas e da composição dos exsudatos radiculares foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965), para determinar se os dados seguem a distribuição normal. Esse teste é necessário para escolher o tipo de análise de variância apropriada para os dados. Assim, os dados morfológicos das plantas e a quantidade relativa de água do solo foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste pareado de Tukey ($p < 0,05$). Os dados da composição dos exsudatos radiculares, por sua vez, foram submetidos à análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952) e ao teste pareado de Mann-Whitney (Fagerland & Sandvik, 2009). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa PAST (Hammer *et al.*, 2001).

1.2.6. Isolamento e sequenciamento do RNA

Para o isolamento dos ácidos nucleicos totais foi utilizado o kit *PowerMax® Soil DNA Isolation* (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, EUA), segundo as especificações do fabricante. Em seguida, as amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen™) para a obtenção do RNA livre de DNA, segundo as especificações do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada no *Qubit* (Invitrogen) e a qualidade do RNA foi verificada em gel desnaturante de agarose. Aproximadamente 2 µg de RNA total de cada amostra foram usados para o 'enriquecimento' do RNA mensageiro bacteriano (mRNA) utilizando o *MICROBExpress™ Bacterial mRNA Enrichment Kit* (Ambion®). Em seguida, as quatro amostras de mRNA foram aleatoriamente

agrupadas em duas amostras (para realizar o sequenciamento em duplicada) e foram armazenadas a -80°C .

A construção das bibliotecas de cDNA, a construção dos *clusters*, a quantificação das bibliotecas em Bioanalyzer e o sequenciamento *paired-end* (2 x 100) na plataforma HiSeq 2500[®] (Illumina, Inc.) foram realizados pelo Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), da UNICAMP. Os dados foram gerados e entregues na extensão “fastq”, o qual contém as sequências de nucleotídeos dos *reads* (sequências curtas de cDNA) e informações da qualidade de cada base.

1.2.7. Processamento dos dados do metatranscriptoma

Para a determinação do protocolo de análise para os dados de metatranscriptoma, diferentes ferramentas foram testadas durante todas as etapas do processamento. Após comparar os diferentes programas, as análises dos dados foram realizadas de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 1.1.

O pré-processamento da qualidade e trimagem dos *reads* foram feitos no programa NGS QC Toolkit (Patel & Jain, 2012). Os *reads* com qualidade Phred menor ou igual a 20 foram removidos dos dados. Além disso, foi permitido um tamanho mínimo de 70 pares de base (pb) para cada *read*. A qualidade final dos dados foi visualizada no programa FastQC toolkit v0.11.5 (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>).

A remoção de sequências contaminantes de RNA ribossomal (rRNA) foi feita utilizando o programa riboPicker (Schmieder *et al.*, 2011). Todos os *reads* foram comparados com o banco de dados “rrnadb”, o qual contém sequências de rRNA 16S, 18S, 23S, 28S, 5S e 5.8S. Foram utilizados os parâmetros *default* do programa (80% de identidade de alinhamento e 50% de cobertura de alinhamento). A filtragem dos *reads* identificados como ribossomais foi realizada para ambos os pares (sequências direta e reversa). Após a filtragem, os arquivos contendo os *reads* complementares foram corrigidos com o programa BBtools (<http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>) para que apresentassem o mesmo número final de *reads*.

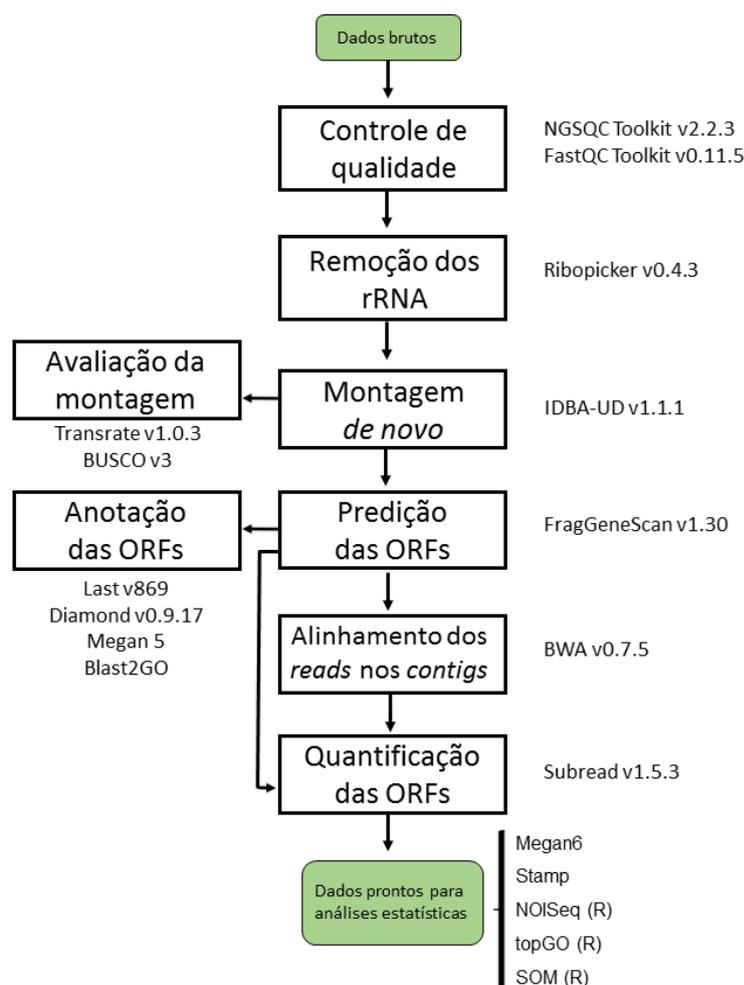


Figura 1.1. Fluxograma mostrando as etapas realizadas nas análises dos dados de metatranscriptoma da rizosfera de cana-de-açúcar (quadros) e os principais programas utilizados em cada etapa (texto). rRNA: RNA ribossomal, ORFs: *Open Read Frames*.

Os *reads* restantes (mRNA) foram reunidos em um único arquivo e montados pela estratégia *de novo* em sequências maiores (*contigs*) no programa IDBA-UD (Peng *et al.*, 2012), utilizando os parâmetros *default* e com interações de 20 a 100 k-mers. Para avaliar a qualidade da montagem, os *contigs* foram examinados pelo programa Transrate v1.0.3 (Smith-Unna *et al.*, 2016) e mapeados contra banco de dados de genes bacterianos do programa BUSCO (Simão *et al.*, 2015). Transrate avalia a montagem *de novo* e o compara com dados experimentais de sequenciamento, reportando dados de tamanho, conteúdo GC, N50 entre outros parâmetros de qualidade. Os bancos de dados do BUSCO contém, para cada grupo taxonômico selecionado, genes presentes em pelo menos 90% das espécies,

permitindo avaliar a composição de genes esperados nos dados de metatranscriptoma. Um grande número de genes mapeados significa uma alta qualidade na montagem *de novo*.

A predição das ORFs foi realizada no programa FragGeneScan (Rho *et al.*, 2010) com a opção para Illumina com uma taxa de erro de 0,5%. O mapeamento dos *reads* nos *contigs* gerados na montagem foi realizada no programa BWA v0.7.5 (Li, 2013), utilizando o algoritmo Bwa-men o qual apresenta maior precisão para *reads* de Illumina entre 70 e 100 pb. Em seguida, o arquivo de coordenadas das ORFs gerado pelo programa FragGeneScan (extensão .gtf) e o arquivo de mapeamento de cada amostra gerados pelo programa BWA (extensão .bam) foram utilizados para determinar a sequência dos transcritos finais e seu valor de expressão (quantidade de *reads* mapeados por transcrito). Essa quantificação foi realizada no programa Subread v1.5.3, utilizando a opção “featureCount” (Liao *et al.*, 2014). Os *reads* que apresentaram mapeamento ambíguo, ou seja, mapearam em mais de um transcrito, foram descartados da contagem.

Para a anotação taxonômica, os transcritos foram alinhados ao banco de dados RefSeq (O'Leary *et al.*, 2016) utilizando o programa Diamond (Buchfink *et al.*, 2015) com opção blastp e parâmetros *default*. Em seguida, os resultados do alinhamento foram analisados utilizando o algoritmo *Lowest Common Ancestor* (LCA) do programa MEGAN6 (Huson *et al.*, 2007) utilizando os seguintes parâmetros: pontuação mínima = 50, *e-value* máximo = 0,001 e *top percent* = 15.

Para a anotação funcional, as sequências dos transcritos com anotação em ortólogos do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomas* (KEGG, Kanehisa & Goto, 2000) e em sistemas funcionais do SEED (Overbeek *et al.*, 2013) foram extraídos do programa MEGAN5 e MEGAN6, respectivamente. Além disso, a anotação em *Gene Ontology* (GO, Ashburner *et al.*, 2000) foi obtida com o programa Blast2Go (www.blast2go.de).

1.2.8. Análises estatísticas dos dados do metatranscriptoma

Para a análise da composição das amostras do metatranscriptoma, os transcritos montados (*contigs*) e os *reads* foram agrupados em diferentes níveis taxonômicos e em categorias do SEED no programa MEGAN6 com a opção “compare”. Em seguida, os dados foram analisados no programa STAMP (Parks &

Beiko, 2015) utilizando o teste estatístico de Welch ($p < 0,05$) e correção de Storey. Nessas análises, a composição taxonômica e funcional das amostras controle (0 dias) foram comparadas com as amostras submetidas ao estresse hídrico (2, 8 e 12 dias).

Para determinar quais transcritos variaram significativamente entre os diferentes tratamentos, o resultado da contagem dos *reads* de cada transcrito foi utilizado para a análise de expressão diferencial no programa R (R Development Core Team, 2011), utilizando o teste não paramétrico do pacote NOISeq (Tarazona *et al.*, 2015). Para a identificação dos genes diferencialmente expressos foram aplicados os valores *default* do NOISeq ($k = 0,5$, $pnr = 0,2$, $nss = 5$, $v = 0,02$, $lc = 1$ e $replicates =$ 'biological'), a normalização por TMM (*Trimmed Mean of M-values*) e valor limiar para significância de 0,95. O valor mínimo da diferença de expressão (expressa em log) foi de dois, o que corresponde a uma diferença de 4x entre as condições comparadas. As análises foram aplicadas para cada par de condições (0 dias x 2 dias, 0 dias x 8 dias, 0 dias x 12 dias, 2 dias x 8 dias, 2 dias x 12 dias e 8 dias x 12 dias).

O enriquecimento de GOs foi realizado para determinar quais das categorias funcionais foram super-representadas nos transcritos que apresentaram expressão diferencial significativa. A análise foi realizada no pacote topGO (Alexa & Rahnenfuhrer, 2016) do programa R (R Development Core Team, 2011), utilizando o teste de Fisher baseado na contagem dos genes. Em seguida, os transcritos com enriquecimento significativo foram visualizados no programa Revigo (Supek *et al.*, 2011).

Para a visualização do padrão de expressão dos transcritos diferencialmente expressos, os dados foram plotados em um gráfico de *heatmap* realizado no programa R (R Development Core Team, 2011). A separação dos transcritos por perfil de expressão ao longo do estresse hídrico foi realizada utilizando a técnica de aprendizado de máquina, denominada *Self-Organising Maps* (Tamayo *et al.*, 1999, SOM). A análise foi realizada no pacote SOM do programa R (R Development Core Team, 2011).

A correlação pareada de Spearman entre os ácidos orgânicos exsudados pelas raízes das plantas e os dados de expressão dos transcritos diferencialmente expressos foi calculada usando o programa PAST (Hammer *et al.*, 2001). As correlações significativas (valores maiores que 0,8 e menores que -0,8, $p < 0,05$) foram analisadas.

1.3. Resultados e Discussão

1.3.1. Monitoramento da quantidade de água no solo e do crescimento das plantas

A umidade do solo foi avaliada para monitorar a progressão do estresse hídrico no solo durante o tempo estabelecido no experimento (Figura 1.2).

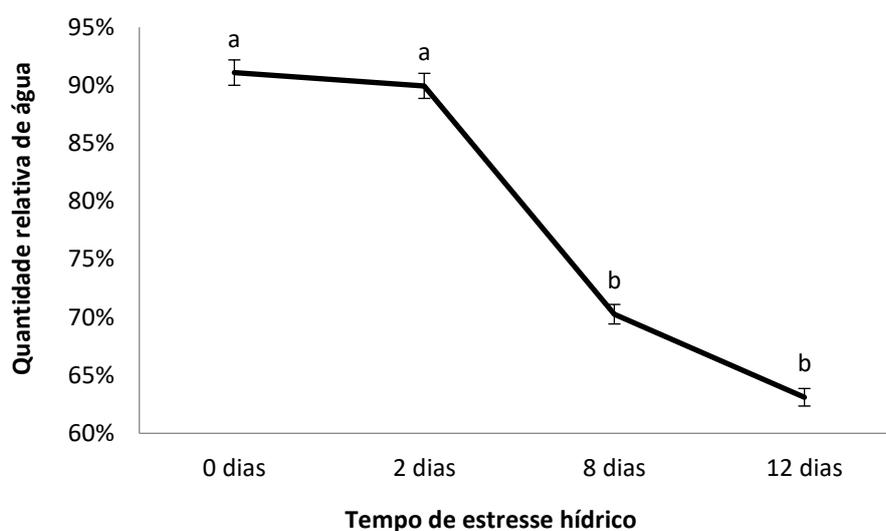


Figura 1.2. Umidade do solo, com base em massa seca, submetido a diferentes tempos de estresse hídrico. Letras diferentes significam diferença significativa a 5% para o teste pareado de Tukey.

Durante o período do experimento, a umidade do solo caiu de 91% (condição controle) para 89,9% quando o mesmo foi submetido a dois dias de estresse hídrico, não apresentando diferença significativa. Com oito dias de estresse hídrico, foi possível observar uma queda significativa da umidade para 70,2% e, finalmente, com 12 dias de estresse, a umidade chegou a 63,1%.

A cana-de-açúcar é constituída por 70% de água, por isso, precisa de uma grande disponibilidade de água para uma boa produção de sacarose. O período em que a cultura apresenta maior exigência de água é durante seu período máximo de crescimento vegetativo, ou seja, primeiros oito meses de vida (Silva & Silva, 2012). Dessa forma, as plantas utilizadas nesse experimento, se encontravam no período mais crítico para a necessidade de água, pois estavam com quatro meses de idade.

Trabalhos recentes mostraram o efeito do estresse hídrico em plantas de cana-de-açúcar em períodos curtos, como os aplicados nesse experimento. Guimarães (2011), por exemplo, avaliou parâmetros relacionados ao conteúdo de clorofila, quantidade de água e crescimento de 20 variedades de cana-de-açúcar em diferentes tempos de estresse hídrico. Nesse trabalho foi possível observar alterações significativas desses parâmetros a partir de 10 dias de restrição hídrica.

O sistema radicular da planta é o primeiro a detectar as mudanças na umidade do solo e sinalizar seus efeitos para os compartimentos aéreos (Wang *et al.*, 2003; Hu & Schmidhalter, 2005). O trabalho de Vantini *et al.* (2015) identificou genes diferencialmente expressos em raízes de duas variedades de cana-de-açúcar, por cDNA-AFLP (*cDNA-amplified fragment length polymorphism*). A maioria dos genes identificados apresentou modificação na expressão nos primeiros dias de seca (um e três dias). Entre eles, estavam muitos genes que codificam proteínas relacionadas ao estresse. Dessa forma, é possível esperar respostas nas plantas de cana-de-açúcar, mesmo em períodos de estresse mais curtos.

As plantas de cana-de-açúcar CTC9001 foram analisadas quanto ao seu crescimento e teor de água quando submetidas a diferentes tempos de estresse hídrico. A Tabela 1.2 mostra os valores médios das medidas realizadas e os valores da análise estatística.

Tabela 1.2. Valores médios e desvio padrão do crescimento das plantas de cana-de-açúcar CTC9001 submetidas a diferentes tempos de estresse hídrico e resultados da análise de variância (ANOVA).

Medidas	R0d	R2d	R8d	R12d	F	Valor de P
Altura (cm)	129,83 (\pm 16,97)	137 (\pm 11,58)	141,17 (\pm 7,36)	133,50 (\pm 4,46)	0,69	0,57
Largura da folha +1 (cm)	2,48 (\pm 0,65)	2,48 (0,78)	2,32 (0,22)	2,55 (0,55)	0,17	0,91
Comprimento da folha +1 (cm)	88,33 (\pm 22,11)	88,83 (\pm 14,80)	89,83 (\pm 15,03)	99,33 (\pm 14,00)	0,57	0,64
Matéria seca - parte aérea (%)	15,29 (\pm 0,75)	17,29 (\pm 1,75)	17,82 (\pm 2,26)	15,93 (\pm 1,33)	3,14	0,05
Matéria seca - raiz (%)	4,75 (\pm 1,48)	5,93 (\pm 1,80)	6,05 (\pm 2,38)	5,92 (\pm 1,60)	0,66	0,59
Teor de água - parte aérea (%)	84,71 (\pm 0,76)	82,71 (\pm 1,75)	82,18 (\pm 2,26)	84,07 (\pm 1,33)	3,14	0,05
Teor de água - raiz (%)	95,25 (\pm 1,48)	94,07 (\pm 1,80)	93,95 (\pm 2,38)	94,08 (\pm 1,60)	0,66	0,59
CRA ¹ (%)	63,01 (\pm 19,98)	69,50 (\pm 27,08)	78,49 (\pm 10,35)	67,46 (\pm 19,07)	1,34	0,29

¹: Conteúdo Relativo de Água (folha)

As plantas não apresentaram diferença significativa em nenhum parâmetro morfológico nos tempos de estresse hídrico avaliados. Isso é explicado pelo fato de a variedade CTC9001 ser resistente a condições de restrição hídrica, sendo indicada para plantio em locais onde há baixa disponibilidade de água para irrigação, como no cerrado (Sesso, 2014, de Souza *et al.*, 2016, Violante, 2016). Estudos demonstraram seu maior crescimento e produtividade em ambientes restritivos de água quando comparada com outras variedades comerciais (Sesso, 2014, Violante, 2016). Dessa forma, foi possível observar que, mesmo com a diminuição da umidade do solo, as plantas dessa variedade mantiveram seu crescimento normal, confirmando sua resistência à seca. No entanto, para sobreviver e manter seu crescimento normal durante períodos de restrição hídrica, as plantas podem promover mudanças fisiológicas, as quais podem afetar as raízes e a liberação de diferentes compostos para a rizosfera (Chaparro *et al.*, 2012).

1.3.2. Composição dos exsudatos radiculares da variedade de cana-de-açúcar CTC9001

A Tabela 1.3 mostra a composição e a taxa de exsudação radicular dos ácidos orgânicos da variedade de cana-de-açúcar CTC9001. Os ácidos orgânicos exsudados pela raiz em maior quantidade foram o ácido cítrico e málico. Os ácidos isocítrico, maleico-fumárico e succínico foram detectados em menor quantidade enquanto que ácido malônico não foi detectado nas análises. O ácido láctico foi detectado em um baixo número de réplicas por tratamento ($n < 3$), por isso não foi realizado análise estatística para esse composto.

Tabela 1.3. Valores médios e desvio padrão da taxa de exsudação dos ácidos orgânicos pelas raízes de cana-de-açúcar CTC9001. Os valores são expressos em $\mu\text{g.g de raiz}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Ácido orgânico	R0d	R2d	R8d	R12d	Chi ²	Valor de P
Cítrico	6,56 (\pm 1,95)	2,88 (\pm 1,50)	11,24 (\pm 4,40)	21,8 (\pm 11,3)	12,86	0,005*
Isocítrico	0,37 (\pm 0,06)	0,13 (\pm 0,03)	0,79 (\pm 0,14)	4,16 (\pm 2,22)	10,08	0,018*
Lático ¹	0,87 (\pm 0,07)	2,32 (\pm 1,31)	11,52 (\pm 1,77)	0,19 (\pm 0)	ND	ND
Maleico-Fumárico	0,49 (\pm 0,10)	0,25 (\pm 0,14)	0,59 (\pm 0,24)	1,18 (\pm 0,90)	5,35	0,148
Málico	9,39 (\pm 1,39)	3,04 (\pm 0,84)	17,26 (\pm 2,46)	51,35 (\pm 19,26)	12,53	0,023*
Succínico	1,22 (\pm 0,08)	0,78 (\pm 0,53)	1,39 (\pm 0,46)	1,06 (\pm 0,86)	2,18	0,534
Malônico ¹	ND	ND	ND	ND	ND	ND

¹ Análise estatística não realizada ($n < 3$)

ND: não determinado

* Significância estatística a 5%

Os ácidos cítrico e málico são comumente encontrados em altas taxas de exsudação em cultivares como tomate (Kamilova *et al.*, 2006), arroz (Zeng *et al.*, 2008) e cactos (Abrahão *et al.*, 2014), tanto em condições normais quanto em situações de estresse. Um exemplo de uma interação planta-micro-organismos determinado pela liberação desses ácidos orgânicos foi reportada no trabalho de Zhang *et al.* (2014). Os autores avaliaram a resposta das bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 e de *Bacillus subtilis* N11 à presença de ácidos orgânicos da rizosfera de pepino e banana, respectivamente. Os autores observaram que a presença do ácido cítrico, na concentração de 25 a 50 μM , foi capaz de atrair as duas bactérias para a rizosfera, além de estimular a formação de biofilme da bactéria *B. amyloliquefaciens* SQR9. O ácido málico, por sua vez, também foi capaz de atrair as bactérias para a colonização da rizosfera das plantas estudadas, quando utilizado nas mesmas concentrações do ácido cítrico. Ambas as bactérias são capazes de evitar a colonização de fungos patogênicos nas plantas e, portanto, a presença delas na rizosfera pode ser vantajosa para as plantas hospedeiras.

A variedade CTC9001 apresentou diferenças significativas para a taxa de exsudação do ácido cítrico, málico e isocítrico, quando as plantas foram submetidas a diferentes tempos de estresse hídrico. A exsudação desses três ácidos nas raízes diminuiu nas plantas submetidas a dois dias de estresse hídrico. No entanto, à medida que o estresse hídrico aumentou, a exsudação dos ácidos foi maior, resultando em valores significativamente maiores no tratamento de doze dias de estresse hídrico. Song *et al.* (2012) investigaram a influência do estresse hídrico na exsudação de ácidos orgânicos em milho resistente (*Baidan 9*) e susceptível à seca (*Baidan 31*), utilizando ensaios hidropônicos com três níveis de estresse osmótico: 0, 10 e 30% de PEG. Os resultados revelaram que o estresse osmótico aumentou a concentração de ácidos orgânicos (ácidos málico, láctico, acético, succínico, cítrico e maleico) nos exsudados radiculares de ambas às variedades. No entanto, em condições de estresse mais severo, a variedade resistente à seca apresentou uma exsudação maior de ácido málico, cítrico, acético, maleico e succínico, sugerindo que o aumento dos ácidos orgânicos exsudados na rizosfera pode contribuir para a tolerância à seca.

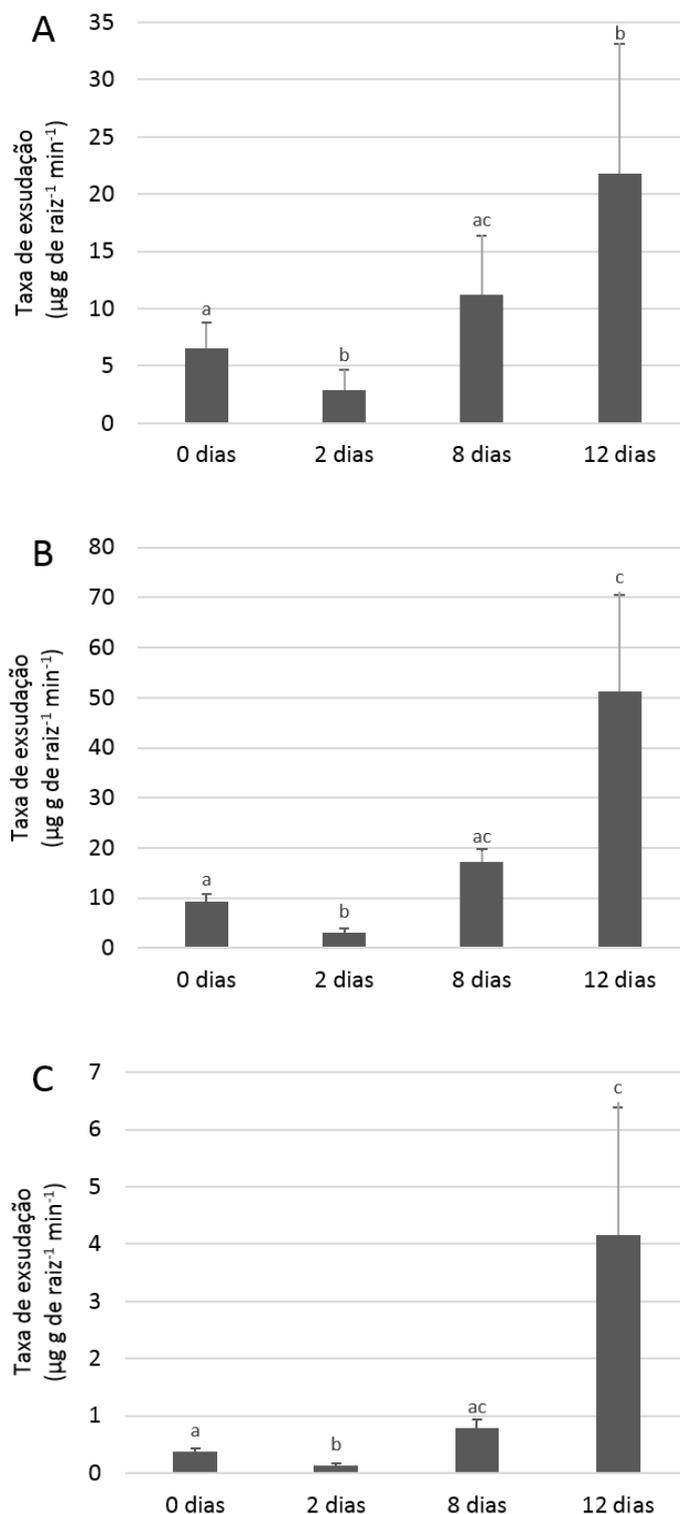


Figura 1.3. Média da taxa de exsudação do ácido cítrico (A), málico (B) e isocítrico (C) nas raízes de cana-de-açúcar da variedade CTC9001 que apresentaram diferenças significativas (Mann-Whitney, $p < 0,05$) entre os diferentes tempos de estresse hídrico.

Os dados de exsudação dos ácidos orgânicos foram correlacionados com os dados do metatranscriptoma da rizosfera da cana-de-açúcar para avaliar o efeito desses ácidos na atividade das bactérias da rizosfera durante o estresse hídrico. Os resultados são apresentados na sessão 1.3.8 desse capítulo.

1.3.3. Avaliação do pipeline para as análises de metatranscriptoma da variedade de cana-de-açúcar CTC9001

Para a análise do metatranscriptoma da rizosfera da cana-de-açúcar CTC9001, um total de dez bibliotecas foi sequenciado (duas bibliotecas por condição). A Tabela 1.4 mostra os resultados do sequenciamento na plataforma Illumina HiSeq.

O sequenciamento das bibliotecas da variedade de cana-de-açúcar CTC9001 gerou aproximadamente 347 milhões de pares de *reads* brutos. Uma das amostras de solo não rizosférico (NR-2) gerou uma baixa quantidade de pares de *reads* com qualidade aceitável, o que resultou em uma quantidade de *reads* finais muito baixa em relação às demais amostras. Dessa forma, essa biblioteca foi descartada e não foi utilizada na etapa de montagem *de novo* dos *contigs*.

As amostras submetidas a oito dias de estresse hídrico apresentaram os menores valores de qualidade, porém, como o número de *reads* iniciais foi maior que as demais amostras, foi possível obter uma grande quantidade de *reads* com boa qualidade, mesmo após a filtragem. O restante das amostras apresentou boa qualidade nos dados do sequenciamento (92,7 a 96,3% dos *reads* mantidos após a filtragem). A porcentagem de rRNA variou de 36 a 77% entre as bibliotecas, aproximadamente, restando um total de 67,5 milhões de *reads* de mRNA finais.

Tabela 1.4. Dados do sequenciamento do metatranscriptoma das amostras da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001. Os dados das sequencias são apresentados em pares de *reads* (PR).

Amostra	Número PR		% PR		Número PR final
	inicial	trimados	trimados	rRNA	
NR*-1	30.825.567	29.668.257	96,25	22.585.544	4.518.554
NR-2	21.260.830	8.184.476	38,50	9.477	690.499
R0d-1	21.157.956	20.228.322	95,61	14.809.099	4.177.153
R0d-2	31.611.155	30.438.696	96,29	23.587.928	4.084.015
R2d-1	20.994.459	20.225.830	96,34	15.623.393	2.874.352
R2d-2	30.346.136	28.401.125	93,59	15.841.622	10.948.107
R8d-1	74.928.514	31.869.886	42,53	98.632	8.174.984
R8d-2	61.877.643	43.272.666	69,93	1.527.743	8.295.280
R12d-1	32.842.412	30.452.909	92,72	11.140.091	18.198.896
R12d-2	21.764.254	20.774.361	95,45	13.813.556	5.600.995
Total	347.608.926	263.516.635	75,81	119.037.085	67.502.835

*Não rizosférico

A montagem *de novo* dos *reads* utilizando o programa IDBA-UD (Peng *et al.*, 2012) resultou em 316.958 *contigs* os quais apresentaram um tamanho entre 200 a 18.993 pares de base (pb), com um tamanho médio de 613 pb. Todos os 148 genes bacterianos presentes no banco de dados do programa BUSCO (Simão *et al.*, 2015) foram encontrados nas sequências montadas. Para Proteobacteria e Actinobacteria (filos abundantes em amostras de solo), foram encontrados 220 (99,5% dos genes esperados) e 336 (95.5% dos genes esperados) genes, respectivamente (Figura 1.4). Dessa forma, foi possível confirmar que a estratégia de montagem *de novo* para os dados de metatranscriptoma de rizosfera de cana-de-açúcar foi satisfatória. O programa FragGeneScan (Rho *et al.*, 2010) detectou 405.350 transcritos, os quais variaram entre 66 e 9.422 pb (média de 414 pb).

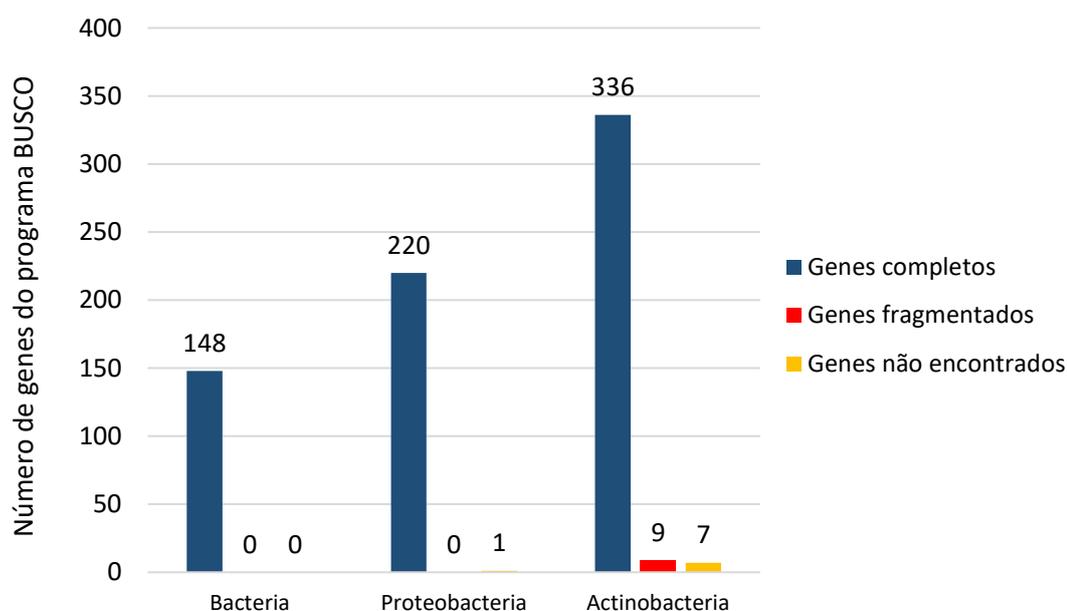


Figura 1.4. Número de genes do programa BUSCO encontrados nos *contigs* do reino Bacteria e dos filos Proteobacteria e Actinobacteria presentes no metatranscriptoma da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001.

A proporção de *reads* mapeados nos transcritos variou de 36,8 a 57,4%. Esse valor se deve ao fato de ter sido utilizado apenas aqueles *reads* que apresentaram mapeamento único (ou seja, em um único transcrito), enquanto que, os *reads* que mapearam em dois ou mais transcritos foram descartados. Resultados semelhantes foram obtidos por Zhang *et al.* (2017) que avaliaram o metatranscriptoma

de rizosfera e rizoplano de citrus e encontraram uma proporção de *reads* mapeados de 19 a 44%.

A avaliação da qualidade dos *reads* e da montagem *de novo* mostrou-se satisfatória para os dados do metatranscriptoma da rizosfera de cana-de-açúcar. Os transcritos presentes apenas na amostra de solo não rizosférico (total de 24.715) foram removidos das análises a fim de se comparar apenas os transcritos detectados em amostras de rizosfera. Dessa forma, os dados de abundância e expressão foram utilizados para avaliar a diversidade e a dinâmica funcional da microbiota da rizosfera ao longo do estresse hídrico.

1.3.4. Anotação taxonômica da microbiota metabolicamente ativa da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001

Um total de 298.726 (73,7%) dos transcritos foram anotados em algum nível taxonômico. A anotação taxonômica revelou que a microbiota associada a rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001 é dominada pelos filos Proteobacteria (52,2%), Actinobacteria (15,1%) e Bacteroidetes (10,6%). Esses filos foram previamente reportados em grande abundância em rizosfera de *Arabidopsis* sp. (Chaparro *et al.*, 2014), citros (Zhang *et al.*, 2017) além de diferentes variedades de cana-de-açúcar (Pisa *et al.*, 2011; da Costa *et al.*, 2014). A Figura 1.5 mostra as famílias mais abundantes encontradas nesses três filos.

Entre as famílias mais abundantes de Proteobacteria, a maioria estão associadas a promoção de crescimento vegetal devido a produção de fito-hormônios e fixação de nitrogênio. Entre essas famílias estão Xanthomonadaceae, Hyphomicrobiaceae, Phyllobacteriaceae, Sphingomonadaceae, Rhodospirillaceae e Bradyrhizobiaceae (Mendes *et al.*, 2012; Baldani *et al.*, 2014; Glaeser & Kämpfer, 2014; Oren & Xu, 2014; Willems, 2014; Li *et al.*, 2015). As famílias Polyangiaceae e Rhodanobacteraceae, por sua vez, são conhecidas pela capacidade de degradar compostos ligno-celulósicos, abundantes em cana-de-açúcar (Garcia & Müller, 2014; Desiderato, 2017).

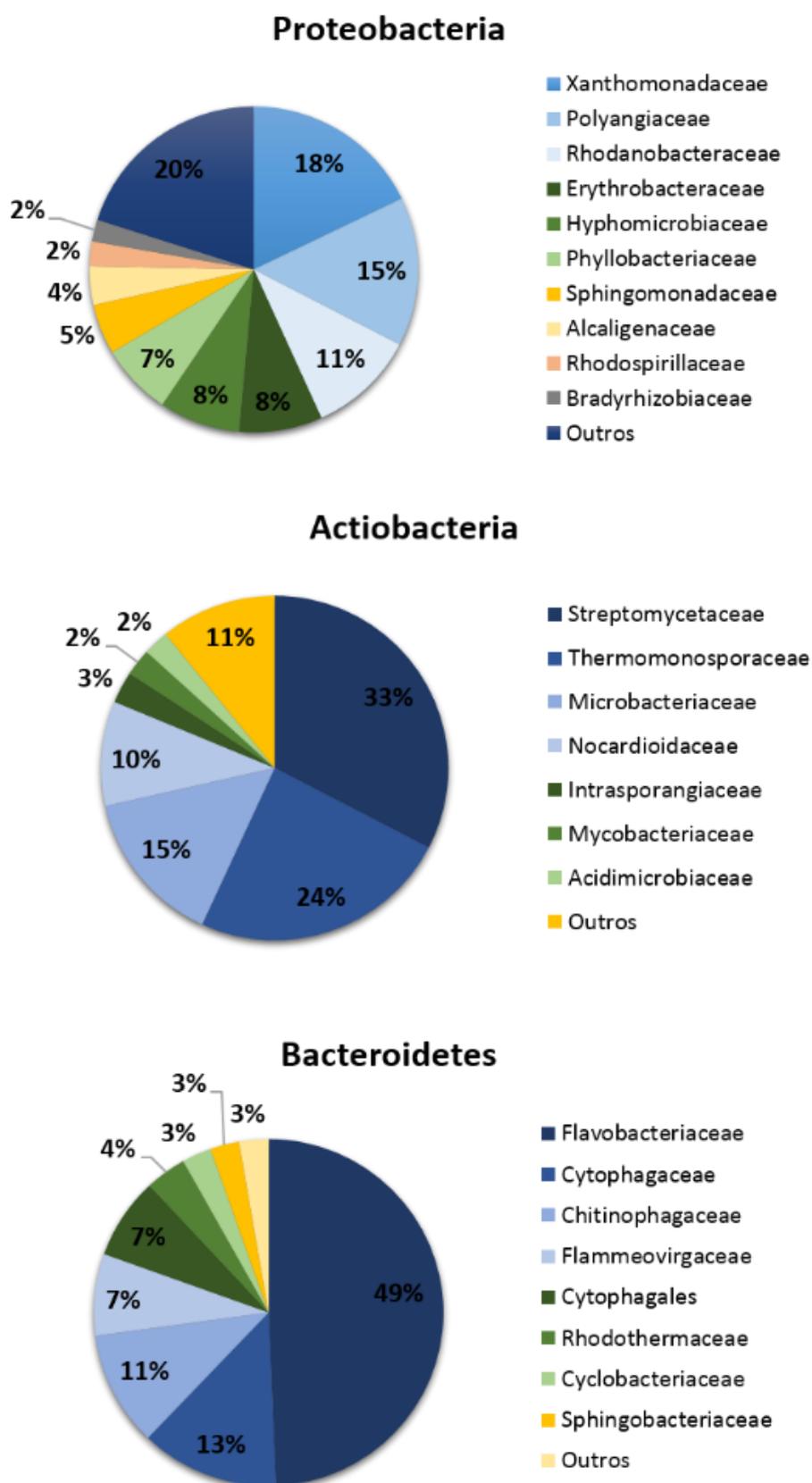


Figura 1.5. Composição taxonômica ao nível de família dos três filos mais abundantes encontrados na microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001.

Entre as actinobactérias, Streptomycetaceae (32,7%) é altamente abundante em solos e a maioria das bactérias desse grupo é capaz de degradar compostos complexos, incluindo material vegetal como lignina e celulose. Além disso, essas bactérias são capazes de se adaptar a condições adversas como seca, anaerobiose, mudanças na aeração entre outras, devido a sua habilidade de formar esporos (Kämpfer *et al.*, 2014). As famílias Thermomonosporaceae, Microbacteriaceae, Nocardiodaceae e Mycobacteriaceae possuem membros comumente associados com plantas, na rizosfera ou endofíticas. Muitas bactérias dessas famílias são produtoras de compostos secundários como antibióticos e enzimas degradadoras de diferentes compostos orgânico, incluindo aromáticos (Tóth & Borsodi, 2014; Evtushenko & Takeuchi, 2006; Zeng *et al.*, 2017).

A família Flavobacteriaceae foi a mais abundante entre as pertencentes ao filo Bacteroidetes. Devido à alta diversidade de gêneros dessa família, é possível encontrar bactérias com diferentes capacidades metabólicas. Membros desse grupo são capazes de solubilizar potássio no solo e disponibiliza-lo para as plantas, além de produzir compostos antimicrobianos e antifúngicos, os quais podem desempenhar papel importante na manutenção da saúde de plantas (McBride, 2014; Velázquez *et al.*, 2016). As famílias Rhodothermaceae e Flammeovirgaceae possuem membros tolerantes a ambientes salinos, característica importante para a sobrevivência em solos secos, onde a concentração de sais aumenta (Mohammadipanah *et al.*, 2015; Vavourakis *et al.*, 2016). Finalmente, as famílias Cytophagaceae, Chitinophagaceae e Sphingobacteriaceae são normalmente associadas com cana-de-açúcar. De Souza *et al.* (2016) reportaram a presença desses três grupos de bactérias em alta abundância na rizosfera e no interior das raízes de cana-de-açúcar variedade SP80-3280. No entanto, o papel dessas famílias na microbiota da cana-de-açúcar ainda é desconhecido.

A comunidade microbiana associada a rizosfera de cana-de-açúcar da variedade CTC9001 possui uma grande diversidade bacteriana e apresenta grupos com potencial para promover o crescimento vegetal, a degradação de compostos ligno-celulósicos e outros compostos orgânicos complexos (importantes para a ciclagem de nutrientes no solo), além de terem potencial para desenvolver estratégias para sobreviver em um ambiente altamente competitivo, como a produção de antibióticos e a formação de esporos.

Para avaliar a variação da composição taxonômica durante os diferentes tempos de estresse hídrico, os *reads* anotados foram agrupados em diferentes níveis taxonômicos e são apresentados na Figura 1.6. Foi possível observar uma variação na atividade bacteriana na amostra controle em relação às amostras submetidas aos diferentes tempos de estresse hídrico. A amostra controle apresentou uma maior proporção de *reads* classificados como Firmicutes (Figura 1.6A), principalmente da classe Bacilli (Figura 1.6B).

Nos níveis taxonômicos de ordem/família (Figura 1.6C) as principais diferenças foram a diminuição de membros da ordem Burkholderiales quando a rizosfera é submetida ao estresse hídrico. Esse grupo de bactérias é encontrado principalmente no interior das raízes de cana-de-açúcar e tem papel importante na fixação de nitrogênio atmosférico, na solubilização de fosfato e na produção de ACC deaminase (Santoyo *et al.*, 2016; Leite *et al.*, 2018). Paungfoo-Lonhienne *et al.* (2013) utilizaram o sequenciamento parcial do gene de rRNA 16S e isolamento de bactérias em meio de cultivo para caracterizar a microbiota da rizosfera e das raízes da cana-de-açúcar Q208^A. Nesse trabalho, o gênero *Burkholderia* estava entre os mais abundantes e promoveu o crescimento da planta devido a sua capacidade de fixar nitrogênio. Nota-se, portanto, a importância desse grupo bacteriano para a obtenção de nitrogênio para a cana-de-açúcar. Dessa forma, a diminuição da ordem Burkholderiales nas amostras de metatranscriptoma submetidas ao estresse hídrico reportados no presente trabalho, sugere um comprometimento de possíveis interações benéficas planta-bactéria.

Como mostra a Figura 1.6A e B, a amostra submetida a oito dias de estresse hídrico foi a que apresentou uma mudança na composição taxonômica mais evidente. Essa mudança na taxonomia se deve principalmente pela diminuição dos *reads* associados a Proteobacteria (principalmente a classe Deltaproteobacteria) e pelo aumento de Bacteroidetes (principalmente os da classe Flavobacteriia). Ao nível de família, a amostra submetida a oito dias de estresse hídrico se diferenciou das demais amostras devido a diminuição da abundância de Polyangiaceae (Deltaproteobacteria) e aumento de Flavobacteriaceae (Bacteroidetes) (Figura 1.6C). A família Polyangiaceae é uma mixobactéria, conhecida pela produção de corpos de frutificação durante seu ciclo de vida. Esses corpos de frutificação auxiliam na degradação de biopolímeros e promovem a formação de esporos em casos de estresse abiótico. O período de oito dias de estresse hídrico diminuiu a abundância desse grupo de

bactérias, as quais podem ter utilizado a capacidade de formar esporos para retomarem o crescimento quando as condições se tornarem favoráveis (Claessen *et al.*, 2014; Garcia & Müller, 2014). A família Flavobacteriaceae, por sua vez, apresenta uma grande diversidade de gêneros o que possibilita a adaptação de membros dessa família em diversos ambientes (McBride, 2014). Dessa forma, foi possível observar um aumento desse grupo bacteriano nas amostras com oito dias de estresse hídrico.

Nota-se, portanto, que a composição taxonômica da microbiota metabolicamente ativa da rizosfera de cana-de-açúcar sofreu variações expressivas quando submetidas a diferentes tempos de estresse hídrico, uma vez que já foram observadas variações nos níveis taxonômicos mais gerais (filó e classe). Para avaliar detalhadamente as bactérias que tiveram a abundância de *reads* alterada em situações controle e de estresse hídrico, o programa STAMP foi utilizado para determinar os gêneros que apresentaram diferenças entre essas duas condições (Figura 1.7).

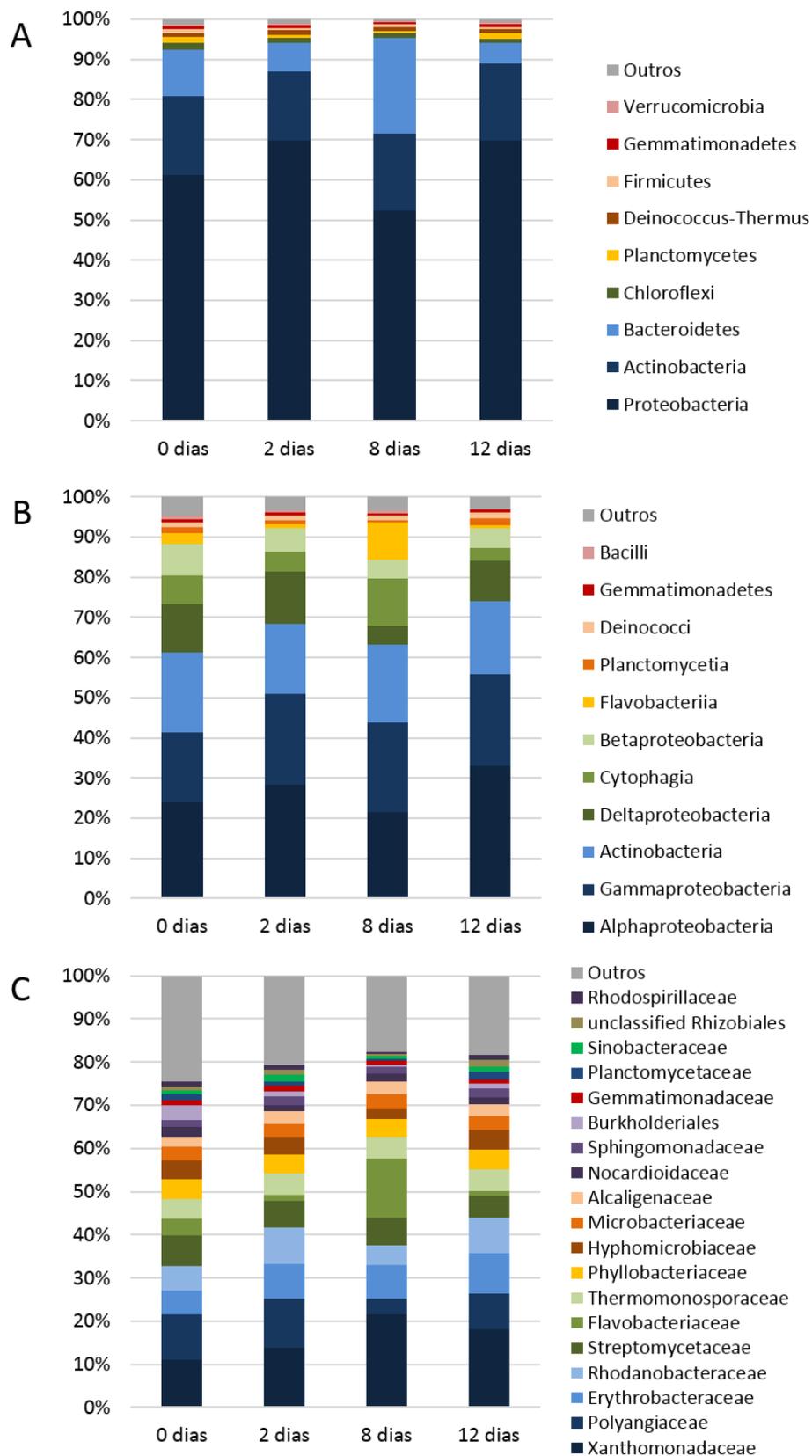


Figura 1.6. Composição taxonômica dos *reads* ao nível de filo (A), classe (B) e família (C) da comunidade bacteriana associada a rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001, submetida a diferentes tempos de estresse hídrico.

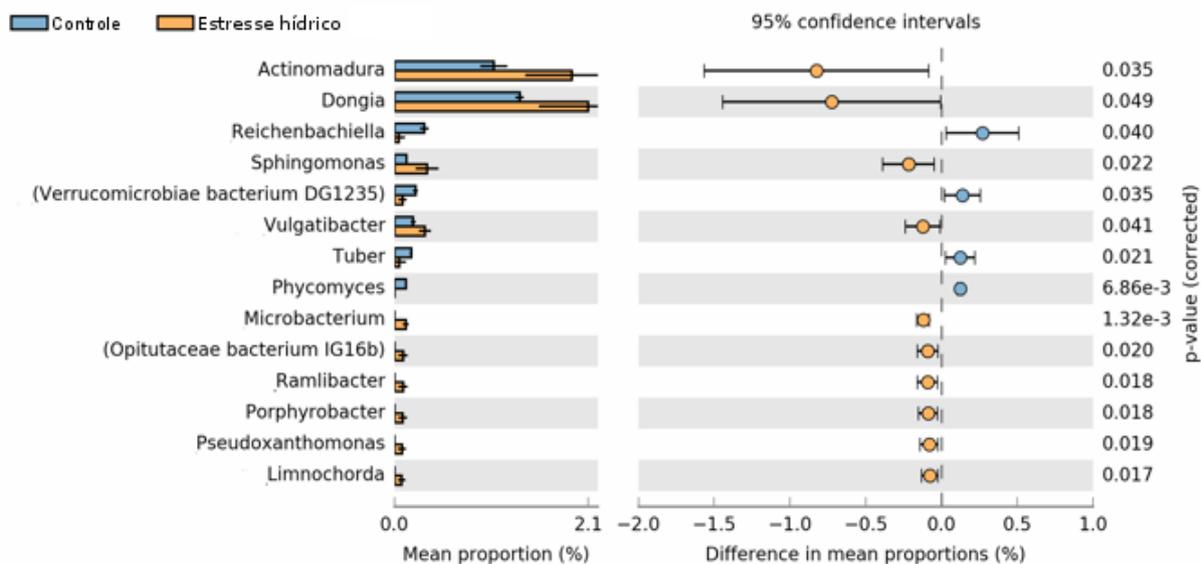


Figura 1.7. Gêneros com diferença significativa ($p < 0,05$) na abundância de *reads* em amostras da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001 com e sem estresse hídrico. Nome de taxa entre parênteses indicam anotação taxonômica em outros níveis (família, ordem, classe, filo ou reino).

Com base no teste estatístico de Welch, foi possível observar uma maior abundância de *reads* dos fungos *Tuber* e *Phycomyces* nas amostras de cana-de-açúcar sob irrigação normal. A cana-de-açúcar é capaz de estabelecer relações simbióticas com diferentes grupos de fungos, principalmente os fungos micorrízicos. Nesse caso, as hifas fúngicas entram nas células da raiz das plantas e se proliferam. Como resultado, a área de contato entre o fungo e o citoplasma da célula hospedeira aumenta, facilitando a transferência de água e nutrientes entre eles. Essa interação promove vantagens para as plantas como a tolerância a seca e a patógenos além de uma melhor captação de fósforo do solo. Além disso, fungos presentes na forma livre na rizosfera também podem contribuir para a saúde das plantas, através da produção de compostos antimicrobianos e compostos que auxiliam o crescimento vegetal (Mehnaz *et al.*, 2013; Colla *et al.*, 2015).

A amostra controle também apresentou maior abundância de *reads* do gênero bacteriano *Reichenbachiella*, além de uma bactéria da classe Verrucomicrobiae. *Reichenbachiella* contém apenas uma espécie, *R. agariperforans*, isolada em ambiente marinho e, portanto, não é possível estabelecer sua relação com cana-de-açúcar ou com o ambiente da rizosfera (Nedashkovskaya *et al.*, 2003).

Entre os oito gêneros que apresentaram aumento na abundância de *reads* nas amostras submetidas ao estresse hídrico, quatro deles já foram reportados em ambientes com baixa disponibilidade de água, sendo que alguns deles são capazes de auxiliar plantas a tolerar a seca. O gênero *Microbacterium* foi capaz de colonizar as raízes de pimenta e melhorar as características agrônômicas, como o maior teor relativo de água e maior eficiência fotossintética, quando as plantas foram submetidas ao estresse hídrico. Essa proteção se deve a capacidade da bactéria em promover a produção de osmoprotetores e antioxidantes pela planta (Vílchez *et al.*, 2018). Resultados semelhantes foram reportados por Asaf *et al.* (2017) quando inocularam a bactéria endofítica *Sphingomonas* sp. LK11 em plantas de soja. Os resultados mostraram que a inoculação da bactéria aumentou significativamente o comprimento, a biomassa seca, e os pigmentos fotossintéticos das plantas sob diferentes tensões hídricas. Os autores relataram que esse efeito benéfico se deve a capacidade da bactéria em produzir fito-hormônios e trealose. Os gêneros *Actinomadura* e *Limnochorda* são conhecidos pela resistência a condições adversas. *Actinomadura* é encontrado em alta abundância em ambientes áridos e solos salinos enquanto *Limnochorda* é capaz de formar esporos quando as condições do meio não são favoráveis, permitindo sua sobrevivência (Watanabe *et al.*, 2015; Mohammadipanah & JoachimWink, 2016; Watanabe *et al.*, 2016).

O gênero *Pseudoxanthomonas* é capaz de utilizar celulose e lignocelulose como fontes de carbono, sendo utilizada em consórcios de degradação de resíduos ou na produção de etanol a partir desses componentes (Du *et al.*, 2015; Kumar & Khanna, 2015). Um aumento de degradação de celulose já foi reportado em solos sob estresse hídrico para leguminosas e gramíneas devido a maior produção de serapilheira ou do aumento da rotatividade de raízes (Sanullah *et al.*, 2011). Dessa forma, um aumento da atividade de *Pseudoxanthomonas* na rizosfera de cana-de-açúcar em condições de seca pode estar associada a uma maior degradação de compostos celulósicos. Finalmente, foi possível observar o aumento dos gêneros bacterianos *Dongia*, *Vulgatibacter*, *Ramlibacter* e *Porphyrobacter*. Esses grupos ainda são pouco explorados em ambientes de rizosfera e em condições de estresse.

A análise da composição taxonômica obtida pelo sequenciamento do metatranscriptoma da rizosfera de cana-de-açúcar, revelou uma comunidade microbiana diversa e visivelmente modificada pelo estresse hídrico. Entre os membros afetados pelo estresse, foram encontrados alguns gêneros de fungos filamentosos. A

diversidade de fungos associados a rizosfera e raízes de cana-de-açúcar vem sendo pouco explorada, e a maioria deles ainda permanece com papel ecológico e simbiótico desconhecido. Romão-Dumaresq *et al.* (2016) isolaram fungos de raízes e da rizosfera das variedades de cana-de-açúcar SP80-1842 e IMI-1 (geneticamente modificada). Os autores relataram uma grande variedade de fungos, principalmente do filo Ascomycota, distribuídos em 35 gêneros, sendo que quase 10% dos fungos isolados não puderam ser identificados. De Souza *et al.* (2016) avaliaram a comunidade fúngica da variedade comercial de cana-de-açúcar SP80-3280 e reportaram uma alta diversidade desses micro-organismos associados a raiz ou presentes na rizosfera, a maioria pouco explorados. Os autores alertaram sobre a carência de estudos a respeito das associações fungo-planta e uma nova possibilidade de área de estudo. Nosso trabalho também evidencia uma relação entre cana-de-açúcar e alguns fungos e o impacto da seca sobre alguns gêneros. A análise da composição funcional dessa microbiota poderá proporcionar informações de como e quando os micro-organismos responderam às variações de umidade do solo.

1.3.5. Análise funcional da microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001

Um total de 208.816 (51.5%) dos transcritos foram anotados em subsistemas do SEED e distribuídos em 40 categorias funcionais (Figura 1.8).

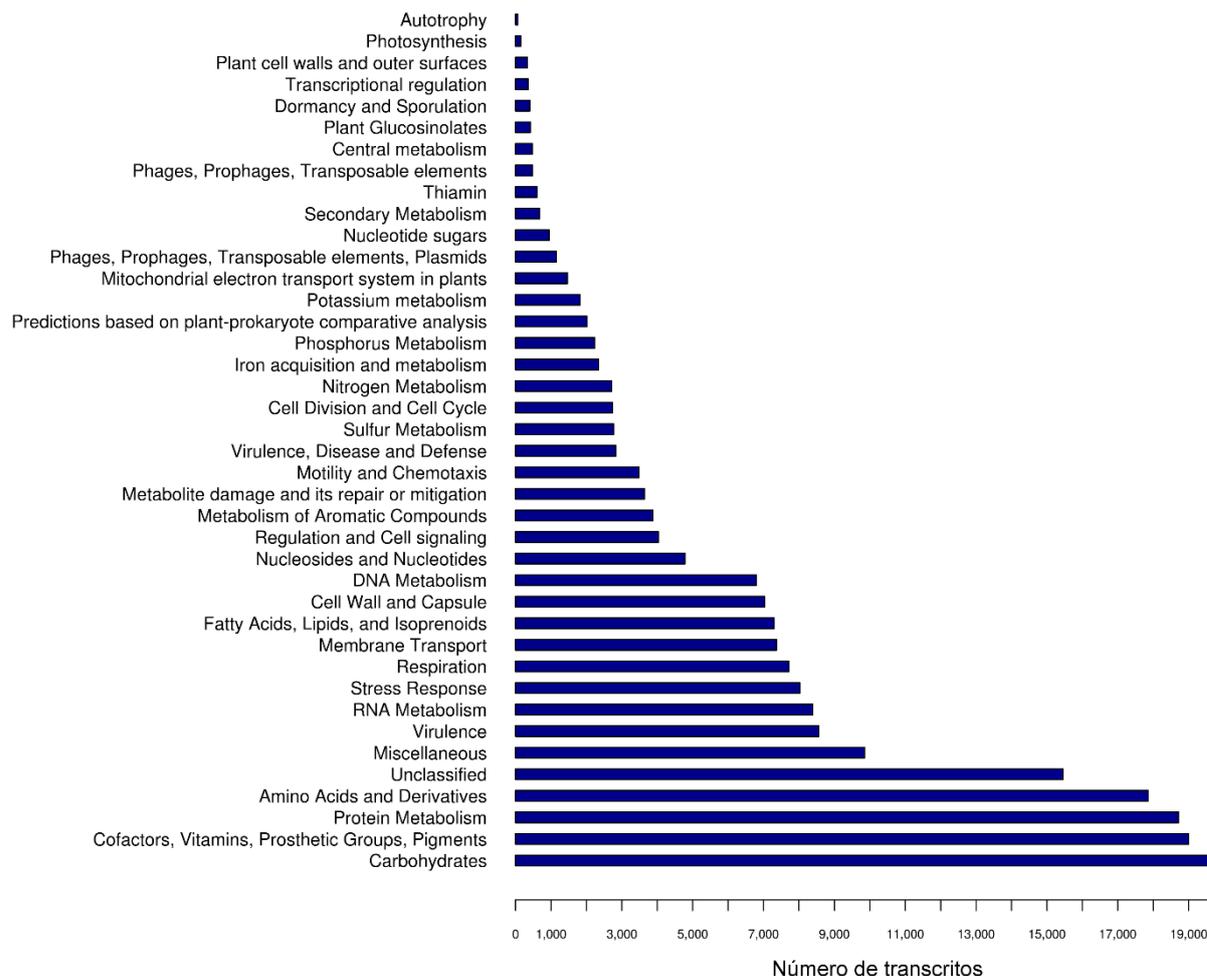


Figura 1.8. Análise funcional baseada nas categorias funcionais em nível um do SEED dos transcritos encontrados na microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001.

As categorias mais abundantes anotadas no banco de dados foram aquelas responsáveis por processos essenciais dos micro-organismos como metabolismo de carboidratos, proteínas, aminoácidos, vitaminas e RNA. Algumas categorias como resposta ao estresse, cápsula e parede celular, transdução de sinal, mobilidade e quimiotaxia apresentaram abundância intermediária e podem ser importantes em mecanismos de resistência à dissecação e ao reconhecimento de sinais químicos presentes no ambiente da rizosfera (Venturi *et al.*, 2016). Como exemplo da importância dessas categorias funcionais, Borland *et al.* (2015) avaliaram o genoma de quatro linhagens de *Azospirillum* sp., conhecida por promover o crescimento de diversas plantas. Os autores sugeriram que a existência de um grande número de genes associados à transdução de sinal ajuda as bactérias a colonizar ambientes

heterogêneos e competitivos como a rizosfera, uma vez que as vias de transdução de sinal, regulam as funções celulares das bactérias em resposta aos estímulos ambientais. Da mesma forma, as habilidades de quimiotaxia e mobilidade podem proporcionar vantagens competitivas às bactérias na colonização e utilização de compostos químicos liberados pelas raízes das plantas (Scharf *et al.*, 2016).

As análises estatísticas para as diferentes funções metabólicas classificadas no nível dois do SEED (Figura 1.9) revelaram variação na abundância de algumas funções na microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar com a presença do estresse hídrico.

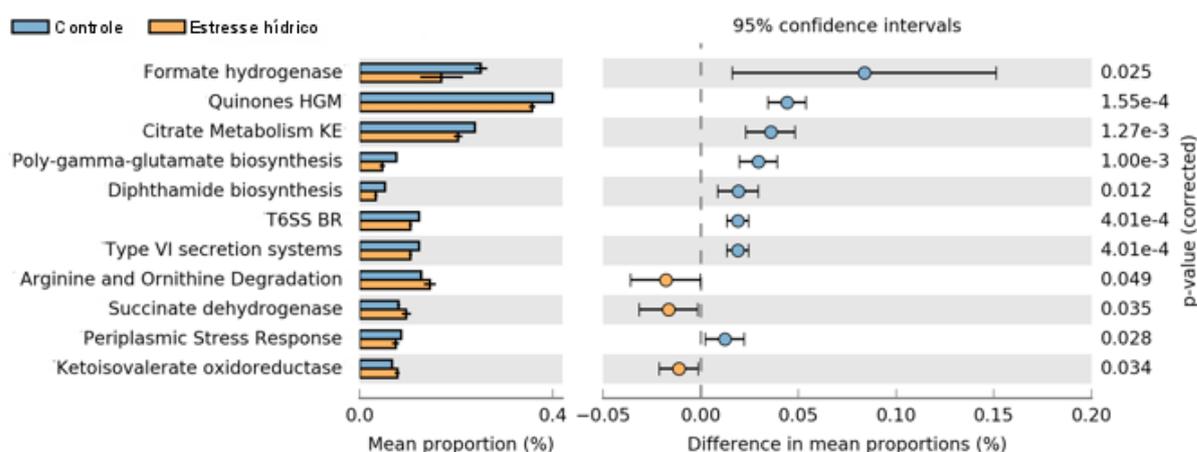


Figura 1.9. Categorias funcionais do nível dois do SEED com diferença significativa ($p < 0,05$) na abundância de *reads* em amostras da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001 com e sem estresse hídrico.

Algumas categorias funcionais essenciais envolvidas com o metabolismo energético (*formate hydrogenase*, *citrate metabolismo*), transporte de elétrons (*quinones*) e fidelidade de tradução (*diphthamide biosynthesis*) foram mais abundantes nas amostras controle (Hugenholtz, 1993; Georgellis *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2013; McDowall *et al.*, 2014). Também foi observado uma maior abundância de funções importantes para a sobrevivência em ambientes de alta competitividade como a rizosfera. A síntese de poli-gamma-glutamato (*polly-gamma-glutamate biosynthesis*) possui diversas funções, dependendo do ambiente em que a bactéria se encontra. Em solo, as bactérias utilizam o composto para sequestro de íons metálicos ou como fonte de glutamato durante estado de privação de nutriente (Candela & Fouet, 2006).

Finalmente, as amostras controle apresentaram maior abundância de genes relacionados ao sistema de secreção do tipo VI (*Type VI Secretion Systems* e *T6SS BR*) que, entre outras funções, é responsável pelo transporte de antibióticos no meio e virulência (Alteri & Mobley, 2016; Gallique *et al.*, 2017).

As amostras submetidas a diferentes tempos de estresse hídrico apresentaram aumento na abundância de genes relacionados a degradação de proteínas para obtenção de energia e nitrogênio (*arginine and ornithine degradation*), enzimas oxirredutases atuantes na cadeia respiratória aeróbia (*succinate dehydrogenase*) e processos fermentativos (*ketoisovalerate oxidoreductase*) (Kita *et al.*, 1989; Heider *et al.*, 1996; Kletzin & Adams, 1996; Champomier Vergès *et al.*, 1999; Cecchini, 2003; Fonknechten *et al.*, 2009). Uma maior abundância dessas categorias funcionais pode sugerir uma alteração no metabolismo da comunidade microbiana da rizosfera da cana-de-açúcar, a qual necessita de fontes alternativas de energia para sobreviver no ambiente sob estresse hídrico.

1.3.6. Expressão diferencial de genes na microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001 submetida a diferentes tempos de estresse hídrico

Os dados de expressão gênica, determinado em número de *reads* mapeados, foram primeiramente avaliados quanto à cobertura do sequenciamento pelo pacote Noiseq (Tarazona *et al.*, 2015), no programa R (R Development Core Team, 2011). Essa etapa é necessária para a detecção de amostras com profundidade insuficiente, as quais podem enviesar os resultados nas análises estatísticas de expressão diferencial. Além de permitir analisar a cobertura do sequenciamento e avaliar a presença de vieses nos dados, o programa NOISeq permite fazer as análises estatísticas com um baixo número de réplicas, motivo pelo qual foi escolhido para realizar as análises de expressão diferencial nos dados do metatranscriptoma.

Com base nas análises de profundidade das amostras (Figura 1.10), foi possível observar que uma amostra submetida a oito dias de estresse hídrico (R8d-1) apresentou uma baixa cobertura no sequenciamento, portanto, esta amostra foi retirada nas análises estatísticas. Dessa forma, um total de sete amostras foi utilizado para as análises de expressão diferencial entre os diferentes tempos de estresse hídrico: duas amostras controle (zero dias de estresse hídrico), duas amostras

submetidas a dois dias de estresse hídrico, uma amostra submetida a oito dias de estresse hídrico e, finalmente, duas amostras submetidas a 12 dias de estresse hídrico.

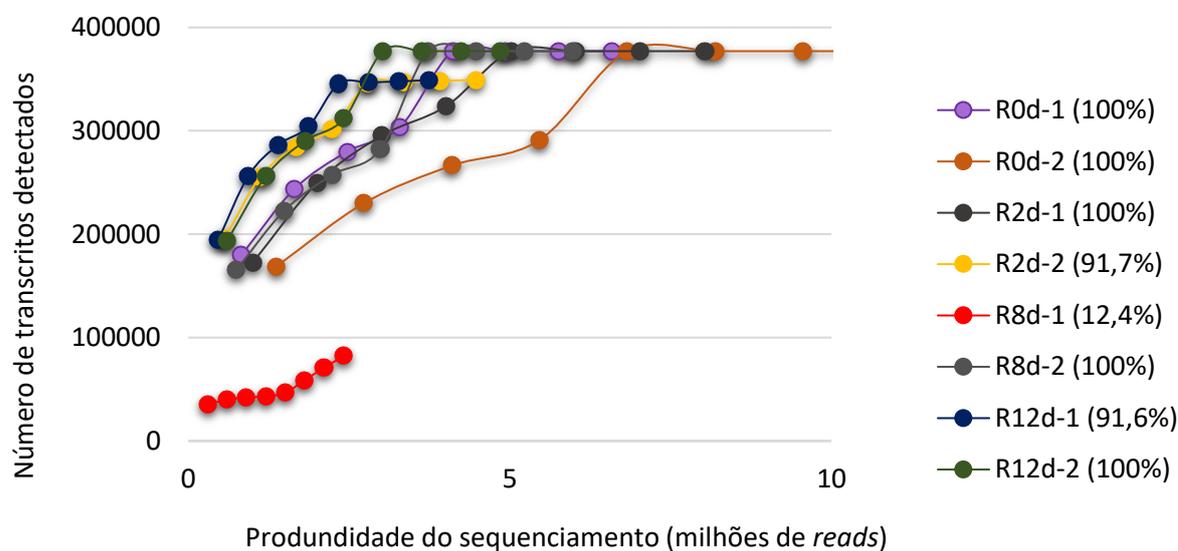


Figura 1.10. Gráfico da saturação dos transcritos (valores entre parênteses na legenda) encontrados nas amostras de sequenciamento do metatranscriptoma da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001. Os dados foram normalizados em TMM.

A análise de expressão diferencial de todos os possíveis pares das amostras da rizosfera revelou um total de 43.716 transcritos diferencialmente expressos em pelo menos um dos tratamentos de estresse hídrico avaliado (Tabela 1.5). Foi possível observar que a maioria dos genes apresentou uma queda na expressão (*down regulated*) à medida que o tempo de estresse hídrico aumentava. Apenas na comparação entre oito e 12 dias de estresse hídrico, foi possível observar uma grande proporção de genes cuja expressão aumentou (*up regulated*) na condição de estresse hídrico mais severo.

Tabela 1.5. Número de genes diferencialmente expressos (DE) na microbiota da rizosfera da cana-de-açúcar CTC9001 em diferentes tempos de estresse hídrico.

Amostras comparadas	Genes DE	Up regulated*	Down regulated*
0 dias x 2 dias	924	140 (15,2%)	784 (84,8%)
0 dias x 8 dias	8.216	1.371 (16,7%)	6.845 (83,3%)
0 dias x 12 dias	6.556	53 (0,8%)	6.503 (99,2%)
2 dias x 8 dias	7.334	2.611 (35,6%)	4.723 (64,4%)
2 dias x 12 dias	2.766	41 (1,5%)	2.725 (98,5%)
8 dias x 12 dias	35.178	30.845 (87,7%)	4.333 (12,3%)
Total	60.974	35.061 (57,5%)	25.913 (42,5%)
Total (únicos)	43.716	33.896 (77,5%)	15.549 (22,5%)

*Em relação ao menor tempo de estresse hídrico comparado

Para entender a resposta da comunidade microbiana nos diferentes níveis de estresse hídrico, os transcritos que apresentaram expressão diferencial significativa em comparação com a condição controle (0 dias) foram submetidos à análise de enriquecimento de GO (*Gene Ontology*). Essa análise permite avaliar quais funções estão estatisticamente enriquecidas em relação ao total de funções anotadas no metatranscritoma. A Figura 1.11 mostra o resultado dessa análise de enriquecimento para os transcritos com expressão alterada na comparação entre a condição controle e o tratamento com dois dias de estresse hídrico.

A análise de enriquecimento revelou uma diminuição na via de montagem do complexo de pré-iniciação transcricional, responsável pela agregação, arranjo e ligação de proteínas no DNA promotor em eucariotos e arqueias. A formação desse complexo de pré-iniciação é necessária para iniciar a transcrição dos genes (Lee & Young, 2000; Bell, 2005). Dessa forma, a queda na expressão de transcritos relacionados a essa atividade pode sugerir uma diminuição da atividade desses organismos nos primeiros dias de estresse hídrico. Essa categoria funcional foi relacionada à família de arqueia Nitrosopumilaceae.

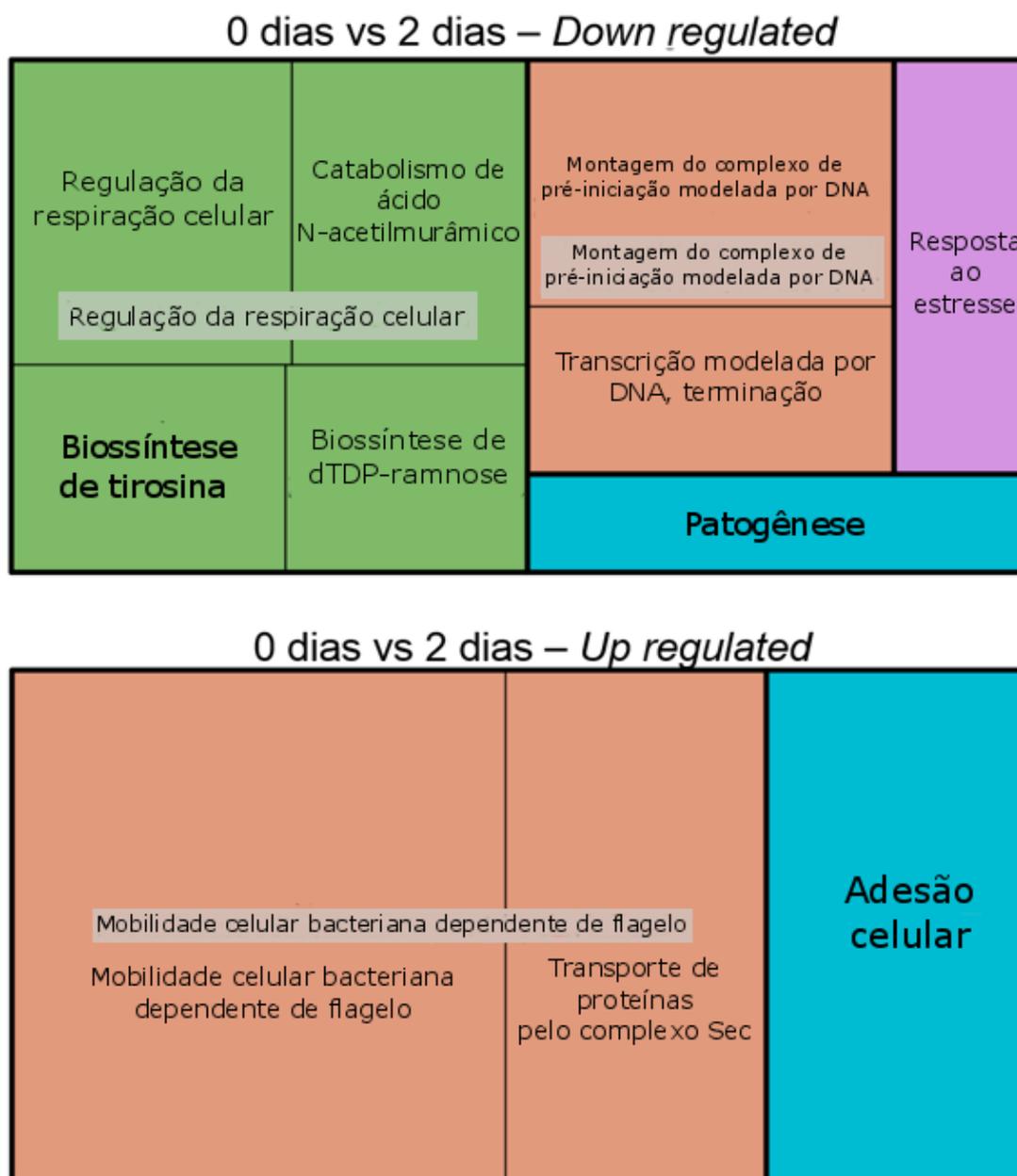


Figura 1.11. Análise de enriquecimento de GO relacionados a processos biológicos resumida e visualizada como um gráfico *Treemap* usando o programa REVIGO para os transcritos *down* e *up regulated* entre zero e dois dias de estresse hídrico. O tamanho dos quadros indica a significância (valor $-\log_{10}$ do *p-value*) dos termos enriquecidos. Quadros com cores iguais correspondem aos termos GO pertencentes a mesma categoria funcional.

Em bactérias, foi possível observar uma diminuição do catabolismo de ácido N-acetilmurâmico e da síntese de dTDP-ramnose, ambos componentes da parede celular. O ácido N-acetilmurâmico é um amino açúcar, que ocorre naturalmente na parede celular de quase todas as bactérias e é constantemente

degradado e reciclado durante o crescimento e divisão das células bacterianas (Uehara *et al.*, 2005; Reith & Mayer, 2011). O polissacarídeo dTDP-ramnose atua como fator de virulência para a infecção no hospedeiro. Estudos já demonstraram a importância desse composto para o crescimento e virulência de *Shigella flexneri* (Macpherson *et al.*, 1994), *Streptococcus mutans* (Tsukioka *et al.*, 1997) e *Mycobacterium smegmatis* (Ma *et al.*, 2002). Jofre *et al.* (2004) isolaram uma espécie mutante de *Azospirillum brasilense* (Tn5) que apresenta a estrutura de lipossacarídeos modificada e menor capacidade de infecção em plantas de milho. Os autores concluíram que a diminuição da interação planta-patógeno se deve a diminuição da síntese de ramnose. Dessa forma, é possível concluir que o período de dois dias de estresse hídrico provocou a diminuição da degradação de N-acetilmurâmico, indicando uma diminuição do crescimento celular, e da síntese de ramnose, indicando uma diminuição na capacidade de virulência das bactérias. Esse último dado também pode ser suportado pela diminuição de transcritos relacionados à patogênese nas amostras sob estresse. Os dados de taxonomia revelaram que as famílias bacterianas que sofreram diminuição da expressão desses componentes foram Flavobacteriaceae (Bacteroidetes), Phyllobacteriaceae (Alphaproteobacteria), além do gênero *Roseiflexus* (Chloroflexi). Transcritos associados à resposta ao estresse (*response to stress*) também diminuíram sua expressão nas amostras submetidas a dois dias de estresse hídrico, no entanto, a classificação obtida por GO não permitiu mais informações a respeito dessa resposta.

As funções com enriquecimento nas amostras de rizosfera submetida a dois dias de estresse hídrico foram relacionadas com adesão celular e mobilidade mediada por flagelo. As duas funções são importantes para uma colonização efetiva da superfície das raízes, de partículas de solo e na formação de biofilmes (Kasim *et al.*, 2016; Timm *et al.*, 2016; Altaf & Ahmad, 2017). Assim sendo, tais mecanismos podem ter sido estimulados para permitir a sobrevivência da microbiota nessa condição de estresse. Essas categorias funcionais enriquecidas foram relacionadas aos filos Proteobacteria, Bacteroidetes e Verrucomicrobia.

Em resumo, pode-se observar que um curto período de estresse hídrico foi capaz de promover respostas iniciais importantes dos micro-organismos presentes na rizosfera, como a diminuição da atividade bacteriana, do crescimento celular e de mecanismos de virulência, assim como o aumento de atividades associadas à colonização e mobilidade. A Figura 1.12 mostra o resultado da análise de

enriquecimento para os transcritos com expressão alterada na comparação entre a condição controle e o tratamento com oito dias de estresse hídrico.

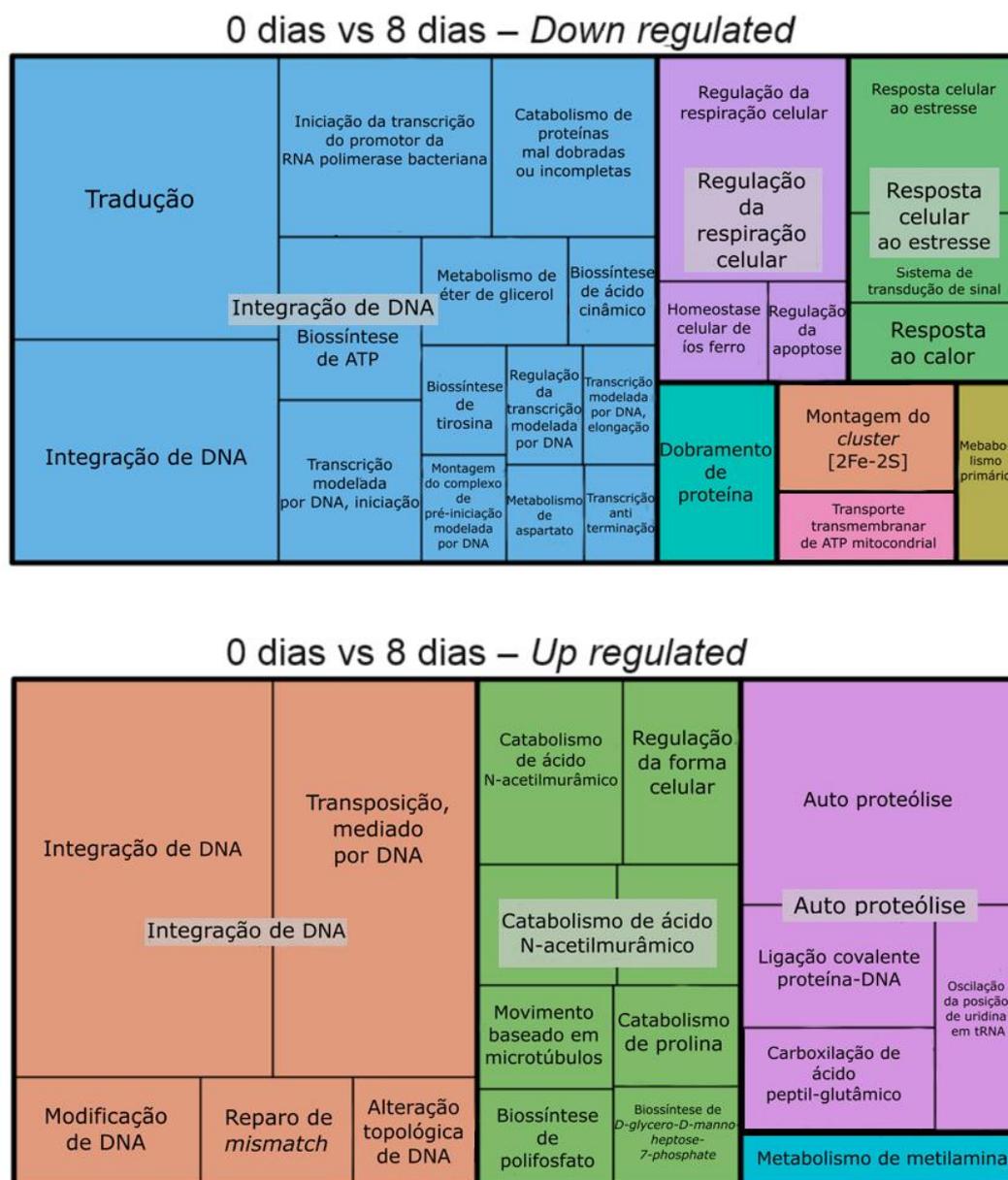


Figura 1.12. Análise de enriquecimento de GO relacionados a processos biológicos resumida e visualizada como um gráfico *Treemap* usando o programa REVIGO para os transcritos *down* e *up regulated* entre zero e oito dias de estresse hídrico. O tamanho dos quadros indica a significância (valor $-\log_{10}$ do *p-value*) dos termos enriquecidos. Quadros com cores iguais correspondem aos termos GO pertencentes a mesma categoria funcional.

Nas amostras submetidas a oito dias de estresse hídrico, foi possível observar que diversas funções relacionadas ao metabolismo de DNA, síntese de aminoácidos, respiração celular, dobramento de proteínas, obtenção de energia em eucariotos, resposta ao estresse e metabolismo primário foram as principais categorias enriquecidas entre os transcritos que diminuíram a expressão em relação às amostras controle. Assim como na análise de enriquecimento anterior, esses resultados indicam uma queda na atividade microbiana. Contudo, enquanto nas amostras com dois dias de estresse hídrico, as principais alterações foram detectadas na membrana celular, as alterações nas amostras com oito dias de estresse mais significativas foram relacionadas à integridade do material genético e à síntese proteica. Esses resultados sugerem que a microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar está sendo afetada pela falta de irrigação que se estendeu por oito dias. A maioria dos grupos taxonômicos associados a essas categorias funcionais diminuídas foram a família Polyangiaceae (13,9%), a ordem Myxococcales (11,9%), Bactérias não classificadas (10,5%), Proteobacteria (7,1%) e a ordem Cytophagales (6,1%).

Outros membros da comunidade microbiana parecem ter sido favorecidos pelas mudanças impostas pela seca mais prolongada na rizosfera e pela diminuição da atividade de alguns micro-organismos. Isso pode ser explicado pelo aumento da expressão de transcritos associados ao metabolismo de DNA e ao catabolismo de ácido N-acetilmurâmico (importante para a renovação da parede celular e crescimento bacteriano). Além disso, os transcritos relacionados à degradação de proteínas (auto proteólise) também tiveram a expressão aumentada sob estresse. A proteólise realizada por bactérias pode ter papel importante para a remoção de proteínas mal dobradas ou danificadas ou pode ocorrer em resposta a sinais específicos como crescimento, formação de biofilme e resposta ao estresse. Em situações de estresse, a regulação por proteólise pode ser vantajosa devido a sua resposta rápida aos sinais externos (Jenal & Hengge-Aronis, 2003; Gur *et al.*, 2011; Konovalova *et al.*, 2014). Praticamente todos os transcritos relacionados à essas duas categorias pertencem a família Flavobacteriaceae e/ou ao gênero *Aequorivita*. Alguns transcritos também foram relacionados com as famílias Rhodanobacteraceae e Xanthomonadaceae. Esses dados indicam que esses grupos bacterianos podem ter sido capazes de manter seu crescimento em condições de seca.

Metilamina é um composto atuante no metabolismo do metano e um produto do metabolismo de plantas. Esse produto pode ser usado como fonte de

nitrogênio ou carbono por diversas bactérias, denominadas metilotróficas. Bactérias especializadas em utilizar compostos de um carbono (C1) como metilamina, metanol e metano podem obter vantagens em relação a outros organismos que apenas utilizam compostos mais complexos e habitar ambientes como a rizosfera (Chistoserdova, 2015; Stein, 2017). Dessa forma, o aumento do metabolismo de metilamina nas amostras submetidas ao estresse hídrico sugere um favorecimento de bactérias com esse tipo de metabolismo. Essa categoria também foi associada a família Flavobacteriaceae.

De forma geral, pode-se observar que um tempo de estresse hídrico intermediário (oito dias) na rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001 provocou a diminuição da atividade de algumas bactérias e o consequente favorecimento de outros grupos, especialmente os que possuem metabolismos para diferentes fontes de energia e rápida resposta a mudanças ambientais. A análise de enriquecimento também foi realizada para os transcritos diferencialmente expressos nas amostras tratadas com doze dias de estresse hídrico, em relação à amostra controle (Figura 1.13).

Em 12 dias de estresse hídrico ainda foi possível observar diminuição na expressão de genes relacionados ao metabolismo bacteriano e eucariótico como regulação da respiração, síntese de ribossomos, dobramento de proteínas, tradução, endocitose e resposta ao estresse. A maioria dos micro-organismos relacionados à diminuição na expressão dessas categorias funcionais foram eucariotos não classificados (27,2%), *Streptomyces* (11,3%) e Cytophagales (10,9%).

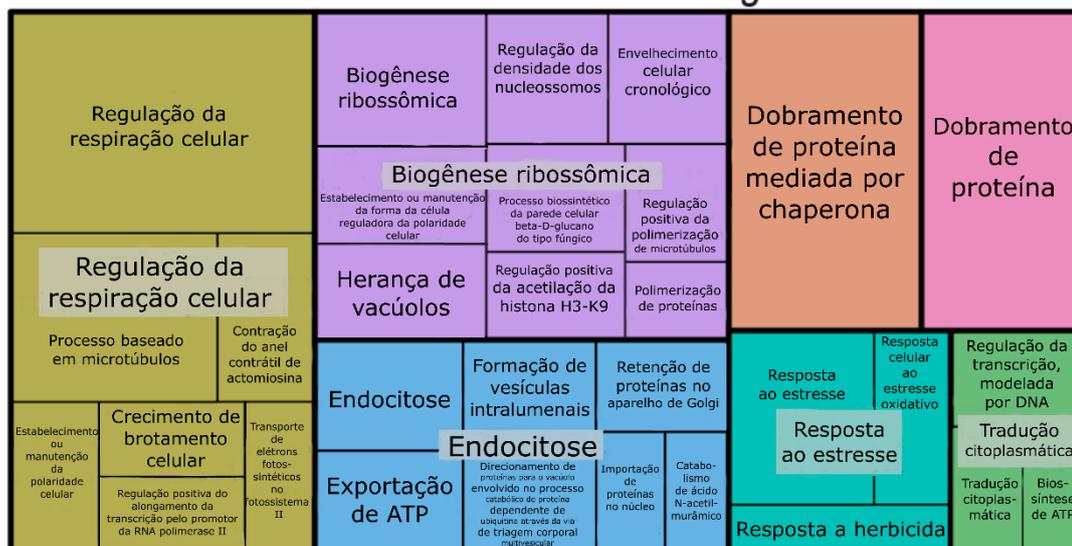
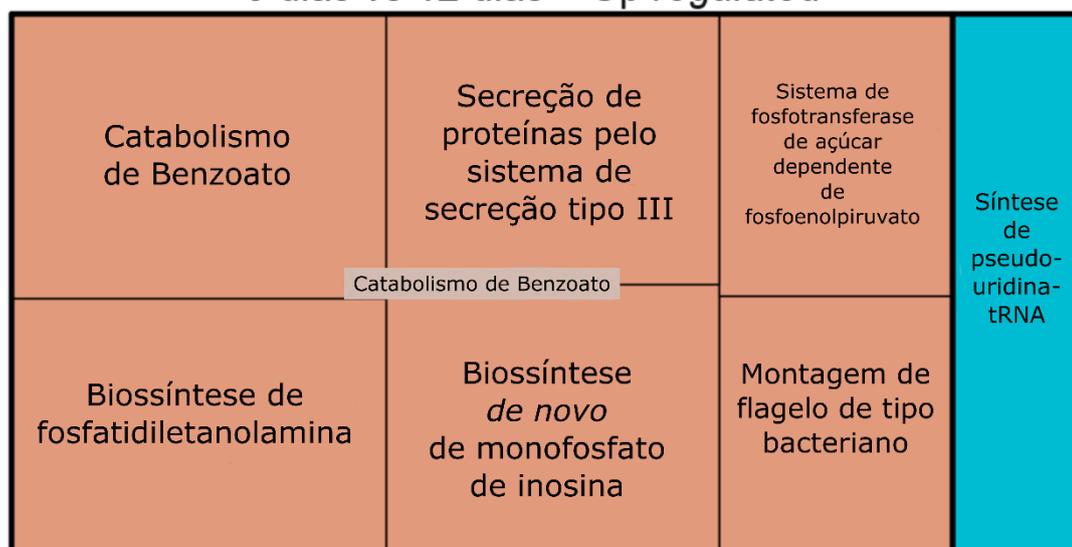
0 dias vs 12 dias – *Down regulated*0 dias vs 12 dias – *Up regulated*

Figura 1.13. Análise de enriquecimento de GO relacionados a processos biológicos resumida e visualizada como um gráfico *Treemap* usando o programa REVIGO para os transcritos *down* e *up regulated* entre zero e doze dias de estresse hídrico. O tamanho dos quadros indica a significância (valor $-\log_{10}$ do *p-value*) dos termos enriquecidos. Quadros com cores iguais correspondem aos termos GO pertencentes a mesma categoria funcional.

Os transcritos que aumentaram a expressão no período de 12 dias de estresse hídrico foram associados a degradação de benzoato e síntese de pseudouridina-tRNA. Benzoatos (ou ácidos benzoicos) são ácidos carboxílicos

aromáticos precursores de vários metabólitos secundários de plantas. Um dos compostos mais importantes derivado do benzoato em plantas é o ácido salicílico, que atua na sinalização e resposta a estresses bióticos e abióticos (Vlot *et al.*, 2009; Widhalm & Dudareva, 2015). Além disso, muitos benzoatos são derivados da degradação de lignina e podem ser utilizados por bactérias como fonte de carbono. Assim sendo, é comum detectar vias metabólicas relacionadas a degradação de benzoato em estudos de consórcios microbianos degradadores de lignina (Lange *et al.*, 2013; Carlos *et al.*, 2018; Moraes *et al.*, 2018). Os benzoatos também podem ser liberados pelas raízes das plantas e atraírem micro-organismos para a rizosfera (Parales & Harwood, 2002; Wu *et al.*, 2015). Portanto, a presença de transcritos relacionados a degradação desse composto aromático na rizosfera de cana-de-açúcar sob 12 dias de estresse hídrico sugere que, nessas condições, os micro-organismos capazes de degradar benzoato foram favorecidos provavelmente pelo maior depósito de lignina no solo ou pela liberação desse composto pelas raízes.

A presença de transcritos relacionados a mobilidade (montagem de flagelo de tipo bacteriano) e secreção (sistema de secreção de proteínas pelo sistema de secreção do tipo III) bacteriana, inseridos na via de catabolismo de benzoato reforçam a hipótese de que determinados micro-organismos estão sendo atraídos pela cana-de-açúcar através do benzoato ou outros compostos. O sistema de secreção tipo III bacteriano é responsável por exportar macromoléculas, chamada de proteínas efectoras, para o interior de células eucarióticas hospedeiras, desempenhando um importante papel na virulência em fito-patógenos ou em interações simbióticas no caso de bactérias benéficas. Além disso, estudos vêm reportando a expressão desse sistema em condições de alta salinidade (Galán & Collmer, 1999; Haller *et al.*, 2000; Aspedon *et al.*, 2006). Marchi *et al.* (2013) sequenciaram o genoma da bactéria *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp capaz de reduzir a incidência de uma doença em raízes de trigo. Os autores relataram a presença de diferentes sistemas de secreção, incluindo o do tipo III, no genoma da bactéria e reportaram que alguns genes codificadores de proteínas envolvidos na montagem desses sistemas foram expressos de forma basal durante a colonização na planta. Esses dados sugerem que o sistema de secreção do tipo III desempenha um papel importante na adaptação de *P. fluorescens* na rizosfera. A mobilidade por flagelo também é uma característica importante para a colonização da rizosfera e pode ser influenciado por diferentes tipos de exsudados radiculares (Chaparro *et al.*, 2012). Todos os transcritos relacionados à

degradação de benzoato, foram relacionados a ordem Sphingomonadales (alguns transcritos puderam ser classificados dentro da família Erythrobacteraceae) e a família Xanthomonadaceae (com alguns transcritos classificados como *Rhodanobacter*), indicando que esses grupos de bactérias podem estar participando do metabolismo desse composto aromático na rizosfera.

1.3.7. Perfil de expressão dos genes da microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001

Os valores de expressão, em TMM, para cada transcrito diferencialmente expresso foram representados na Figura 1.14. Foi possível observar um padrão não linear da expressão dos transcritos ao longo do estresse hídrico, revelando uma resposta complexa da microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar frente às mudanças ambientais impostas pelo experimento. Essa complexidade é esperada uma vez que inúmeros fatores são responsáveis pela modulação da comunidade microbiana.

Em resposta à seca, os solos sofrem inúmeras alterações químicas, enquanto que as plantas sofrem alterações fisiológicas, em um esforço para se proteger de seus efeitos nocivos. Entre as mudanças do solo, podemos citar as variações no conteúdo e mobilidade de nutrientes, aumento na concentração de solutos e variações na disponibilidade de oxigênio. Nas plantas, as alterações mais importantes são as alterações no perfil do exsudato radicular, na produção de compostos secundários, queda da taxa fotossintética e alteração na morfologia da raiz. Cada um desses fatores pode influenciar os outros, formando uma complexa rede de interação, o que torna extremamente difícil obter uma compreensão verdadeiramente integrada do efeito da seca no microbioma das raízes (Naylor & Coleman-Derr, 2018).

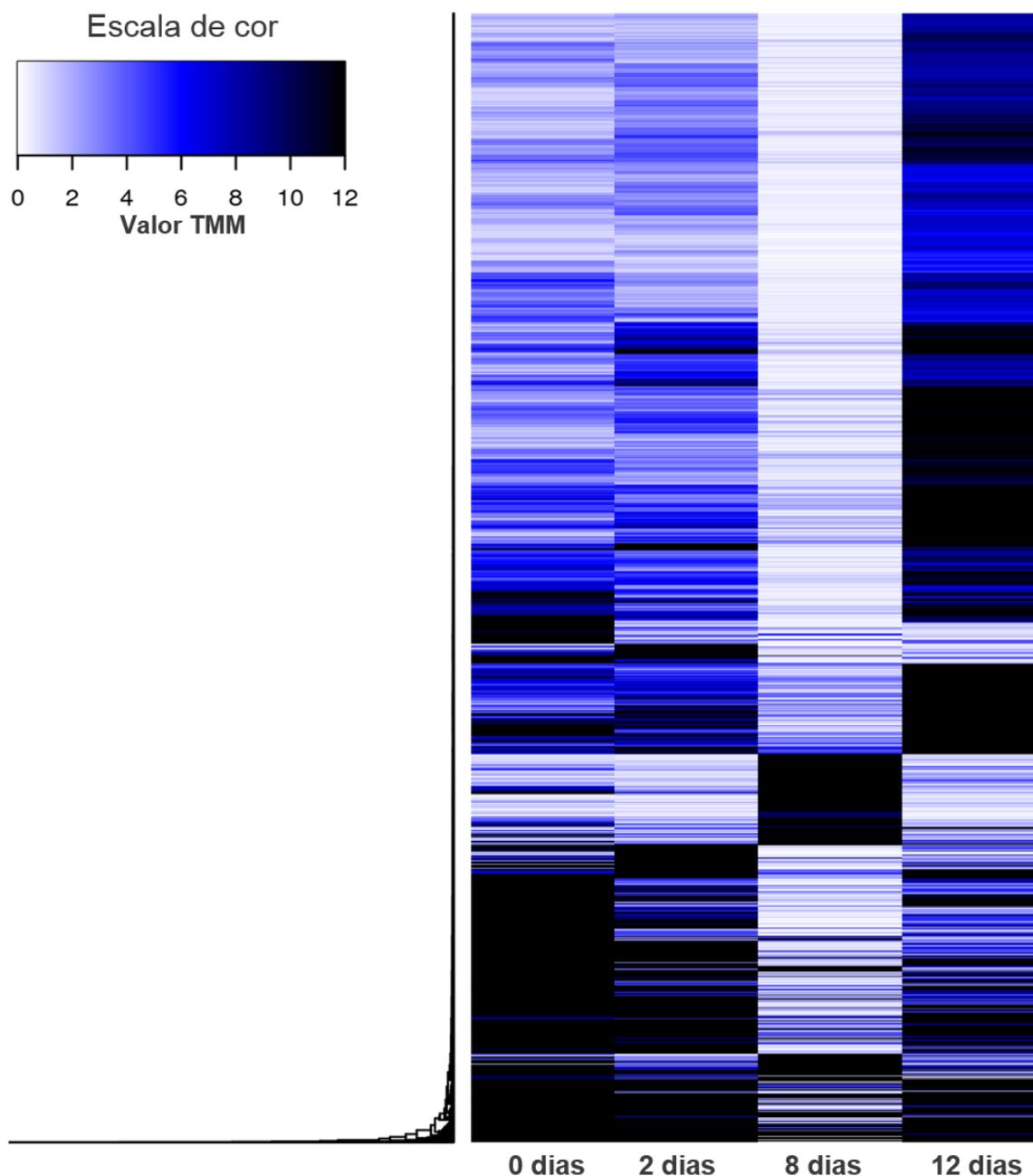


Figura 1.14. Perfis dos genes diferencialmente expressos entre as amostras da rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001 submetidas às diferentes condições de estresse hídrico. Os valores estão expressos em TMM.

Para elucidar o comportamento dos transcritos diferencialmente expressos ao longo dos tratamentos, eles foram analisados pelo programa SOM a fim de agrupá-los com base em seu perfil de expressão ao longo de todo o tempo de estresse hídrico (Figura 1.15). Para cada perfil de expressão encontrado (total de nove) foram realizadas as análises de enriquecimento de GOs e determinados os gêneros mais abundantes.

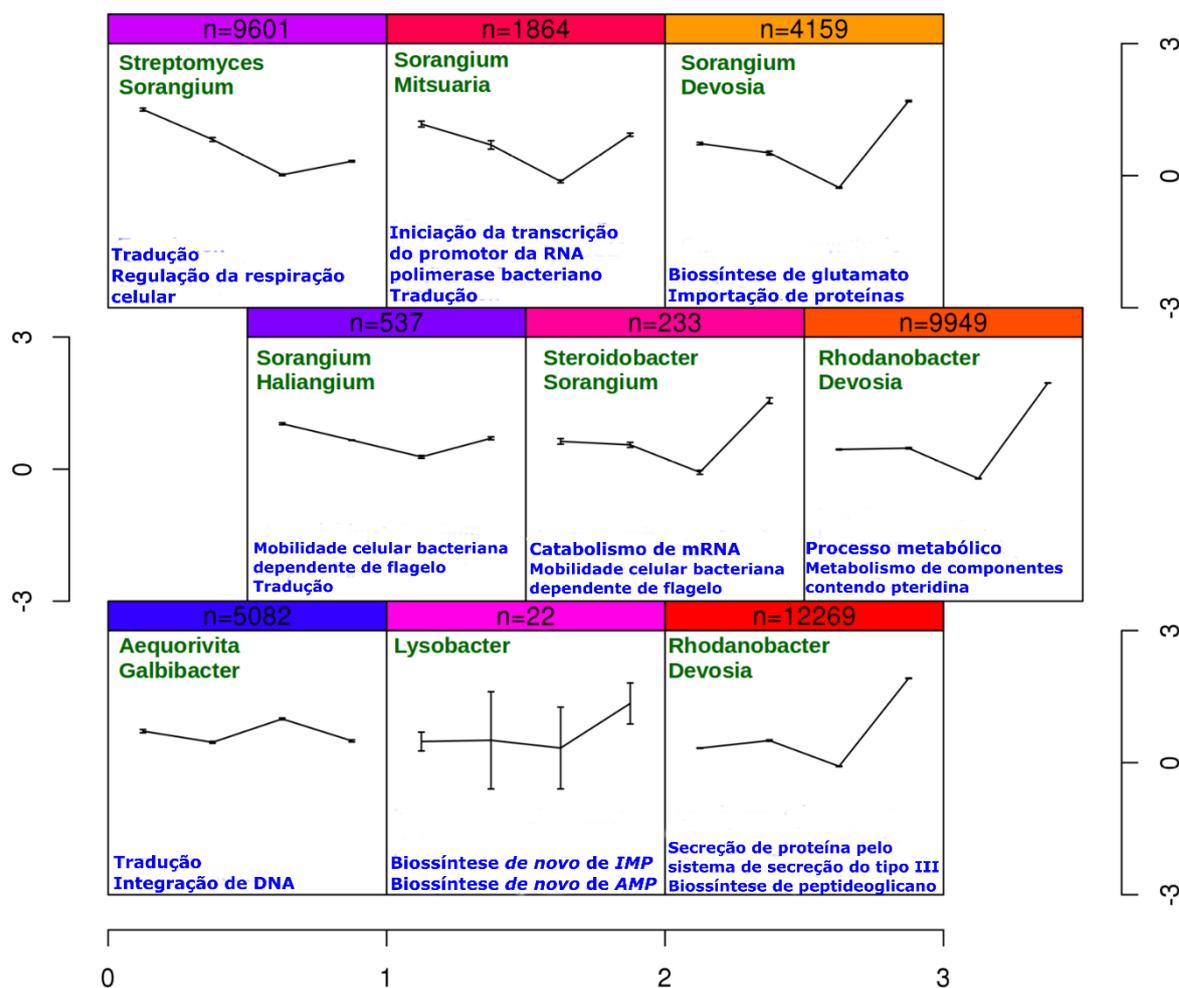


Figura 1.15. *Self-organizing map* (SOM) análise dos 43.715 transcritos diferencialmente expressos na microbiota associada a rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001. Em cada quadro, o eixo x indica amostras (0, 2, 8 e 12 dias de estresse hídrico) e o eixo y indica a média centralizada da expressão gênica de um determinado conjunto de transcritos (valor “n” na parte superior). Cores similares na parte superior indicam semelhança no padrão de expressão dos transcritos. Cada quadro contém o nome dos dois GO mais enriquecidos (menor valor de p) e os gêneros mais abundantes relacionados ao perfil de expressão apresentado.

De acordo com a análise do SOM (Figura 1.15), foi possível observar que a maioria dos transcritos apresentou uma queda na expressão com oito dias de estresse hídrico, seguida de um aumento na expressão quando a seca atingiu 12 dias. Esse perfil de expressão foi observado em cinco grupos de transcritos ($n= 12.269$, 233 , 9.949 , 1.864 e 4.159). Nesses grupos, as categorias funcionais mais

enriquecidas estavam associadas a funções basais do metabolismo microbiano como transcrição, degradação de mRNA, tradução de proteínas, metabolismo de pteridinas (cofatores enzimáticos e precursores de várias moléculas fundamentais) e respiração. Além disso, transcritos associados à mobilidade dependente de flagelo e sistema de secreção do tipo III também foram reportados. Essas funções desempenham papel importante no reconhecimento de sinais externos e colonização de plantas no ambiente da rizosfera (Timm *et al.*, 2016; Altaf, & Ahmad, 2017).

As funções associadas à síntese de peptidoglicano e de glutamato também foram enriquecidas nesses grupos de transcritos e são relacionadas à sobrevivência dos micro-organismos a condições de estresse. Peptidoglicano é o principal componente da parede celular das bactérias, desempenhando um papel fundamental na manutenção da estrutura celular, crescimento e fornecendo tolerância à pressão osmótica e estresse mecânico. De modo geral, as bactérias Gram-positivas parecem ser mais resistentes à seca do que as bactérias Gram-negativas, devido a uma camada mais espessa de peptidoglicano (Cloud-Hansen *et al.*, 2006; Schimel *et al.*, 2007; Radkov *et al.*, 2018). O glutamato é um aminoácido não essencial que participa da síntese de proteínas e processos fundamentais como glicólise e ciclo do ácido cítrico. No entanto, esse aminoácido também pode estar envolvido em respostas ao estresse em bactérias (Feehily & Karatzas, 2013). Em estresse osmótico, as células acumulam potássio e aumentam a síntese de glutamato para contrabalançar os altos níveis desse íon. Dessa forma, o glutamato atua como soluto compatível, ou seja, se acumula dentro das células, equilibrando a osmolaridade do meio e permitindo que as enzimas funcionem de forma eficiente. No entanto, os altos níveis de glutamato fornecem uma proteção temporária e atuam como um sinal intracelular de estresse osmótico, induzindo a captação de compostos osmoprotetores. Tais compostos são geralmente proteínas que podem ser captadas do meio para atuarem como solutos compatíveis, o que explica a presença da função de importação de proteínas presente nos dados do metatranscriptoma, juntamente com a síntese de peptidoglicano e síntese de glutamato (Brown, 1990; Goude *et al.*, 2004; Wood, 2011).

Os gêneros mais abundantes presentes nos cinco grupos de transcritos analisados foram *Sorangium*, *Devosia*, *Rhodanobacter*, *Steroidobacter* e *Mitsuaria*. Todos esses grupos bacterianos já foram reportados em solos e rizosfera de diferentes plantas, incluindo cana-de-açúcar (Rivas *et al.*, 2003; Salla *et al.*, 2014;

Huang *et al.*, 2017; Dong *et al.*, 2018). Além disso, esses gêneros tem o potencial de promover o crescimento vegetal e tolerar estresses abióticos.

O gênero *Sorangium* foi particularmente interessante, pois apresentou alta abundância em vários dos grupos gerados pelo programa SOM. Essa bactéria é especializada na degradação de vários polissacarídeos (incluindo celulose) e já foi reportada em rizosfera de plantas lenhosas (Uroz *et al.*, 2010), amendoim (Haldar *et al.*, 2011), solos de plantações de milho (Pathan *et al.*, 2015), e nos biomas brasileiros da Caatinga (Lacerda Júnior *et al.*, 2017) e manguezais (Thompson *et al.*, 2013), sugerindo sua versatilidade em colonizar diversos ambientes. Dessa forma, é possível que membros desse gênero obtiveram vantagens na rizosfera da cana-de-açúcar devido a sua capacidade de degradar compostos complexos. O gênero *Mitsuaria* foi recentemente isolado da rizosfera de *Arabidopsis thaliana* e testado para promover resistência à seca nessa planta e também em milho. Os resultados mostraram que essa bactéria foi capaz de produzir a enzima ACC deaminase e alterar a estrutura radicular de *A. thaliana* além de reduzir a evapotranspiração e alterar o conteúdo de fito-hormônio em milho quando as plantas estavam sob estresse hídrico (Huang *et al.*, 2017).

Dois grupos de transcritos apresentaram queda na expressão ao longo do estresse hídrico, exibindo os valores mais baixos nas amostras com oito dias de estresse (n = 9.601 e 537). Diferentemente dos cinco grupos mencionados anteriormente, os transcritos desses dois grupos não apresentaram aumento significativo da expressão aos 12 dias de estresse, permanecendo com valores de expressão abaixo daqueles encontrados para a condição controle. Nesses transcritos, as funções celulares mais enriquecidas foram associadas à tradução, regulação da respiração celular e mobilidade dependente de flagelo. Os gêneros associados a esses transcritos foram *Streptomyces* e *Haliangium*. *Streptomyces* é um importante membro da comunidade microbiana do solo e da rizosfera devido sua capacidade de degradar compostos complexos, produzir antibióticos e promover o crescimento das plantas (Schrey & Tarkka, 2008). Espécies do gênero *Haliangium* são capazes de produzir antifúngicos, desempenhando um papel importante na proteção das plantas contra agentes patogênicos (Fudou *et al.*, 2001; Fudou *et al.*, 2002). Dessa forma, a diminuição da atividade e mobilidade celular desses gêneros bacterianos nas amostras submetidas ao estresse hídrico por oito e 12 dias pode sugerir uma diminuição de possíveis interações benéficas entre essas bactérias e as plantas.

Apenas um grupo da análise do SOM (n = 5.082) apresentou transcritos com um perfil de expressão diferente dos demais. Nesse grupo, os transcritos apresentaram um aumento na expressão nas amostras submetidas a oito dias de estresse hídrico, se comportando de forma oposta à maioria dos outros transcritos. As categorias funcionais mais enriquecidas nesse grupo foram relacionadas a metabolismo de DNA (integração de DNA) e tradução. Os gêneros mais abundantes nesse grupo foram *Aequorivita* e *Galbibacter*. *Aequorivita* é particularmente abundante em solos e oceanos da Antártica (Bowman & Nichols, 2002; Shrivage *et al.*, 2007), mas também já foi encontrado associado a algas verdes (Park *et al.*, 2009) e em zona intertidal (Liu *et al.*, 2013). O gênero *Galbibacter*, por sua vez, foi inicialmente isolado em sedimento marinho (Khan *et al.*, 2007), mas recentemente tem sido reportado em algumas amostras de solos (Xiaoying *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2018). Portanto, até este trabalho, esses dois gêneros não tinham sido reportados em rizosfera de cana-de-açúcar. O comportamento oposto da expressão desses transcritos indica que a atividade desses gêneros foi favorecida nas amostras submetidas a oito dias de estresse hídrico, enquanto que a expressão dos demais grupos microbianos analisados diminuiu nessas mesmas condições. Um pequeno grupo de transcritos (n = 22) apresentou uma alta variação nos dados de expressão, por isso seu perfil de expressão não foi discutido nesse trabalho.

1.3.8. Influência dos exsudados radiculares sobre o perfil de expressão gênica da microbiota associada a rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001

Um total de 11.890 transcritos que apresentaram diferença significativa na expressão entre a condição controle (0 dias) e algum dos tratamentos de estresse hídrico foram correlacionados com ácidos cítrico, isocítrico e málico, exsudados pelas raízes da cana-de-açúcar. Esses três ácidos orgânicos apresentaram mudanças significativas nas taxas de exsudação ao longo do estresse.

Baseado na correlação de Spearman ($p < 0,05$), 657 (5,5%) transcritos foram correlacionados com pelo menos um dos ácidos orgânicos analisados (Tabela 1.6). Entre esses transcritos, 83 (12,6%) foram anotados em alguma categoria funcional dos bancos de dados do SEED, KEGG ou GO e 270 (41,1%) foram classificados em algum nível taxonômico.

Tabela 1.6. Número de transcritos que apresentou correlação significativa (Spearman $p < 0,05$) com os ácidos cítrico, isocítrico e málico, exudados pelas raízes de cana-de-açúcar CTC9001.

Ácido orgânico	Número de transcritos	
	Correlação positiva ($r_s > 0,8$)	Correlação negativa ($r_s < -0,8$)
Cítrico	25	241
Isocítrico	40	255
Málico	23	479
Total	88	975
Total (não repetidos)	50	607

Bacteroidetes foi o filo mais abundante entre os transcritos anotados (28,5%) e que apresentaram correlações significativas com os ácidos orgânicos analisados. Esse filo geralmente é descrito como pouco comum entre os membros da comunidade microbiana do solo. No entanto, o avanço das tecnologias de sequenciamento em larga escala permitiu explorar esse grupo de micro-organismos, entender seu papel na microbiota e sua interação com fatores ambientais (Thomas *et al.*, 2011; Wolińska *et al.*, 2017). Shi *et al.* (2011) estudaram o efeito dos ácidos quinico, láctico e maleico (identificados na rizosfera de *Pinus radiata*) na composição microbiana de solo em ensaios de microcosmos utilizando eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) do gene de rRNA 16S e microarrajó. Os autores relataram que a presença desses ácidos influenciou positivamente a abundância de Bacteroidete no solo. Chaparro *et al.* (2014) avaliaram a comunidade microbiana da rizosfera de *Arabidopsis thaliana* em diferentes estágios de desenvolvimento, por pirosequenciamento. Os resultados indicaram que o filo Bacteroidetes não apenas constituía o microbioma *core* da rizosfera de *A. thaliana*, mas também era influenciado pela idade da planta e pelos exsudados radiculares liberados na rizosfera. Recentemente, Wolińska *et al.* (2017) reportaram a presença de Bacteroidetes como um indicador biológico sensível ao uso do solo, uma vez que sua abundância foi menor em solos utilizados para fins agrícolas em comparação a solos não explorados, além disso, sua abundância foi influenciada por fatores como condutividade elétrica, pH, teores de sódio, entre outros.

Nesse trabalho, transcritos pertencentes à Bacteroidetes que foram negativamente correlacionados com o ácido cítrico, isocítrico e málico foram anotados como proteínas ribossomais, proteínas envolvidas na tradução e proteínas de ligação ao DNA (Anexo I). As proteínas ribossomais fazem parte da estrutura do ribossomo e, portanto, desempenham um papel fundamental no processo de tradução nas células bacterianas (Korobeinikova *et al.*, 2012), enquanto que, as proteínas de ligação ao DNA, regulam muitos processos biológicos importantes, como o transporte e tradução de RNA, empacotamento de DNA, recombinação genética, replicação e reparo de DNA (Cai & Huang, 2012). Portanto, a correlação negativa entre os ácidos orgânicos e os transcritos associados a essas funções celulares pode sugerir uma modificação na expressão gênica dos membros desse filo em resposta a variação na taxa dos exsudados radiculares. Entre as bactérias do filo Bacteroidetes que se relacionaram de forma negativa com os ácidos orgânicos (diminuição na expressão dos transcritos quando houve aumento na exsudação dos ácidos orgânicos), a maioria foi identificada como pertencente à ordem Cytophagales e a Bacteroidetes não identificados.

Os transcritos correlacionados positivamente com pelo menos um dos ácidos orgânicos analisados (aumento na expressão dos transcritos quando houve aumento na exsudação dos ácidos orgânicos) e pertencentes ao filo Bacteroidetes foram associados a proteínas de transporte, peptidases, transporte de elétrons e o fator de transcrição sigma-70 (Anexo II). A grande parte desses transcritos foi identificada como pertencentes ao gênero *Aequorivita* ou sua família Flavobacteriaceae, sugerindo que esse grupo de bactérias foi particularmente influenciado pela modificação da taxa de exsudação dos ácidos orgânicos durante o período de estresse hídrico (Figura 1.16).

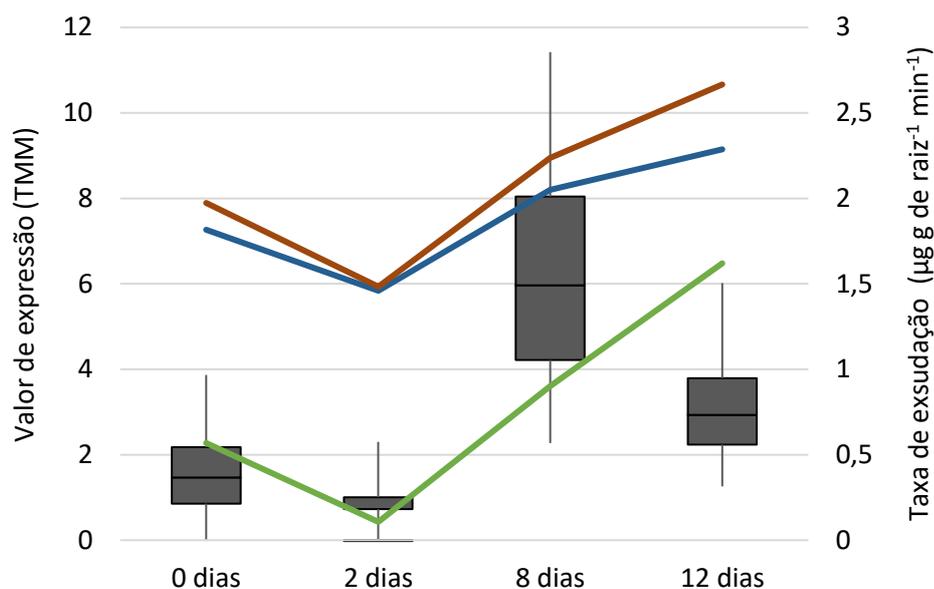


Figura 1.16. Perfil de expressão dos transcritos do gênero *Aequorivita* e da família Flavobacteriaceae (*box plot*) positivamente correlacionados com os ácidos cítrico (linha azul), isocítrico (linha amarela) e málico (linha vermelha) durante o estresse hídrico. Os valores de expressão e da taxa de exsudação foram normalizados ($\log_{10} + 1$).

As principais funções associadas ao gênero *Aequorivita* que foram correlacionadas com os ácidos orgânicos foram relacionadas a sistemas de transporte de membrana, incluindo a importação e exportação do açúcar L-fucose, lipoproteínas, oligopeptídeos, fosfato e outros compostos inorgânicos. O transporte do açúcar fucose (*L-fucose permease*) é particularmente interessante por conferir vantagens às bactérias que possuem esse sistema. Esse açúcar é encontrado em muitas glicoproteínas e glicolípídeos metabolizados por micro-organismos, plantas e animais. Em estudos do microbioma intestinal de mamíferos, as bactérias capazes de utilizar fucose como fonte de carbono apresentavam vantagem competitiva nesse ambiente (Gunn *et al.*, 1994; Hooper *et al.*, 1999; Stahl *et al.*, 2011). A família de transportadores de oligopeptídeos (*POT family*) é responsável pela captação de peptídeos para serem utilizados como fonte de nitrogênio, fator importante para a sobrevivência e crescimento das bactérias (Gomolplitinant & Saier, 2011; Newstead, 2017). O sistema de transporte de lipoproteínas, por sua vez, medeia a liberação de lipoproteínas recém-sintetizadas da membrana citoplasmática de bactérias Gram-negativas,

resultando na formação da membrana externa e promovendo maior proteção às células (Yasuda *et al.*, 2009). Na rizosfera, os ácidos orgânicos exsudados pelas raízes das plantas podem atuar como fonte de carbono e nitrogênio, quelantes de minerais pouco solúveis e acidificantes do solo, o que aumenta a disponibilidade de nutrientes para os micro-organismos. Como resultado dessas propriedades, os ácidos orgânicos podem induzir um aumento na mineralização de nutrientes do solo pelas bactérias (Dakora & Phillips, 2002; Keiluweit *et al.*, 2015). Assim sendo, os ácidos cítrico, isocítrico e málico avaliados nesse trabalho podem ter contribuído para o aumento da captação de compostos orgânicos pelas bactérias do gênero *Aequorivita*, explicando sua correlação com transcritos associados ao transporte de nutrientes.

Transcritos relacionados a síntese de cianoficina e proteínas de ligação ao DNA do gênero *Aequorivita* também foram correlacionados de forma positiva com os ácidos orgânicos avaliados. A cianoficina é um polímero formado por um grupo secundário de ácido aspártico e grupos laterais de arginina. Esse polímero é insolúvel em condições fisiológicas e é acumulado na forma de grânulos no citoplasma sob condições de privação de fosfato ou enxofre e altas concentrações de dióxido de carbono. Dessa forma, esses grânulos funcionam como uma reserva temporária de nitrogênio (Krehenbrink *et al.*, 2002; Oppermann-Sanio & Steinbüchel, 2002). Apesar de ser encontrado amplamente em cianobactérias, o gene *cyanophycin synthetase*, responsável pela produção de cianoficina também foi encontrada em outros grupos de bactérias heterotróficas como *Acinetobacter* sp. (Krehenbrink *et al.*, 2002), *Desulfitobacterium hafniense* (Ziegler *et al.*, 2002) e em várias Beta e Gammaproteobactérias (Füser & Steinbüchel, 2007). Devido às suas características físico-químicas, a cianoficina vem sendo estudada para aplicação como suplemento nutricional ou um substituto biodegradável do poliacrilato (Oppermann-Sanio & Steinbüchel, 2002; Solaiman *et al.*, 2011).

Os transcritos relacionados a proteínas de ligação ao DNA foram anotados como topoisomerase (*topoisomerase IV subunit A*), transposase (*transposase activity*) e fator de transcrição sigma-70 (*RNA polymerase sigma-70 factor*). Topoisomerasas são proteínas que atuam diretamente na replicação e empacotamento de DNA (Wang, 1996; Corbett *et al.*, 2005). As transposases, por sua vez, facilitam rearranjos genômicos e influenciam a expressão de genes exógenos. A atividade das transposases geralmente é induzido em condições de estresse celular e podem facilitar na adaptação de ambientes extremos (Nelson *et al.*, 2011; Vigil-Stenman *et*

al., 2017). O fator de transcrição sigma-70 atua na regulação de genes *housekeeping* nas células, tendo papel importante na manutenção das atividades celulares essenciais (Gruber & Gross, 2003).

Os ácidos orgânicos exsudados pelas raízes das plantas podem atuar como sinais químicos para a microbiota da rizosfera, regulando a expressão gênica dos micro-organismos. Esses ácidos orgânicos já foram reportados como indutores de expressão de genes relacionados a mobilidade, catabolismo de compostos aromáticos, genes de resposta ao estresse, regulação do metabolismo de carboidratos e aminoácidos, entre outros (Dakora & Phillips, 2002; Mark *et al.*, 2005; Bais *et al.*, 2006, Scharf *et al.*, 2016). Assim sendo, as correlações positivas entre os ácidos orgânicos avaliados nesse trabalho e os transcritos relacionados a síntese de cianoficina e proteínas de ligação ao DNA sugerem um possível papel regulador desses ácidos na expressão gênica de bactérias do gênero *Aequorivita*.

Os filos Proteobacteria (11,9% dos transcritos anotados) e Ascomycota (7%) apresentaram transcritos correlacionados de forma negativa com os ácidos orgânicos analisados. Os transcritos de Proteobacteria foram associados a mobilidade e quimiotaxia, formação de pilus e flagelo, ao fator de transcrição sigma-70, chaperonas, proteínas ribossomais, assimilação de fosfato inorgânico e sinalização celular. No entanto, a maioria dos transcritos de Proteobacteria não puderam ser anotados em outros grupos taxonômicos (ordem, família e gênero). Os transcritos anotados como Ascomycota não puderam ser anotados funcionalmente.

Como mostrado na sessão 1.3.2 desse trabalho, a taxa de exsudação dos ácidos orgânicos cítrico, isocítrico e málico foram maiores nas amostras submetidas a doze dias de estresse hídrico. Esse resultado sugere que as plantas de cana-de-açúcar da variedade CTC9001 podem ter aumentado a liberação desses exsudados como parte da estratégia para sobreviver ao estresse. Esses ácidos orgânicos desempenharam papéis diferentes em cada grupo microbiano e pode ter colaborado para as mudanças na microbiota da rizosfera observadas nesse trabalho, favorecendo, inibindo ou modificando sua atividade celular.

1.4. Conclusões

A variedade de cana-de-açúcar CTC9001 não apresentou mudanças no seu crescimento e teor de água durante o período de estresse hídrico analisado, confirmando sua resistência a baixos teor de água no solo. No entanto, foram detectadas diferenças na taxa de exsudação radicular dos ácidos cítrico, isocítrico e málico pelas raízes dessa variedade nas amostras submetidas a doze dias de estresse hídrico. A análise dos dados de metatranscritoma mostrou que os filos microbianos que responderam ao estresse hídrico foram, principalmente, Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes. Também foi possível observar funções celulares importantes para a colonização e sobrevivência dessas bactérias no ambiente da rizosfera. O estresse hídrico provocou mudanças na composição e na atividade microbiana, principalmente nas amostras submetidas a oito dias de estresse hídrico. Nessas condições, os gêneros *Sorangium*, *Rhodanobacter*, *Steroidobacter*, *Streptomyces*, *Haliangium* e *Mitsuaria* diminuíram sua expressão gênica, sugerindo uma diminuição da interação desses gêneros com as plantas. Por outro lado, houve aumento na expressão de transcritos do gênero *Aequorivita* (Flavobacteriaceae) nas amostras submetidas a oito e doze dias de estresse hídrico. Os resultados sugerem que além de sobreviver ao de estresse hídrico, esse grupo bacteriano foi capaz de interagir com as plantas de cana-de-açúcar nessa condição. Os dados de correlação dos transcritos e os ácidos orgânicos (cítrico, isocítrico e málico) corroboram esses resultados, uma vez que o aumento da taxa de exsudação radicular desses ácidos nas condições de estresse hídrico foi correlacionado de forma positiva com os membros do gênero *Aequorivita*, o que não foi observado para os demais gêneros.

1.5. Referências Bibliográficas

- Abrahão A, Lambers H, Sawaya AC, Mazzafera P, Oliveira RS (2014) Convergence of a specialized root trait in plants from nutrient-impooverished soils: phosphorus-acquisition strategy in a nonmycorrhizal cactus. *Oecologia*, 176(2): 345-355.
- Alexa A, Rahnenfuhrer J (2016) *topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology*. R package version 2.32.0.
- Altaf MM, Ahmad I (2017) In vitro and In vivo biofilm formation by *Azotobacter* isolates and its relevance to rhizosphere colonization. *Rhizosphere*, 3: 138-142.
- Alteri CJ, Mobley HLT (2016) The versatile type VI secretion system. *Microbiology spectrum*, 4(2): 1-26.
- Asaf S, Khan AL, Khan MA *et al.* (2017) Osmoprotective functions conferred to soybean plants via inoculation with *Sphingomonas* sp. LK11 and exogenous trehalose. *Microbiological Research*, 205: 135-145.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA *et al.* (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*, 25(1): 25-9.
- Aspedon A, Palmer K, Whiteley M (2006) Microarray analysis of the osmotic stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 188(7): 2721–2725.
- 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 Review of Plant Biology*, 57: 233-266.
- Baldani JI, Videira SS, dos Santos Teixeira KR *et al.* (2014) The family Rhodospirillaceae. In: Edward F, DeLong EF, Stephen L *et al.* (eds.) *The Prokaryotes* (pp. 533-618). Springer Berlin Heidelberg.
- Baraniya D, Nannipieri P, Kublik S *et al.* (2017) The impact of the diurnal cycle on the microbial transcriptome in the rhizosphere of barley. *Microbial Ecology*, 75(4): 830-33.
- Bell SD (2005) Archaeal transcriptional regulation - variation on a bacterial theme? *Trends in Microbiology*, 13(6): 262-265.
- Borland S, Oudart A, Prigent-Combaret C *et al.* (2015) Genome-wide survey of two-component signal transduction systems in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum*. *BMC Genomics*, 16(1): 1-17.
- Bowman JP, Nichols DS (2002) *Aequorivita* *gen. nov.*, a member of the family Flavobacteriaceae isolated from terrestrial and marine Antarctic

- habitats. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(5): 1533-1541.
- Brown AD, Wiley J (1990) Frenzied and phlegmatic responses to salt stress in microbes. *TIBTECH*, 8: 365.
- Buchfink B, Xie C, Huson DH (2015) Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature methods*, 12(1), 59-60.
- Cai YH, Huang H (2012) Advances in the study of protein-DNA interaction. *Amino Acids*, 43(3): 1141-1146.
- Candela T, Fouet A (2006) Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Molecular Microbiology*, 60(5): 1091-1098.
- Carlos C, Fan H, Currie C (2018) Substrate shift reveals roles for members of bacterial consortia in degradation of plant cell wall polymers. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1-10.
- Carvalho LC, Schenk PM (2013) Sample processing and cDNA preparation for microbial metatranscriptomics in complex soil communities. 1 ed., Vol. 531. Elsevier Inc.
- Cecchini G (2003) Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1): 77-109.
- Champomier Vergès MC, Zuñiga M, Morel-Deville F *et al.* (1999) Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. *FEMS Microbiology Letters*, 180(2): 297-304.
- Chaparro JM, Badri DV, Vivanco JM (2014) Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME Journal*, 8(4): 790-803.
- Chaparro JM, Sheflin A, Manter D, Vivanco JM (2012) Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 48(5): 489-499.
- Chistoserdova L (2015) Methylophs in natural habitats: current insights through metagenomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(14): 5763-5779.
- Claessen D, Rozen DE, Kuipers OP, Søgaard-Andersen L, Van Wezel GP (2014) Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nature Reviews Microbiology*, 12(2): 115-124.
- Cloud-Hansen KA Peterson SB, Stabb EV *et al.* (2006) Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 4(9): 710-716.

- Colla G, Roupshael Y, Di Mattia E, El-Nakhel C, Cardarelli M (2015) Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(8): 1706-1715.
- Corbett KD, Schoeffler AJ, Thomsen ND, Berger JM (2005) The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV. *Journal of Molecular Biology*, 351(3): 545-561.
- Dakora FD, Phillips DA (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil*, 245: 35–47.
- D'Angioli AM, Viani RAG, Lambers H, Sawaya ACHF, Oliveira RS (2017) Inoculation with *Azospirillum brasilense* (Ab-V4, Ab-V5) increases *Zea mays* root carboxylate-exudation rates, dependent on soil phosphorus supply. *Plant and Soil*, 410(1-2): 499-507.
- Da Costa DP, Dias ACF, Durrer A, *et al.* (2014) Composição diferencial das comunidades bacterianas na rizosfera de variedades de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 38(6): 1694-1702.
- De Souza RSC, Okura VK, Armanhi JSL *et al.* (2016) Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Scientific Reports*, 6: 1-15.
- Desiderato JG (2017) Metagenômica e bioinformática aplicada à bioenergia: explorando um consórcio bacteriano degradador de biomassa metagenômica e bioinformática aplicada à bioenergia. Dissertação (mestrado), Jaboticabal, 96pp.
- Dong M, Yang Z, Cheng G *et al.* (2018) Diversity of the bacterial microbiome in the roots of four saccharum species: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, and *S. officinarum*. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1-10.
- Du R, Yan J, Li S *et al.* (2015) Cellulosic ethanol production by natural bacterial consortia is enhanced by *Pseudoxanthomonas taiwanensis*. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1): 1-10.
- Evtushenko LI, Takeuchi M (2006) The family Microbacteriaceae. In: Edward F, DeLong EF, Stephen L *et al.* *The Prokaryotes* (pp. 1020-1098). Springer Berlin Heidelberg.
- Fagerland MW, Sandvik L (2009) The wilcoxon–mann–whitney test under scrutiny. *Statistics in medicine*, 28(10): 1487-1497.

- Feehily C, Karatzas KA (2013) Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *Journal of Applied Microbiology*, 114(1): 11-24.
- Fonknechten N, Perret A, Perchat N *et al.* (2009) A conserved gene cluster rules anaerobic oxidative degradation of L-ornithine. *Journal of Bacteriology*, 191(9): 3162-3167.
- Franzosa EA, Hsu T, Sirota-Madi A *et al.* (2015) Sequencing and beyond: integrating molecular 'omics' for microbial community profiling. *Nature Reviews Microbiology*, 13(6): 360-372.
- Fudou R, Iizuka T, Yamanaka S (2001) Haliangicin, a novel antifungal metabolite produced by a marine myxobacterium. *The Journal of Antibiotics*, 54(2): 149-152.
- Fudou R, Jojima Y, Iizuka T, Yamanaka S (2002) *Haliangium ochraceum* gen. nov., sp. nov. and *Haliangium tepidum* sp. nov.: novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 48(2): 109-115.
- Füser G, Steinbüchel A (2007) Analysis of genome sequences for genes of cyanophycin metabolism: Identifying putative cyanophycin metabolizing prokaryotes. *Macromolecular Bioscience*, 7(3): 278-296.
- Galán JE, Collmer A (1999) Type III secretion machines: Bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 284(5418): 1322-1328.
- Gallique M, Bouteiller M, Merieau A (2017) The type VI secretion system: a dynamic system for bacterial communication? *Frontiers in Microbiology*, 8: 1-10.
- Garcia R, Müller R (2014) The family Polyangiaceae. In: Edward F, DeLong EF, Stephen L *et al.* *The Prokaryotes* (pp. 247-279). Springer Berlin Heidelberg.
- Georgellis D, Kwon O, Lin EC (2001) Quinones as the redox signal for the Arc two-component system of bacteria. *Science*, 292(5525): 2314-2316.
- Glaeser SP, Kämpfer P (2014) The family Sphingomonadaceae. In: Edward F, DeLong EF, Stephen L *et al.* *The Prokaryotes* (pp. 641-707). Springer Berlin Heidelberg.
- Gilbert JA, Field D, Huang Y *et al.* (2008) Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. *PloS one*, 3(8): e3042.
- Gomolplitinant KM, Saier MH (2011) Evolution of the oligopeptide transporter family. *Journal of Membrane Biology*, 240(2): 89-110.
- Goude R, Renaud S, Bonnassie S *et al.* (2004) Glutamine, glutamate, and α -glucosylglycerate are the major osmotic solutes accumulated by *Erwinia*

- chrysanthemii* strain 3937. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11): 6535-6541.
- Gruber TM, Gross CA (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1): 441-466.
- Guimarães ACR (2011) Caracterização de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) submetidas a déficit hídrico. Dissertação (Mestrado). Piracicaba, 67 pp.
- Guimarães CM, Stone LF (2008) Métodos de avaliação das condições hídricas das plantas. *Embrapa Arroz e Feijão-Comunicado Técnico*.
- Gunn FJ, Tate CG, Henderson PJ (1994) Identification of a novel sugar-H⁺ symport protein, FucP, for transport of L-fucose into *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 12(5): 799-809.
- Gur E, Biran D, Ron EZ (2011) Regulated proteolysis in Gram-negative bacteria-how and when? *Nature Reviews Microbiology*, 9(12): 839-848.
- Haldar S, Choudhury SR, Sengupta S (2011) Genetic and functional diversities of bacterial communities in the rhizosphere of *Arachis hypogaea*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(1): 161-170.
- Haller JC, Carlson S, Pederson KJ, Pierson DE (2000) A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence. *Molecular Microbiology*, 36(6): 1436-1446.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1): 1-9.
- He LY, Zhang YF, Ma HY *et al.* (2010) Characterization of copper-resistant bacteria and assessment of bacterial communities in rhizosphere soils of copper-tolerant plants. *Applied Soil Ecology*, 44(1): 49-55.
- Heider J, Mai X, Adams MW (1996) Characterization of 2-ketoisovalerate ferredoxin oxidoreductase, a new and reversible coenzyme A-dependent enzyme involved in peptide fermentation by hyperthermophilic archaea. *Journal of Bacteriology*, 178(3): 780-787.
- Hooper LV, Xu J, Falk PG, Midtvedt T, Gordon JI (1999) A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(17): 9833-9838.
- Huang XF, Zhou D, Lapsansky ER *et al.* (2017) *Mitsuaria sp.* and *Burkholderia sp.* from *Arabidopsis* rhizosphere enhance drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* and maize (*Zea mays L.*). *Plant and Soil*, 419(1-2): 523-539.

- Hu Y, Schmidhalter U (2005) Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(4): 541-549.
- Hugenholtz J (1993) Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3): 165-178.
- Huson DH, Auch AF, Qi J, Schuster SC (2007) MEGAN analysis of metagenome data. *Genome Research*, 17: 377-386.
- Jenal U, Hengge-Aronis R (2003) Regulation by proteolysis in bacterial cells. *Current Opinion in Microbiology*, 6(2): 163-172.
- Jofré E, Lagares A, Mori G (2004) Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production, and root colonization in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, 231(2): 267-275.
- Kamilova F, Kravchenko LV, Shaposhnikov AI *et al.* (2006) Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(3): 250-256.
- Kämpfer P, Glaeser SP, Parkes L, van Keulen G, Dyson P (2014) The Family Streptomycetaceae. In: Edward F, DeLong EF, Stephen L *et al.* *The Prokaryotes* (pp. 889-1010). Springer Berlin Heidelberg.
- Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1): 27-30.
- Kasim WA, Gaafar RM, Abou-Ali RM, Omar MN, Hewait HM (2016) Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(2): 217-227.
- Keiluweit M, Bougoure JJ, Nico PS *et al.* (2015) Mineral protection of soil carbon counteracted by root exudates. *Nature Climate Change*, 5(6): 588.
- Khan ST, Nakagawa Y, Harayama S (2007) *Galbibacter mesophilus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Flavobacteriaceae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(5): 969-973.
- Kita K, Vibat CR, Meinhardt S, Guest JR, Gennis RB (1989) One-step purification from *Escherichia coli* of complex II (succinate: ubiquinone oxidoreductase) associated with succinate-reducible cytochrome b556. *Journal of Biological Chemistry*, 264(5): 2672-2677.

- Kletzin A, Adams MW (1996) Molecular and phylogenetic characterization of pyruvate and 2-ketoisovalerate ferredoxin oxidoreductases from *Pyrococcus furiosus* and pyruvate ferredoxin oxidoreductase from *Thermotoga maritima*. *Journal of Bacteriology*, 178(1): 248-257.
- Konovalova A, Søgaaard-Andersen L, Kroos L (2014) Regulated proteolysis in bacterial development. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(3): 493-522.
- Krehenbrink M, Oppermann-Sanio FB, Steinbüchel A (2002) Evaluation of non-cyanobacterial genome sequences for occurrence of genes encoding proteins homologous to cyanophycin synthetase and cloning of an active cyanophycin synthetase from *Acinetobacter* sp. strain DSM 587. *Archives of Microbiology*, 177(5): 371-380.
- Kruskal WH, Wallis WA (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*. 47(260): 583-621.
- Kumar M, Revathi K, Khanna S (2015) Biodegradation of cellulosic and lignocellulosic waste by *Pseudoxanthomonas* sp R-28. *Carbohydrate Polymers*, 134(1): 761-766.
- Lacerda Júnior GV, Noronha MF, de Sousa STP *et al.* (2017) Potential of semiarid soil from Caatinga biome as a novel source for mining lignocellulose-degrading enzymes. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(2): 1-15.
- Lange H, Decina S, Crestini C (2013) Oxidative upgrade of lignin - recent routes reviewed. *European Polymer Journal*, 49(6): 1151-1173.
- Lee TI, Young RA (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual Review of Genetics*, 34: 77-137.
- Leimena MM, Ramiro-Garcia J, Davids M *et al.* (2013) A comprehensive metatranscriptome analysis pipeline and its validation using human small intestine microbiota datasets. *BMC Genomics*, 14(1): 540.
- Leite MCBS, Pereira APA, Souza AJ *et al.* (2018) Potentially diazotrophic endophytic bacteria associated to sugarcane are effective in plant growth-promotion. *Journal of Experimental Agriculture International*, 21(3): 1-15.
- Li H (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv preprint, arXiv:1303.3997.
- Li B, Yang Y, Ma L *et al.* (2015) Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes. *ISME Journal*, 9(11): 2490-2502.

- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2013) FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7): 923-930.
- Liu Y, Zhou J, White KP (2013) RNA-seq differential expression studies: more sequence, or more replication? *Bioinformatics*, 30(3): 301-4.
- Luo B, Gu W, Zhong J, Wang Y, Zhang G (2015) Revealing crosstalk of plant and fungi in the symbiotic roots of sewage-cleaning *Eichhornia crassipes* using direct de novo metatranscriptomic analysis. *Scientific Reports*, 5: 1-14.
- Ma Y, Pan F, McNeil M (2002) Formation of dTDP-rhamnose is essential for growth of mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 184(12): 3392-3395.
- Macpherson DF, Manning PA, Morona R (1994) Characterization of the dTDP-rhamnose biosynthetic genes encoded in the rfb locus of *Shigella flexneri*. *Molecular Microbiology*, 11(2): 281-292.
- Marchi M, Boutin M, Gazengel K *et al.* (2013) Genomic analysis of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp with evidence of T3SS and T6SS gene expression on plant roots. *Environmental Microbiology Reports*, 5(3): 393-403.
- Mark GL, Dow JM, Kiely PD *et al.* (2005) Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(48): 17454-17459.
- McBride MJ (2014) The family Flavobacteriaceae. In: Edward F, DeLong EF, Stephen L *et al.* *The Prokaryotes* (pp. 643-676). Springer Berlin Heidelberg.
- McDowall JS, Murphy BJ, Haumann M *et al.*, (2014) Bacterial formate hydrogenlyase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(38): E3948-E3956.
- Mehnaz S (2013) Microbes - friends and foes of sugarcane. *Journal of Basic Microbiology*, 53(12): 954-971.
- Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I *et al.* (2012) Deciphering the rhizosphere microbiome. *Science*, 1097(2011): 1097-1100.
- Mohammadipanah F, Hamedi J, Dehghani M (2015) Halophilic bacteria: potentials and applications in biotechnology. In: Maheshwari DK, Saraf M. *Halophiles* (pp. 277-321). Springer, Cham.
- Mohammadipanah F, Wink J (2016) Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-10.

- Moraes EC, Alvarez TM, Persinoti GF *et al.* (2018) Lignolytic-consortium omics analyses reveal novel genomes and pathways involved in lignin modification and valorization. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1): 1-16.
- Naylor D, Coleman-Derr D (2018) Drought stress and root-associated bacterial communities. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1-16.
- Nedashkovskaya OI, Suzuki M, Vysotskii MV, Mikhailov VV (2003) *Reichenbachia agariperforans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium in the phylum Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1): 81-85.
- Nelson WC, Wollerman L, Bhaya D, Heidelberg JF (2011) Analysis of insertion sequences in thermophilic cyanobacteria: exploring the mechanisms of establishing, maintaining, and withstanding high insertion sequence abundance. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15): 5458-5466.
- Newman MM, Lorenz N, Hoilett N *et al.* (2016) Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. *Science of the Total Environment*, 553: 32-41.
- Newstead S (2017) Recent advances in understanding proton coupled peptide transport via the POT family. *Current Opinion in Structural Biology*, 45: 17-24.
- Oppermann-Sanio FB, Steinbüchel A (2002) Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. *Naturwissenschaften*, 89(1): 11-22.
- O'Leary NA, Wright MW, Brister JR *et al.* (2015) Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic acids research*, 44: D733-D745.
- Oren A, Xu XW (2014) The family Hyphomicrobiaceae. In: Edward F, DeLong EF, Stephen L *et al.* The Prokaryotes (pp. 247-281). Springer Berlin Heidelberg.
- Overbeek R, Olson R, Pusch GD *et al.* (2013) The SEED and the rapid annotation of microbial genomes using subsystems technology (RAST). *Nucleic acids research*, 42: D206-D214.
- Parales RE, Harwood CS (2002) Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Current opinion in microbiology*, 5(3): 266-273.
- Park SC, Baik KS, Kim MS *et al.* (2009) *Aequorivita capsosiphonis* sp. nov., isolated from the green alga *Capsosiphon fulvescens*, and emended description of the genus

- Aequorivita. International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(4): 724-728.
- Parks DH, Beiko RG (2010) Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics*, 26(6): 715-721.
- Patel RK, Jain M (2012) NGS QC toolkit: A toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS ONE*, 7(2): e30619.
- Pathan SI, Ceccherini MT, Hansen MA *et al.* (2015) Maize lines with different nitrogen use efficiency select bacterial communities with different β -glucosidase-encoding genes and glucosidase activity in the rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils*, 51(8): 995-1004.
- Paungfoo-Lonhienne C, Lonhienne TGA, Yeoh YK *et al.* (2014) A new species of Burkholderia isolated from sugarcane roots promotes plant growth. *Microbial Biotechnology*, 7(2): 142-154.
- Peng Y, Leung HC, Yiu SM, Chin FY (2012) IDBA-UD: A de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*, 28(11): 1420-1428.
- Pignatelli M, Moya A (2011) Evaluating the fidelity of *de novo* short read metagenomic assembly using simulated data. *PLoS ONE*, 6(5): e19984
- Pisa G, Magnani GS, Weber H *et al.* (2011) Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(12): 1215-1221.
- Poretsky RS, Bano N, Buchan A *et al.* (2005) Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7): 4121-4126.
- Radkov AD, Hsu YP, Booher G, Vannieuwenhze MS (2018) Imaging bacterial cell wall biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 87: 1-24.
- R Development Core Team (2011) R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing. ISBN: 3-900051-07-0.
- Reith J, Mayer C (2011) Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-Positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(1): 1-11.
- Rho M, Tang H, Ye Y (2010) FragGeneScan: Predicting genes in short and error-prone reads. *Nucleic Acids Research*, 38(20): 1-12.

- Rivas R, Willems A, Subba-Rao NS *et al.* (2003) Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Systematic and applied microbiology*, 26(1): 47-53.
- Romão-Dumaresq AS, Dourado MN, De Fávares LCL *et al.* (2016) Diversity of cultivated fungi associated with conventional and transgenic sugarcane and the interaction between endophytic trichoderma virens and the host plant. *PLoS ONE*, 11(7): 1-28.
- Salla TD, da Silva TR, Astarita LV, Santarém ER (2014) *Streptomyces* rhizobacteria modulate the secondary metabolism of Eucalyptus plants. *Plant physiology and biochemistry*, 85: 14-20.
- Sanaullah M, Blagodatskaya E, Chabbi A, Rumpel C, Kuzyakov Y (2011) Drought effects on microbial biomass and enzyme activities in the rhizosphere of grasses depend on plant community composition. *Applied Soil Ecology*, 48(1): 38-44.
- Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda MC, Glick B (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183: 92-99.
- Scharf BE, Hynes MF, Alexandre GM (2016) Chemotaxis signaling systems in model beneficial plant–bacteria associations. *Plant Molecular Biology*, 90(6): 549-559.
- Schimel J, Balser TC, Wallenstein M (2007) Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, 88(6): 1386-1394.
- Schmieder R, Lim YW, Edwards R (2011) Identification and removal of ribosomal RNA sequences from metatranscriptomes. *Bioinformatics*, 28(3): 433-435.
- Schrey SD, Tarkka MT (2008) Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94(1): 11-19.
- Segata N, Boernigen D, Tickle TL *et al.* (2013) Computational meta'omics for microbial community studies. *Molecular Systems Biology*, 9(1): 1-15.
- Sesso F (2013) Variedades de cana-de-açúcar CTC e seu manejo.
- Shapiro SS, Wilk MB (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4): 591-611.
- Shi S, Richardson AE, O'Callaghan M *et al.* (2011) Effects of selected root exudate components on soil bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 77(3): 600-610.
- Shravage BV, Dayananda KM, Patole MS, Shouche YS (2007) Molecular microbial diversity of a soil sample and detection of ammonia oxidizers from Cape Evans, Mcmurdo Dry Valley, Antarctica. *Microbiological research*, 162(1): 15-25.

- Silva J, Silva M (2012) Noções da Cultura da Cana-de-Açúcar. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 105 pp.
- Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, Zdobnov EM (2015) BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19): 3210-2.
- Solaiman DK, Garcia RA, Ashby RD, Piazza GJ, Steinbüchel A (2011) Rendered-protein hydrolysates for microbial synthesis of cyanophycin biopolymer. *New Biotechnology*, 28(6): 552-558.
- Song F, Han X, Zhu X, Herbert S (2012) Response to water stress of soil enzymes and root exudates from drought and non-drought tolerant corn hybrids at different growth stages. *Canadian Journal of Soil Science*, 92(3): 501-507.
- Souza FJM, Pascoaloto IM, Figueiredo PAM, Lima CR, Lisboa LAM (2016) Parâmetros biométricos do crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) nas suas fases iniciais. *Revista Mirante*, 09(01): 159-168.
- Stahl M, Friis LM, Nothaft H *et al.* (2011) L-Fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(17): 7194-7199.
- Stein LY (2017) Methylamine: a vital nitrogen (and carbon) source for marine microbes. *Environmental Microbiology*, 19(6): 2117-2118.
- Stewart FJ, Ottesen EA, DeLong EF (2010) Development and quantitative analyses of a universal rRNA-subtraction protocol for microbial metatranscriptomics. *ISME Journal*, 4(7): 896-907.
- Su X, Lin Z, Lin H (2013) The biosynthesis and biological function of diptamide. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(6): 515-521.
- Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T (2011) Revigo summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS ONE*, 6(7): e21800.
- Tamayo P, Slonim D, Mesirov J *et al.* (1999) Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6): 2907-12.
- Tarazona S, Furió-Tarí P, Turrà D *et al.* (2015) Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Research*, 43(21): e140.

- Thomas F, Hehemann JH, Rebuffet E, Czejek M, Michel G (2011) Environmental and gut Bacteroidetes: the food connection. *Frontiers in Microbiology*, 2: 1-16.
- Thompson CE, Beys-da-Silva WO, Santi L *et al.* (2013) A potential source for cellulolytic enzyme discovery and environmental aspects revealed through metagenomics of Brazilian mangroves. *AMB Express*, 3(1): 65.
- Timm CM, Pelletier DA, Jawdy SS *et al.* (2016) Two poplar-associated bacterial isolates induce additive favorable responses in a constructed plant-microbiome system. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1-10.
- Tóth EM, Borsodi AK (2014) The Family Nocardioidaceae. In: Edward F, DeLong EF, Stephen L *et al.* The Prokaryotes: Actinobacteria (pp. 651-694). Springer Berlin Heidelberg
- Tsukioka Y, Yamashita Y, Oho T, Nakano Y, Koga T (1997) Biological function of the dTDP-rhamnose synthesis pathway in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 179(4): 1126-1134.
- Uehara T, Suefuji K, Valbuena N *et al.* (2005) Recycling of the anhydro-N-acetylmuramic acid derived from cell wall murein involves a two-step conversion to N-acetylglucosamine-phosphate. *Journal of Bacteriology*, 187(11): 3643-3649.
- Uroz S, Buée M, Murat C, Frey-Klett P, Martin F (2010) Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environmental Microbiology Reports*, 2(2): 281-288.
- Vantini JS, Dedemo GC, Jovino Gimenez DV *et al.* (2015) Differential gene expression in drought-tolerant sugarcane roots. *Genetics and Molecular Research*, 14(2): 7196-7207.
- Vavourakis CD, Ghai R, Rodriguez-Valera F *et al.* (2016) Metagenomic insights into the uncultured diversity and physiology of microbes in four hypersaline soda lake brines. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1-18.
- Velázquez E, Silva LR, Ramírez-Bahena MH, Peix A (2016) Diversity of potassium-solubilizing microorganisms and their interactions with plants. In: Meena V, Maurya B, Verma J, Meena R (eds) Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture (pp. 99-110). Springer, New Delhi.
- Venturi V, Keel C (2016) Signaling in the Rhizosphere. *Trends in Plant Science*, 21(3): 187-198.

- Vigil-Stenman T, Ininbergs K, Bergman B, Ekman M (2017) High abundance and expression of transposases in bacteria from the Baltic Sea. *ISME Journal*, 11(11): 2611-2623.
- Vílchez JI, Niehaus K, Dowling DN, González-López J, Manzanera M (2018) Protection of pepper plants from drought by *Microbacterium* sp. 3J1 by modulation of the plant's glutamine and α -ketoglutarate content: a comparative metabolomics approach. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1-17.
- Violante M (2016) Variedades CTC Série 9000: Por Que Já Estão Entre As Mais Plantadas?
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47(1): 177-206.
- Wang JC (1996) DNA topoisomerases. *Annual review of biochemistry*, 65(1): 635-692.
- Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1): 1-14.
- Watanabe M, Kojima H, Fukui M (2015) *Limnochorda pilosa* gen. nov, sp. nov, a moderately thermophilic, facultatively anaerobic, pleomorphic bacterium and proposal of Limnochordaceae fam. nov, Limnochordales ord. nov. and Limnochordia classis nov. in the phylum Firmicutes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(8): 2378-2384.
- Watanabe M, Kojima H, Fukui M (2016) Complete genome sequence and cell structure of *Limnochorda pilosa*, a Gram-negative spore-former within the phylum Firmicutes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3): 1330-1339.
- Widhalm JR, Dudareva N (2015) A familiar ring to it: biosynthesis of plant benzoic acids. *Molecular Plant*, 8(1): 83-97.
- Willems A (2014) The family Phyllobacteriaceae. In: Edward F, DeLong EF, Stephen L et al. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* (pp. 355-418). Springer Berlin Heidelberg
- Wolińska A, Kuźniar A, Zielenkiewicz U et al. (2017) Bacteroidetes as a sensitive biological indicator of agricultural soil usage revealed by a culture-independent approach. *Applied Soil Ecology*, 119: 128-137.
- Wood JM (2011) Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annual Review of Microbiology*, 65(1): 215-238.

- Wu L, Wang J, Huang W *et al.* (2015) Plant-microbe rhizosphere interactions mediated by *Rehmannia glutinosa* root exudates under consecutive monoculture. *Scientific Reports*, 5: 1-11.
- Xiaoying G, Qing C, Zhigang S *et al.* (2015) Nitrogen and straw applications increase population size of *Bacillus* and *Pseudomonas spp.* in greenhouse soil. *Journal of resources and ecology*, 6(5): 293-301.
- Xu J, Luo X, Wang Y, Feng Y (2018) Evaluation of zinc oxide nanoparticles on lettuce (*Lactuca sativa L.*) growth and soil bacterial community. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(6): 6026-6035.
- Yasuda M, Iguchi-Yokoyama A, Matsuyama SI, Tokuda H, Narita SI (2009) Membrane topology and functional importance of the periplasmic region of abc transporter LolCDE. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(10): 2310-2316.
- Yergeau E, Tremblay J, Joly S *et al.* (2018) Soil contamination alters the willow root and rhizosphere metatranscriptome and the root-rhizosphere interactome. *ISME Journal*, 12(3): 869-884.
- Zeng F, Chen S, Miao Y, Wu F, Zhang G (2008) Changes of organic acid exudation and rhizosphere pH in rice plants under chromium stress. *Environmental Pollution*, 155(2): 284-289.
- Zeng J, Zhu Q, Wu Y, Chen H, Lin X (2017) Characterization of a polycyclic aromatic ring-hydroxylation dioxygenase from *Mycobacterium sp.* NJS-P. *Chemosphere*, 185: 67-74.
- Zerrouk IZ, Benchabane M, Khelifi L *et al.* (2016) A *Pseudomonas* strain isolated from date-palm rhizospheres improves root growth and promotes root formation in maize exposed to salt and aluminum stress. *Journal of Plant Physiology*, 191: 111-119.
- Zhang J, Wang PC, Fang L *et al.* (2017) Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from mushroom residues and their effect on tomato plant growth promotion. *Polish Journal of Microbiology*, 66(1): 57-65.
- Zhang N, Wang D, Liu Y *et al.* (2014) Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant and Soil*, 374(1-2): 689-700.
- Zhang T, Breitbart M, Lee W *et al.* (2006) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biology*, 4(1): 0108-0118.

Ziegler K, Deutzmann R, Lockau W (2002) Cyanophycin synthetase-like enzymes of non-cyanobacterial eubacteria: characterization of the polymer produced by a recombinant synthetase of *Desulfitobacterium hafniense*. *Journal of Biosciences*, 57(5-6): 522-529.

Anexo I

Funções moleculares correlacionadas negativamente (Spearman $p < 0,05$ e $r_s < -0,8$) pertencentes ao filo Bacteroidetes.

Função	Citríco	Isocitríco	Malíco	Taxonomia
GO:0008168- <i>methyltransferase activity</i>			-0,82	<i>Aequorivita</i>
GO:0008236- <i>serine-type peptidase activity</i>	-0,86		-0,82	<i>Aequorivita</i>
GO:0016021- <i>integral component of membrane</i>	-0,82		-0,86	<i>Aequorivita</i>
<i>YebC putative transcriptional factor</i>	-0,93	-0,86	-0,86	<i>Aequorivita</i>
GO:0003677- <i>DNA binding</i>		-0,82		Bacteroidetes
GO:0004803- <i>transposase activity</i>	-0,89	-0,86	-0,86	Bacteroidetes
K00134- <i>triosephosphate dehydrogenase</i>	-0,82			Bacteroidetes
K02358- <i>elongation factor Tu</i>	-0,82	-0,89	-0,86	Bacteroidetes
K02871- <i>large subunit ribosomal protein L13</i>	-0,86	-0,82	-0,89	Bacteroidetes
K02963- <i>small subunit ribosomal protein S18</i>	-0,93	-0,96	-0,96	Bacteroidetes
K02986- <i>small subunit ribosomal protein S4</i>	-0,82	-0,86	-0,86	Bacteroidetes
K02867- <i>large subunit ribosomal protein L11</i>			-0,82	Chitinophagaceae
K02935- <i>large subunit ribosomal protein L7/L12</i>			-0,82	Cytophagales
K02992- <i>small subunit ribosomal protein S7</i>		-0,82		Cytophagales
K03076- <i>preprotein translocase subunit SecY</i>			-0,82	Cytophagales
<i>Single-copy ribosomal proteins</i>	-0,96	-0,89	-0,93	Cytophagales
<i>RNA polymerase bacterial</i>	-0,82	-0,86	-0,86	Cytophagales
GO:0003676- <i>nucleic acid binding</i>	-0,93	-0,82	-0,86	Flavobacteriaceae
GO:0004519- <i>endonuclease activity</i>	-0,86		-0,82	Flavobacteriaceae
GO:0016757- <i>transferase activity</i>	-0,86		-0,82	Flavobacteriaceae

Anexo II

Funções moleculares correlacionadas positivamente (Spearman $p < 0,05$ e $r_s > 0,8$) pertencentes ao filo Bacteroidetes.

Função	Citrico	Isocitrico	Malico	Taxonomia
GO:0008488- <i>gamma-glutamyl carboxylase activity</i>	0,93	0,86	0,89	<i>Aequorivita</i>
GO:0009055- <i>electron transfer activity</i>	0,96	0,93	1,00	<i>Aequorivita</i>
GO:0051537-2 <i>iron, 2 sulfur cluster binding</i>		0,82		<i>Aequorivita</i>
K00537- <i>arsenate reductase arsC</i>		0,86		<i>Aequorivita</i>
K01992- <i>ABC-2 type transport system permease</i>	0,93	0,86	0,96	<i>Aequorivita</i>
K02259- <i>cytochrome c oxidase assembly subunit 15</i>	0,82	0,93		<i>Aequorivita</i>
K02276- <i>cytochrome c oxidase subunit III</i>		0,82		<i>Aequorivita</i>
K02429- <i>MFS transporter, L-fucose permease</i>		0,89		<i>Aequorivita</i>
K02495- <i>coproporphyrinogen III oxidase</i>		0,82		<i>Aequorivita</i>
K02621- <i>topoisomerase IV subunit A</i>	0,89	0,82	0,96	<i>Aequorivita</i>
K03305- <i>proton-dependent oligopeptide transporter</i>	0,93	0,89	0,96	<i>Aequorivita</i>
K03802- <i>cyanophycin synthetase cphA</i>	0,82	0,93		<i>Aequorivita</i>
K09808- <i>lipoprotein-releasing system permease</i>		0,86		<i>Aequorivita</i>
<i>Putative two-domain glycosyltransferase</i>		0,86		<i>Aequorivita</i>
GO:0003676- <i>nucleic acid binding</i>	0,86		0,89	Bacteroidetes
GO:0016746- <i>transferase activity (acyl groups)</i>	0,89	0,82	0,86	Bacteroidetes
GO:0016757- <i>transferase activity (glycosyl groups)</i>		0,89		Bacteroidetes
K03088- <i>RNA polymerase sigma-70 factor</i>	0,89	0,96	0,82	Bacteroidetes
K03324- <i>phosphate:Na⁺ symporter</i>	0,96	0,89	0,93	Bacteroidetes
GO:0004177- <i>aminopeptidase activity</i>	0,96	0,89	0,93	Flavobacteriaceae
GO:0005506- <i>iron ion binding</i>	0,82			Flavobacteriaceae
GO:0016787- <i>hydrolase activity</i>		0,82		Flavobacteriaceae
K00648-3- <i>oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III</i>		0,82		Flavobacteriaceae
K06013- <i>STE24 endopeptidase [EC:3.4.24.84]</i>	0,82		0,86	Flavobacteriaceae
K07218- <i>nitrous oxidase accessory protein nosD</i>	0,82			Flavobacteriaceae
GO:0004803- <i>transposase activity</i>		0,86	0,84	<i>Aequorivita</i>

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DA VARIEDADE DE CANA-DE-AÇÚCAR NA MICROBIOTA DA RIZOSFERA SUBMETIDA AO ESTRESSE HÍDRICO

2.1. Introdução

O genótipo da planta é um dos principais fatores que moldam o microbioma da rizosfera, porém, os mecanismos exatos pelos quais ocorre a interação entre as plantas e os micro-organismos ainda continuam desconhecidos. Um fator importante para essa interação planta-microbiota são metabólitos que a planta excreta no solo. Esses metabólitos exsudados não apenas fornecem uma fonte de energia para as células microbianas, com também atuam como moléculas sinalizadoras para atrair ou repelir micro-organismos. Como resultado dessa sinalização, a microbiota associada à rizosfera pode variar sua composição funcional e taxonômica entre as diferentes espécies de plantas ou, ainda, entre variedades da mesma espécie (Badri *et al.*, 2009; Berg & Smalla, 2009; Bakker *et al.*, 2012, van Dam & Bouwmeester, 2016).

Estudos têm demonstrado interações espécie-específicas entre diferentes plantas e bactérias. Zhang *et al.* (2014), por exemplo, avaliaram a colonização de *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 (isolado de rizosfera de pepino) e *Bacillus subtilis* N11 (isolado de rizosfera de banana) em seus hospedeiros originais e na planta não hospedeira (pepino ou banana). Os resultados indicaram que as bactérias são capazes de colonizar de forma mais eficiente a rizosfera da planta da qual foram isoladas originalmente, principalmente devido a exsudação de ácidos orgânicos específicos de cada espécie. O ácido cítrico, por exemplo, foi liberado apenas pelas plantas de pepino e foram capazes de atrair a bactéria hospedeira *B. amyloliquefaciens* SQR9 para sua rizosfera. O ácido fumárico, ao contrário, foi detectado apenas na rizosfera de banana e teve forte correlação com a presença e formação de biofilmes por *B. subtilis* N11.

Variações na microbiota da rizosfera também foram observadas entre diferentes cultivares e variedades de plantas da mesma espécie. Assim sendo, Mahoney *et al.* (2017) avaliaram a comunidade bacteriana da rizosfera de nove cultivares de trigo usando sequenciamento na plataforma Illumina da região V1-V3 do gene de rRNA 16S. Os resultados indicaram diferenças significativas na abundância de bactérias entre os diferentes cultivares para alguns grupos taxonômicos. Da Costa *et al.* (2014) avaliaram a composição e a diversidade das comunidades bacterianas associadas à rizosfera de seis variedades de cana-de-açúcar, cultivadas no Estado de São Paulo, por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) do gene de rRNA 16S. Os autores observaram uma diferença entre as variedades na composição

bacteriana da comunidade da rizosfera, principalmente pelo enriquecimento da classe Bacilli e do gênero *Sphingobacteria* em algumas variedades. Walters *et al.* (2018) avaliaram a microbiota associada a rizosfera de 27 cultivares diferentes de milho usando sequenciamento da região V4 do gene de rRNA 16S. Os resultados mostraram que 143 unidades taxonômicas operacionais (OTUs) tiveram sua abundância regulada significativamente pelo genótipo da planta, sendo mais importante que outras variáveis como a idade da planta hospedeira, o tipo de solo e presença de diferentes eventos climáticos.

Apesar dos avanços nos estudos da microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar, o papel de diferentes variedades na modulação dessa comunidade ainda é pouco explorado. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi comparar a microbiota associada à rizosfera de duas variedades de cana-de-açúcar em condições normais e sob diferentes condições de estresse hídrico.

2.2. Material e Métodos

2.2.1. Variedades de cana-de-açúcar utilizadas

Nesse trabalho, os dados do metatranscriptoma da rizosfera de cana-de-açúcar da variedade CTC9001, resistente à seca (apresentados no Capítulo 1) foram comparados com os dados obtidos da rizosfera de cana-de-açúcar da variedade RB855536. Essa variedade foi desenvolvida pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em 1995 e foi fornecida pelo Centro de Ciências Agrárias dessa mesma instituição, localizado em Araras, São Paulo. Essa variedade de cana-de-açúcar é comumente encontrada nas lavouras por apresentar boa produtividade, excelente brotação de soca, ausência de florescimento e resistência a várias doenças. No entanto, ela é altamente exigente em relação à água, respondendo diretamente à falta de água no solo, que compromete a produtividade (RIDESA, 2010; Gava *et al.*, 2011; Simões, 2013). Nesse trabalho, as amostras derivadas da rizosfera da variedade CTC9001 receberão o nome “resistente” (à seca) e as da variedade RB855536 receberão o nome “sensível” (à seca).

2.2.2. Ensaio com cana-de-açúcar submetida ao estresse hídrico

O ensaio de estresse hídrico da variedade sensível de cana-de-açúcar foi conduzido de forma idêntica ao realizado para a variedade resistente, descrito no Capítulo 1. Um total de 24 plantas de cana-de-açúcar com 100 dias de idade foram mantidas em casa de vegetação com temperatura e fotoperíodo controlados para adaptação sob irrigação duas vezes ao dia, durante duas semanas. As plantas foram, então, submetidas ao estresse hídrico, permanecendo sem irrigação, durante um período de dois (amostras S2d), oito (S8d) e doze (S12d) dias (seis plantas por condição). Seis plantas permaneceram com irrigação normal (S0d) e foram utilizadas como condição controle. A coleta das amostras da rizosfera, das medidas morfológicas das plantas, dos exsudados radiculares e do sequenciamento do metatranscriptoma também foram obtidas como descrito no Capítulo 1.

2.2.3. Análise dos dados

O pré-processamento da qualidade e trimagem dos *reads* foram feitas no programa NGS QC Toolkit (Patel & Jain, 2012) e visualizados no programa FastQC toolkit v0.11.5 (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>), removendo aquelas sequências com qualidade Phred inferior a 20 e tamanho menor que 70 pb. A remoção de sequências contaminantes de RNA ribossomal (rRNA) foi feita utilizando o programa riboPicker (Schmieder *et al.*, 2012) com os parâmetros *default* (80% de identidade de alinhamento e 50% de cobertura de alinhamento) contra o banco de dados "rnadb". Após a filtragem, os arquivos contendo os *reads* complementares foram corrigidos com o programa BBtools (<http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>) para que apresentassem o mesmo número final de *reads*.

O resultado da montagem *de novo* da variedade resistente a seca (descrito no Capítulo 1) foi utilizado como referência para o alinhamento dos *reads* (mRNA) da variedade sensível. O alinhamento foi realizado no programa BWA v0.7.5, utilizando o algoritmo Bwa-men (Li, 2013). Em seguida, a quantificação da abundância dos *reads* para cada transcrito foi realizada no programa Subread v1.5.3, utilizando a opção "featureCount" (Liao *et al.*, 2014).

2.2.4. Análises estatísticas

Os dados do metatranscriptoma da variedade sensível de cana-de-açúcar foram submetidos a análise de expressão diferencial e enriquecimentos de GO (*Gene Ontology*) utilizando os mesmos programas e parâmetros descritos para a variedade resistente (NOISeq; Tarazona *et al.*, 2015, topGO; Alexa & Rahnenfuhrer, 2016 e Revigo; Supek *et al.*, 2011). A separação dos transcritos por perfil de expressão ao longo do estresse hídrico foi realizada utilizando o pacote SOM do programa R (Tamayo *et al.*, 1999; R Development Core Team, 2011). Finalmente, a correlação pareada de Spearman entre os ácidos orgânicos exsudados pelas raízes das plantas e os dados de expressão dos transcritos diferencialmente expressos foi calculada usando o programa PAST (Hammer *et al.*, 2001). Foram consideradas apenas as correlações significativas ($p < 0,05$) com valores maiores que 0,8 e menores que -0,8.

Para as análises comparativas entre as duas variedades de cana-de-açúcar, os transcritos que foram encontrados exclusivamente em uma das variedades estudadas (resistente ou sensível) e aqueles detectados em seis amostras ou menos foram removidos das análises. A remoção desses transcritos com baixa contagem evita o aparecimento de resultados falsos positivos. Os transcritos remanescentes foram agrupados em diferentes níveis taxonômicos e em subsistemas do SEED utilizando o programa Megan 6 (Huson *et al.*, 2007). A opção “*compare*” no Megan foi utilizada para a construção de uma tabela contendo o valor de expressão dos transcritos em cada amostra (normalizado pelo tamanho da menor amostra). Os dados foram analisados no programa Stamp (Parks, 2014) para a realização da análise estatística baseada na variedade da planta em condições normais e de estresse hídrico. A comparação foi feita utilizando o teste de Welch, com intervalo de 0,95 e teste de correção de Storey, para controlar os resultados falsos positivos. Além disso, os dados foram submetidos à análise de variância PERMANOVA ($p < 0,05$) do programa Primer+Permanova v1.0.1 (Primer-E Ltda).

2.3. Resultados e discussão

2.3.1. *Monitoramento do crescimento das plantas de cana-de-açúcar RB855536*

As plantas de cana-de-açúcar da variedade sensível foram analisadas quanto ao seu crescimento e teor de água quando submetidas a diferentes tempos de estresse hídrico. A Tabela 2.1 mostra os valores médios das medidas realizadas e os valores da análise estatística.

A variedade sensível à seca mostrou um padrão de crescimento bastante heterogêneo em condições de casa de vegetação, apresentando plantas com diferentes tamanhos independente do tratamento submetido (irrigado ou com estresse hídrico). Portanto, nos parâmetros de crescimento, foi possível observar uma diferença significativa entre as amostras para algumas medidas (altura, matéria seca da parte aérea e da raiz), mas que não foram diretamente relacionadas com o tempo de estresse hídrico. O crescimento em vaso e/ou a variabilidade natural dessa variedade podem ter sido responsáveis por esses resultados. Assim sendo, não foi possível obter respostas claras do crescimento da planta à medida que o tempo de estresse hídrico aumenta.

Tabela 2.1. Valores médios e desvio padrão de crescimento das plantas de cana-de-açúcar RB855536 submetidas a diferentes tempos de estresse hídrico e resultados da análise de variância (ANOVA).

Medidas	S0d	S2d	S8d	S12d	F	Valor de P
Altura (cm)	129,15 (\pm 8,95)	125,82 (\pm 11,70)	143,75 (\pm 10,74)	136,65 (\pm 14,26)	7,38	4e-4*
Largura da folha +1 (cm)	1,48 (\pm 0,27)	1,30 (\pm 0,09)	1,43 (\pm 0,19)	1,38 (\pm 0,10)	1,86	0,17
Comprimento da folha +1 (cm)	52,03 (\pm 7,88)	52,70 (\pm 5,20)	54,50 (\pm 2,98)	46,4 (\pm 3,89)	2,63	0,09
Matéria seca - parte aérea (%)	13,58 (\pm 0,27)	15,08 (\pm 1,02)	17,39 (\pm 1,05)	19,67 (\pm 0,69)	22,44	0,03*
Matéria seca - raiz (%)	4,02 (\pm 3,85)	7,03 (\pm 0,97)	9,25 (\pm 2,53)	10,05 (\pm 0,97)	10,09	2e-4*
Teor de água - parte aérea (%)	86,42 (\pm 0,27)	84,01 (\pm 1,02)	81,69 (\pm 1,11)	80,23 (\pm 0,47)	43,67	9e-4*
Teor de água - raiz (%)	95,98 (\pm 1,96)	92,41 (\pm 0,99)	90,75 (\pm 2,53)	89,95 (\pm 0,94)	13,80	3e-4*
CRA ¹ (%)	87,97 (\pm 1,41)	76,88 (\pm 5,22)	79,40 (\pm 1,23)	81,32 (\pm 2,08)	10,30	1e-3*

¹: Conteúdo Relativo de Água (folha)

* Significância estatística a 5%

Os parâmetros associados à quantidade de água na folha (CRA) e nas partes aérea e raiz, não dependem do tamanho da planta e podem indicar uma desidratação causada pela menor quantidade de água disponível no solo. Dessa forma, os teores de água da variedade sensível apresentaram valores significativamente maiores nas amostras irrigadas (S0d) em relação às amostras submetidas a oito ou doze dias de estresse hídrico (Figura 2.1).

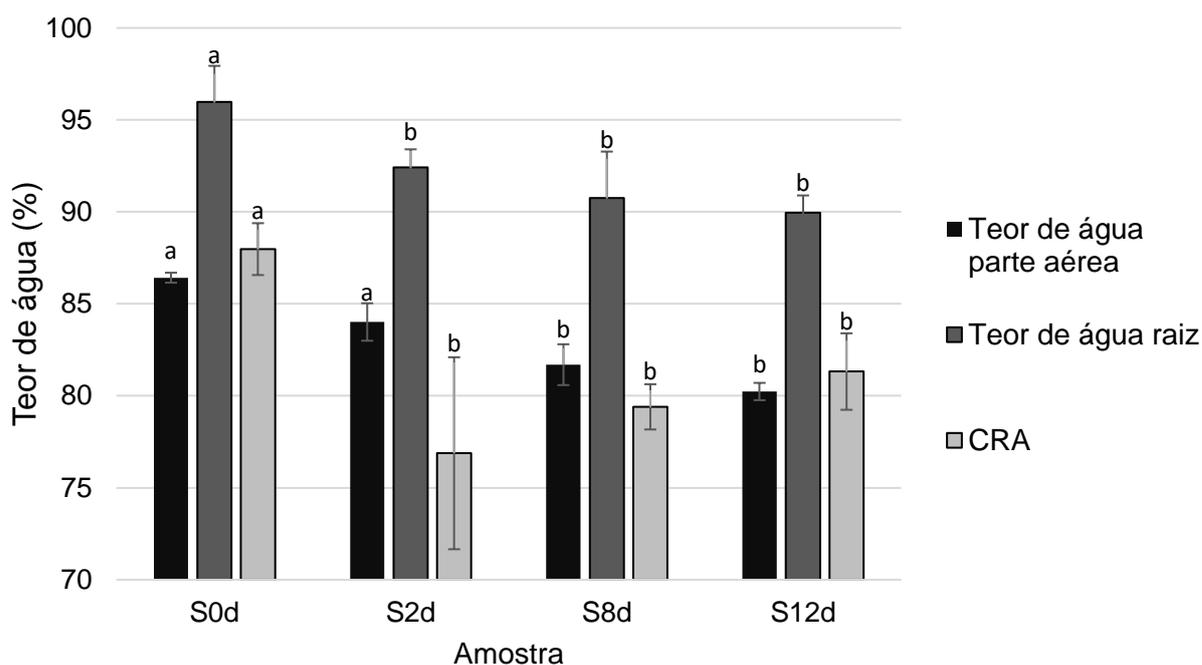


Figura 2.1. Teores de água da variedade de cana-de-açúcar RB855536. CRA: conteúdo relativo de água (folha). Letras diferentes correspondem a diferença significativa à 5% (teste Tukey).

Um teor elevado de água, próxima a saturação, é essencial para o bom funcionamento das células. Quando ocorre uma diminuição desse teor, a planta pode vir a atingir a murcha permanente e, no caso de variedades agrícolas, prejudicar sua produção mesmo em casos onde a desidratação é mais branda (Guimarães & Stone, 2008). A variedade de cana-de-açúcar RB855536 é conhecida por sua grande exigência de água para sua sobrevivência, crescimento e produção (Daros, 2010; Simões, 2013). Dessa forma, um curto período de estresse hídrico foi capaz de diminuir significativamente seu teor de água em todos os compartimentos avaliados (folha, parte aérea e raiz). Os dados diferem dos resultados obtidos para a variedade resistente à seca CTC9001 a qual manteve seu teor de água praticamente constante

durante todo experimento. É possível concluir que o estresse hídrico causou respostas diferentes nas duas variedades estudadas. Essas diferenças podem refletir direta ou indiretamente na comunidade microbiana da rizosfera, principalmente através da liberação dos exsudados radiculares liberados no solo pelas plantas.

2.3.2. Composição dos exsudatos radiculares da variedade de cana-de-açúcar RB855536 e comparação com a variedade de cana-de-açúcar CTC9001

Muitos estudos vêm reportando a influência das diferentes variedades de cana-de-açúcar na composição da microbiota associada a rizosfera (Costa *et al.*; 2014; Dong *et al.*, 2018; Hamonts *et al.*, 2018). No entanto, esses trabalhos não exploram as diferenças qualitativas e quantitativas dos exsudados radiculares entre as variedades, o que impossibilita determinar seu papel na modulação da comunidade microbiana. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou as diferenças nas taxas de exsudação dos ácidos orgânicos entre as duas variedades de cana-de-açúcar (resistente e sensível a seca). A Tabela 2.2 mostra a taxa de exsudação radicular dos ácidos orgânicos das duas variedades de cana-de-açúcar estudadas, em condições normais de irrigação.

Na condição controle, foi possível observar diferenças na taxa de exsudação dos ácidos orgânicos entre as variedades de cana-de-açúcar avaliadas. De modo geral, a quantidade de ácidos orgânicos exsudados pela variedade de cana-de-açúcar resistente foi maior do que as taxas encontradas para a variedade sensível. Para os ácidos cítrico e succínico, a taxa de exsudação foi significativamente maior na variedade resistente. O ácido malônico, por sua vez, foi detectado apenas na variedade sensível de cana-de-açúcar. Embora todas as plantas produzam exsudatos radiculares, a quantidade e a composição desses compostos podem variar de acordo com o genótipo da planta (Sasse *et al.*, 2018). Dessa forma, uma diferença natural dos padrões de exsudação entre as duas variedades de cana-de-açúcar estudadas era esperada, mesmo nas condições normais de irrigação. Uma vez que os demais fatores que poderiam influenciar a taxa de exsudação (tipo de solo, idade da planta, etc) foram as mesmas para as duas variedades, as diferenças observadas podem ser atribuídas, em grande parte, ao genótipo da planta presente no solo.

Tabela 2.2. Valores médios, desvio padrão e análise de variância (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) da taxa de exsudação dos ácidos orgânicos pelas raízes de cana-de-açúcar CTC9001 (resistente a seca) e RB855536 (sensível a seca) nas amostras controle (irrigadas). Os valores são expressos em $\mu\text{g.g de raiz}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Ácido orgânico	Variedade		Chi ²	Valor de P
	Resistente	Sensível		
Cítrico	6,56 ($\pm 1,95$)	3,41 ($\pm 0,95$)	5,33	0,02*
Isocítrico	0,37 ($\pm 0,06$)	0,31 ($\pm 0,14$)	0,05	0,83
Lático ¹	0,87 ($\pm 0,07$)	0,62 ($\pm 0,33$)	ND	ND
Maleico-Fumárico	0,49 ($\pm 0,10$)	0,19 ($\pm 0,26$)	2,08	0,15
Málico	9,39 ($\pm 1,39$)	7,91 ($\pm 6,19$)	0,75	0,39
Succínico	1,22 ($\pm 0,08$)	0,23 ($\pm 0,16$)	5,33	0,02*
Malônico	ND	0,61 ($\pm 0,75$)	ND	ND

¹ Análise estatística não realizada ($n < 3$)

ND: não determinado

* Significância estatística a 5%

Uma maior atividade radicular das plantas, refletida pela taxa maior de exsudação, pode resultar em maior absorção de nutrientes e água do solo, o que aumenta o conteúdo de água na planta (Gu *et al.*, 2013). Dessa forma, a maior quantidade de ácidos orgânicos liberados pelas raízes da variedade de cana-de-açúcar resistente (principalmente dos ácidos succínico e cítrico) pode ser uma das características responsável pela sua tolerância a seca.

O ácido malônico é um ácido orgânico comumente exsudado por diferentes plantas como trigo (Cieslinski *et al.*, 1997), grão de bico (Cawthray, 2003), *Lupinus albus* (Mimmo *et al.*, 2008) e *Kennedia* sp. (Ryan *et al.*, 2012). Martins *et al.* (2013), avaliaram o efeito do alumínio do solo na exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes de plantas de *Plantago almogravensis*, uma espécie conhecida por sua capacidade de acumular alumínio e usada em processos de fitorremediação. Os resultados mostraram que a presença do metal no solo induziu a liberação de ácido malônico pelas raízes de *P. almogravensis*, sugerindo a importância desse composto no processo de absorção de alumínio pelas plantas. Em cana-de-açúcar, no entanto, o efeito da liberação desse ácido orgânico na rizosfera ainda não é conhecido.

Além das diferenças nas taxas de exsudação dos ácidos orgânicos para as duas variedades de cana-de-açúcar em condições controle, também foram observadas diferenças nos perfis de exsudação desses compostos quando as plantas foram submetidas aos diferentes tratamentos de estresse hídrico. A Tabela 2.3 mostra a composição e a taxa de exsudação radicular dos ácidos orgânicos da variedade de cana-de-açúcar sensível a seca. A Figura 2.2 mostra a variação dessas taxas de exsudação da variedade sensível de cana-de-açúcar para os ácidos que apresentaram diferença significativa entre as amostras controle e as amostras sob estresse hídrico.

Tabela 2.3. Valores médios e desvio padrão da taxa de exsudação dos ácidos orgânicos pelas raízes de cana-de-açúcar RB855536.Os valores são expressos em $\mu\text{g.g de raiz}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Ácido orgânico	S0d	S2d	S8d	S12	Chi ²	Valor de P
Cítrico	3,41 (\pm 0,95)	3,26 (\pm 0,50)	4,62 (\pm 2,33)	1,13 (\pm 0,61)	0,13	0,018*
Isocítrico	0,31 (\pm 0,14)	0,27 (\pm 0,11)	0,44 (\pm 0,14)	0,13 (\pm 0,07)	7,23	0,065
Lático	0,62 (\pm 0,33)	19,78 (\pm 9,75)	3,37 (\pm 5,10)	0,32 (\pm 0,37)	10,77	0,013*
Maleico-Fumárico	0,19 (\pm 0,26)	0,10 (\pm 0,01)	0,06 (\pm 0,05)	0,03 (\pm 0,01)	6,78	0,079
Málico	7,91 (\pm 6,19)	3,96 (\pm 1,60)	3,69 (\pm 2,07)	2,07 (\pm 1,71)	7,96	0,036*
Malônico	0,61 (\pm 0,75)	0,23 (\pm 0,86)	0,22 (\pm 0,05)	0,15 (\pm 0,42)	1,04	0,593
Succínico	0,23 (\pm 0,16)	0,34 (\pm 0,07)	0,20 (\pm 0,09)	0,07 (\pm 0,04)	9,50	0,023*

*Significância estatística a 5%

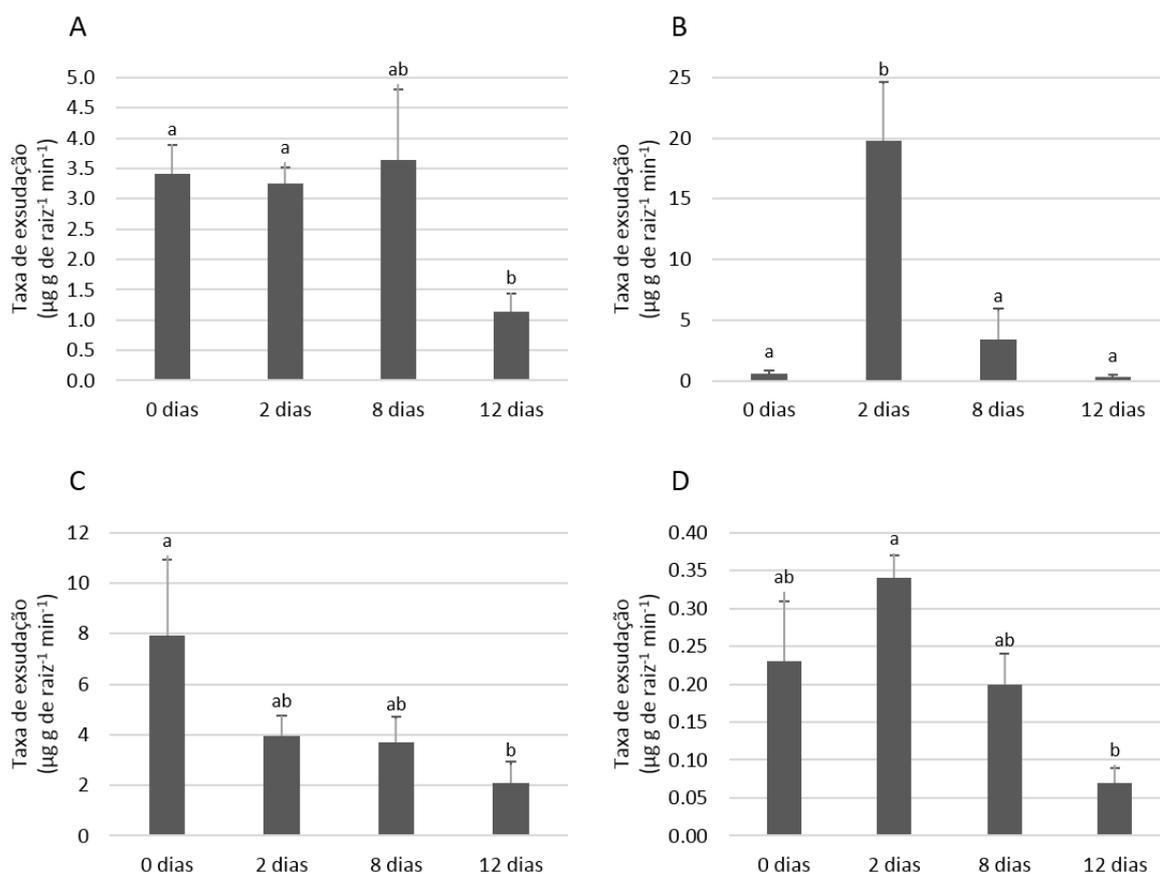


Figura 2.2. Média da taxa de exsudação do ácido cítrico (A), láctico (B), málico (C) e succínico (D) nas raízes de cana-de-açúcar RB855536 que apresentaram diferenças significativas (Mann-Whitney, $p < 0,05$) entre os diferentes tempos de estresse hídrico.

Os ácidos cítrico e málico apresentaram diferença significativa entre as amostras controle e nas amostras submetidas a 12 dias de estresse hídrico, tanto para a variedade sensível (Figura 2.2 A e D) quanto para a variedade resistente (Capítulo 1). No entanto, as taxas de exsudação apresentaram padrões opostos entre as duas variedades. Na cana-de-açúcar resistente a seca, a exsudação dos ácidos orgânicos foi maior com 12 dias de estresse hídrico enquanto que, na variedade sensível, essa taxa foi menor em relação a condição controle. Um aumento nas taxas de exsudação nas condições de estresse hídrico já foi reportado em espécies de plantas resistentes a seca (Song *et al.*, 2012; Hooper *et al.*, 2015), funcionando como estratégia para sobrevivência nessas condições. Os resultados desse trabalho sugerem que esta estratégia também pode estar sendo utilizada pela variedade de cana-de-açúcar CTC9001.

Os ácidos succínico e láctico apresentaram perfil de exsudação diferente apenas para a variedade sensível. Nessa variedade, a exsudação do ácido succínico diminuiu nas amostras submetidas a 12 dias de estresse hídrico, enquanto que, o ácido láctico foi exsudado em maior quantidade quando as plantas foram submetidas a dois dias de estresse hídrico. Esses resultados evidenciam a diferença no comportamento das diferentes variedades de plantas quando submetidas ao estresse. Todas essas diferenças observadas entre as duas variedades de cana-de-açúcar podem influenciar a comunidade microbiana da rizosfera.

A influência do genótipo da planta na modulação da comunidade microbiana através da variação na composição dos exsudados radiculares já foi sugerido por Micallef *et al.* (2009) para *Arabidopsis thaliana*. Nesse trabalho, a comunidade microbiana da rizosfera de oito ecótipos de *A. thaliana* foram avaliados quanto a composição taxonômica com base no gene de rRNA 16S e da região espaçadora intergênica entre as subunidades 16S e 23S do gene de rRNA. Os resultados mostraram que a composição da microbiota da rizosfera foi significativamente diferente entre todos os ecótipos. Além disso, foi reportado uma variação natural nos padrões dos exsudados radiculares entre as plantas, sugerindo que as diferenças nos exsudados poderiam estar influenciando as bactérias da rizosfera.

Os dados de exsudação dos ácidos orgânicos foram correlacionados com os dados do metatranscriptoma da rizosfera da variedade sensível de cana-de-açúcar para avaliar o efeito desses ácidos na atividade das bactérias da rizosfera durante o estresse hídrico. Os resultados são apresentados na sessão 2.3.5 desse capítulo.

2.3.3. Dados do sequenciamento do metatranscriptoma da rizosfera de cana-de-açúcar RB855536

Para a análise do metatranscriptoma da rizosfera da cana-de-açúcar RB855536, um total de oito bibliotecas foi sequenciado, conforme mostra a Tabela 2.4.

Tabela 2.4. Dados do sequenciamento do metatranscriptoma das amostras da rizosfera de cana-de-açúcar RB855536. Os dados de sequências são apresentados em pares de *reads* (PR).

Amostra	Número PR	Número PR	% PR	rRNA	% rRNA	Número	% mapeamento
	inicial	trimados	trimados		PR final	(<i>contigs</i>)	
S0d-1	19.699.876	18.202.225	92,40	15.191.312	83,46	3.010.913	41,90
S0d-2	15.884.051	14.627.126	92,09	12.533.994	85,69	2.093.132	44,30
S2d-1	19.257.483	17.638.958	91,60	14.466.289	82,01	3.172.669	44,60
S2d-2	18.297.911	16.713.574	91,34	13.566.116	81,17	3.147.458	48,70
S8d-1	20.415.352	18.714.281	91,67	16.001.784	85,51	2.712.499	44,10
S8d-2	16.340.047	14.930.985	91,38	12.695.067	85,02	2.235.918	44,30
S12d-1	134.691.552	122.730.510	91,12	109.847.298	89,50	12.883.212	44,30
S12d-2	2.550.742	1.955.401	76,66	1.555.137	79,53	400.264	24,10
Total	247.137.014	225.513.060	91,25	195.856.997	86,85	29.656.065	42,04

O sequenciamento da biblioteca da variedade de cana-de-açúcar sensível a seca apresentou aproximadamente 247 milhões de pares de *reads* brutos. Uma das amostras submetida a 12 dias de estresse hídrico (S12-2) apresentou uma baixa quantidade de *reads* iniciais, o que resultou em uma quantidade final de sequências muito baixa em relação às demais amostras. Dessa forma, essa amostra foi descartada e não foi utilizada nas etapas posteriores. As demais amostras apresentaram boa qualidade nos dados do sequenciamento (91,1 a 92,4% dos *reads* mantidos após a filtragem). A porcentagem de RNA ribossomal (rRNA) variou de 81,2 a 89,5% entre as amostras, resultando num total aproximado de 29,6 milhões de *reads* de RNA final (mRNA). A proporção de *reads* mapeados nos *contigs* (previamente montados a partir das amostras da variedade resistente) variou de 44,3 a 48,7%. O programa FragGeneScan (Rho *et al.*, 2010) detectou 303.069 transcritos totais.

Um total de 298.726 (98,6%) dos transcritos encontrados para a variedade sensível de cana-de-açúcar foi anotado em algum nível taxonômico, enquanto que 253.031 (83,5%) foram anotados em algum nível de subsistemas do SEED. A anotação taxonômica e funcional do mRNA da microbiota associada à rizosfera de cana-de-açúcar da variedade sensível é apresentada nos anexos I e II, respectivamente. De modo geral, a comunidade microbiana que respondeu ao estresse hídrico na rizosfera da variedade sensível de cana-de-açúcar foi composta principalmente por bactérias e eucariotos não identificados (média de 18,5% e 20,4% dos transcritos, respectivamente). Entre os transcritos anotados, os filos mais abundantes foram Proteobacteria (21,8%) e fungos do filo Ascomycota (6,1%). Além disso, a anotação taxonômica não apresentou grandes variações ao longo do estresse hídrico. As categorias funcionais mais abundantes foram as categorias não classificadas (16,3%), metabolismo de proteínas (16,1%) e virulência (10,8%).

A análise de expressão diferencial de todos os possíveis pares de amostras, obtidos pela análise estatística do NOISeq, obteve um total de 12.301 transcritos diferencialmente expressos em pelo menos um dos tratamentos de estresse hídrico avaliado. Foi possível observar que a maioria dos transcritos apresentou um aumento na expressão (*up regulated*) à medida que o tempo de estresse hídrico aumentava (anexo III). Esses dados diferem daqueles obtidos para a variedade resistente de cana-de-açúcar, em que a maioria dos transcritos apresentaram diminuição da expressão (*down regulated*) à medida que o estresse hídrico aumentava.

Os transcritos com expressão diferencial da variedade sensível também foram analisados pelo programa SOM e agrupados com base em seu perfil de expressão ao longo de todo o tempo de estresse hídrico (anexo IV). Entre os nove grupos de transcritos gerados pelo programa SOM, quatro deles apresentaram valores de expressão praticamente constantes até oito dias de estresse hídrico, seguido de um aumento na expressão aos doze dias de tratamento (n = 384, 3.155, 214 e 2.881). Outros dois grupos de transcritos apresentaram aumento gradual da expressão ao longo do estresse hídrico (n = 752 e 1.922). Esses transcritos foram associados principalmente a proteínas de ligação ao DNA e proteínas ribossomais. Os gêneros mais abundantes nesse grupo de transcritos foram *Rhodanobacter*, *Streptomyces*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Nocardioides* e *Gemmatimonas*.

Alguns transcritos (n = 1.879) apresentaram um aumento da expressão nas amostras submetidas a dois dias de estresse hídrico em relação a amostra controle, permanecendo com valores de expressão mais elevados ao longo de todo o tratamento de estresse hídrico. Esses transcritos foram anotados como proteínas de atividade motora e de ligação a outras proteínas mal dobradas. Os gêneros mais abundantes desse grupo foram *Streptomyces* e *Aequorivita*. Finalmente, um grupo de transcritos (n = 1101) apresentou queda na expressão em dois e oito dias de estresse hídrico, seguido de um aumento aos doze dias de tratamento. Esses transcritos foram associados a proteínas ribossomais e aos gêneros *Staphylococcus* e *Nitrososphaera*.

Nenhum grupo de transcritos da variedade resistente de cana-de-açúcar (Capítulo 1) apresentou perfil de expressão semelhantes a esses grupos observados para a variedade sensível, indicando que a microbiota associada a rizosfera responde de forma distinta nas duas variedades. Essa diferença pode ser observada, inclusive, nos gêneros que apresentaram maior abundância na rizosfera das duas variedades. Uma análise mais detalhada da diferença na abundância taxonômica e funcional, além do perfil de expressão dos transcritos durante o tratamento de estresse hídrico entre as duas variedades é apresentado nas próximas sessões.

2.3.4. Efeito da variedade de cana-de-açúcar na anotação taxonômica da microbiota metabolicamente ativa associada a rizosfera em diferentes condições de estresse hídrico

A diferença na anotação taxonômica da comunidade microbiana da rizosfera das duas variedades de cana-de-açúcar foi determinada pelo teste estatístico PERMANOVA ($p < 0,05$) e pela análise de componentes principais do programa STAMP (Figura 2.3).

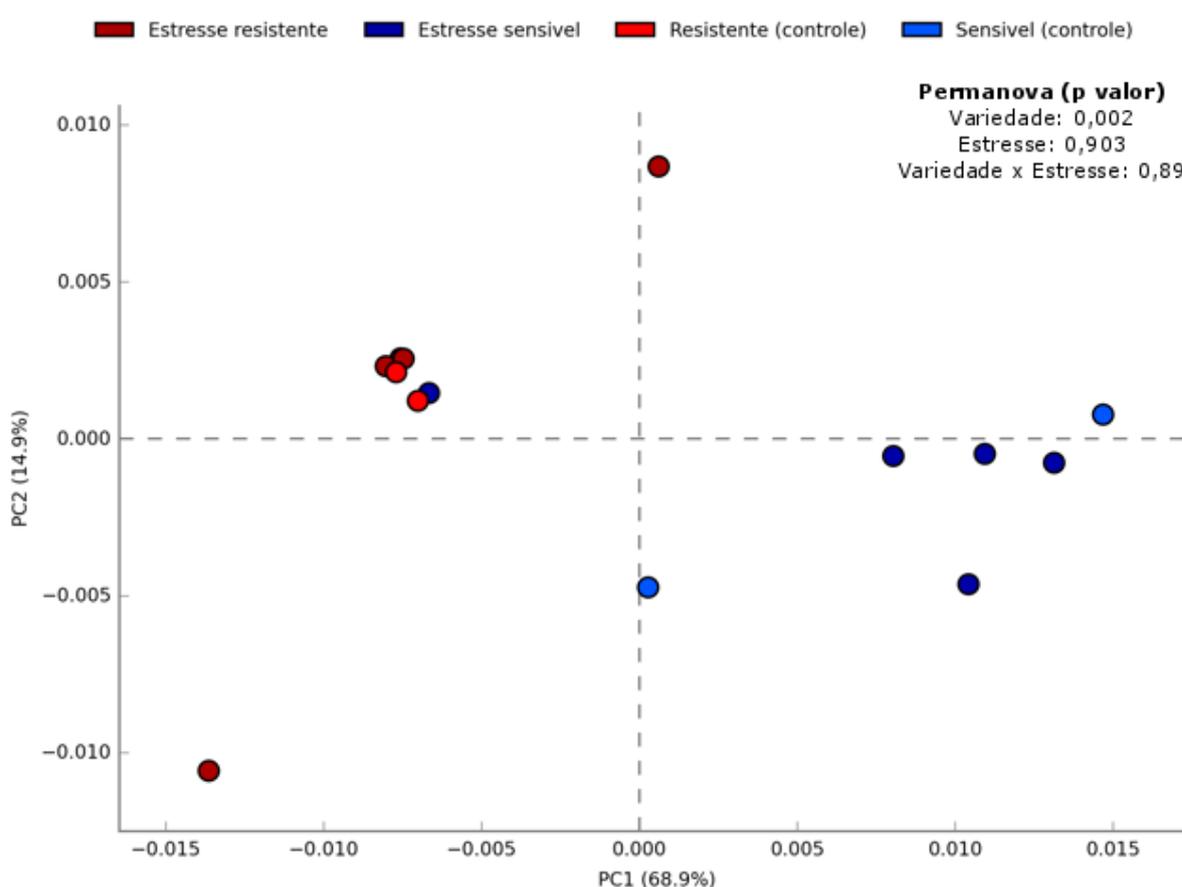


Figura 2.3. Análise de componentes principais (PCA) baseado na composição taxonômica da rizosfera das variedades de cana-de-açúcar CTC9001 (resistente ao estresse hídrico) e RB855536 (sensível ao estresse hídrico) submetidas ao estresse hídrico. O resultado da análise de PERMANOVA para as diferentes variedades e a presença do estresse é mostrado no canto superior direito da Figura. PC1: primeiro componente, PC2: segundo componente.

Os resultados indicaram uma influência da variedade da cana-de-açúcar na composição da microbiota da rizosfera que respondeu ao estresse hídrico ($F = 12,8$; $p = 0,002$). Apenas uma amostra da variedade sensível (S12-1) apresentou composição similar às amostras da variedade resistente. Uma vez observada a diferença na comunidade bacteriana da rizosfera entre as duas variedades de cana-de-açúcar, a análise estatística de Welch foi usada para mostrar quais foram os grupos taxonômicos que mais contribuíram para esse resultado (Figura 2.4).

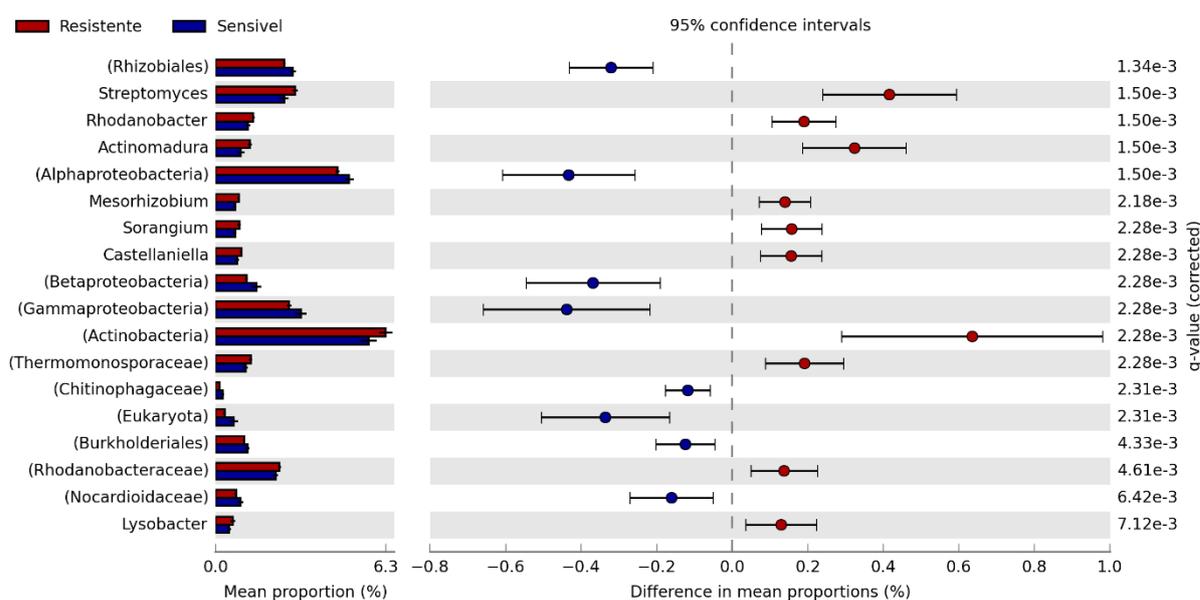


Figura 2.4. Diferenças significativas nas comunidades microbianas ao nível de gênero entre as variedades de cana-de-açúcar CTC9001 (resistente) e RB855536 (sensível). Nome de taxa entre parênteses indicam anotação taxonômica em outros níveis (família, ordem, classe, filo ou reino).

A rizosfera da cana-de-açúcar resistente apresentou maior abundância na expressão de transcritos associados aos gêneros *Actinomadura*, *Rhodanobacter* (e sua família, Rhodanobacteraceae), *Sorangium* e *Streptomyces*. Na análise do metatranscriptoma da variedade resistente (Capítulo 1), esses quatro gêneros foram associados a atividades importantes para a colonização da rizosfera como os sistemas de secreção do tipo III, montagem de flagelos e degradação de compostos complexos. Além disso, essas bactérias foram mais abundantes nas amostras submetidas ao estresse hídrico e estavam associadas a mecanismos de proteção contra estresse, como síntese de peptidoglicano e síntese de glutamato, indicando a

capacidade desses gêneros em sobreviver na rizosfera mesmo em condições de seca.

Os gêneros *Mesorhizobium*, *Castellaniella* e *Lysobacter* também foram mais abundantes na rizosfera da variedade resistente. *Mesorhizobium* é conhecido pela capacidade de formar nódulos nas raízes de algumas leguminosas para fixar nitrogênio atmosférico, mas também foi reportado na forma livre na rizosfera de outras plantas, incluindo cana-de-açúcar (Jarvis *et al.*, 1997; Pisa *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2015). Além da fixação de nitrogênio, bactérias desse gênero também excretam aminoácidos para a rizosfera como glicina, prolina, leucina, entre outros. A liberação desses aminoácidos pelas bactérias pode ser uma vantagem na competição por nodulação (no caso de leguminosas) e colonização das raízes (Salmeron-Lopez *et al.*, 2004; González-López *et al.*, 2005). *Castellaniella* foi isolada em rizosfera de *Medicago truncatula* sob estresse salino (Yaish *et al.*, 2016) e em solos de colheita de cana-de-açúcar e trigo (Chandra & Chandra, 2017). No entanto, ainda não se sabe seu papel na microbiota nesses ambientes.

O gênero *Lysobacter* também foi mais abundante na rizosfera da variedade resistente de cana-de-açúcar. Esse gênero é composto por 16 espécies tipicamente encontradas em solos e habitats aquáticos e é conhecido principalmente por sua atividade lítica e produção de antimicrobianos. Várias espécies de *Lysobacter* apresentam atividade lítica e micropredatória sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, algas, leveduras, fungos filamentosos e nematoides devido a produção de enzimas como quitinase, glucanase e protease, capazes de degradar os principais componentes da parede celular. Além disso, muitos compostos antimicrobianos como lactamas, penicilina, estreptomicina, neomicina e tetraciclina são produzidos por esse gênero. A capacidade de atacar micro-organismos e liberar metabólitos secundários com atividade antibiótica faz do gênero *Lysobacter* uma fonte de agentes de biocontrole contra doenças fitopatogênicas (Hayward *et al.*, 2010; Puopolo *et al.*, 2017). Nesse sentido, Puopolo *et al.* (2014) avaliaram a capacidade da bactéria *Lysobacter capsici* AZ78 em controlar o crescimento de *Plasmopara viticola*, um fungo patógeno de videiras. Os resultados mostraram que a inoculação da bactéria reduziu a incidência da doença de maneira similar ao tratamento com fungicida. Rosenzweig *et al.* (2012) relataram uma correlação positiva entre a abundância de *Lysobacter* sp. (detectado por sequenciamento do gene de rRNA 16S) e a supressão de uma doença em batata, causada pela bactéria *Streptomyces* sp. A variedade resistente de cana-

de-açúcar, além de apresentar resistência ao estresse hídrico, aparenta criar condições mais favoráveis para a atividade de bactérias comumente envolvidas em interações benéficas com plantas, o que pode ser uma vantagem adicional para a sobrevivência dessa variedade em condições adversas.

A maioria das bactérias com maior abundância na variedade sensível a seca não pôde ser classificada a nível de gênero, o que dificulta o estudo de associações mais detalhadas com essa variedade. Ao nível de família, os grupos bacterianos mais abundantes foram Chitinophagaceae e Nocardioidaceae. Essas duas famílias são comumente encontradas na rizosfera de diferentes variedades de cana-de-açúcar (Omori *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2016; Yeoh *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2018). No entanto, o papel dessas famílias na microbiota da rizosfera da cana-de-açúcar é desconhecido.

O perfil taxonômico das duas variedades de cana-de-açúcar também foi avaliado separadamente nas condições normais (amostras controle R0 e S0) e sob estresse hídrico (amostras submetidas a dois, oito e 12 dias de estresse). Os resultados são apresentados na Figura 2.5.

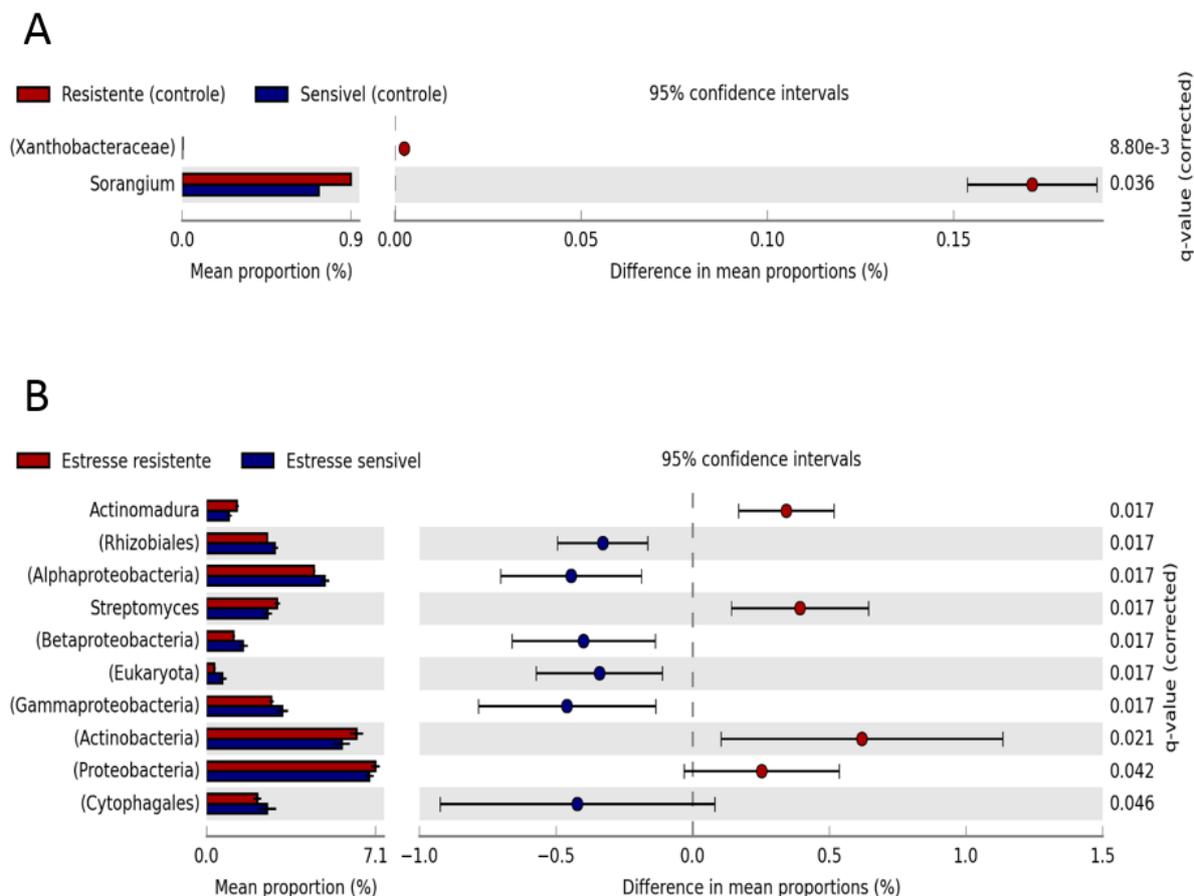


Figura 2.5. Diferenças significativas nas comunidades microbianas ao nível de gênero entre as variedades de cana-de-açúcar CTC9001 (resistente) e RB855536 (sensível) em condições normais (A) e sob estresse hídrico (B). Nome de taxa entre parênteses indicam anotação taxonômica em outros níveis (família, ordem, classe, filo ou reino).

Nas amostras irrigadas, apenas dois grupos bacterianos (*Xanthobacteraceae* e *Sorangium*) apresentaram diferença significativa entre as diferentes variedades de cana-de-açúcar (Figura 2.5A). Ambos os grupos bacterianos apresentaram maior abundância de *reads* na rizosfera da variedade resistente. O fato das plantas crescerem no mesmo tipo de solo pode ter contribuído para que a rizosfera das duas variedades apresentasse composição similar, uma vez que o solo atua como fonte primária de bactérias as quais colonizarão a rizosfera (Berg & Smalla, 2009; de Souza *et al.*, 2016; Nicolitch *et al.*, 2016). Por outro lado, quando as plantas foram submetidas ao estresse hídrico, foi possível observar que a composição da microbiota ativa das duas variedades apresentou uma maior variação entre si, em comparação com a condição controle (Figura 2.5B). A variedade resistente apresentou maior abundância de *reads* de bactérias conhecidas por sua resistência ao estresse como

as pertencentes ao filo Actinobacteria e aos seus gêneros, *Actinomadura* e *Streptomyces* (Kämpfer *et al.*, 2014; Mohammadipanah & JoachimWink, 2016). Na rizosfera da variedade sensível, foi possível observar um aumento na abundância de *reads* relacionados a Proteobacteria (incluindo as classes Alpha, Beta e Gammaproteobacteria), Eucariotos não identificados e as ordens Cytophagales e Rhizobiales. Membros da ordem Cytophagales são comuns em solos e em material de plantas em decomposição uma vez que são capazes de degradar celulose, quitina e outros compostos. Portanto, essas bactérias possuem papel importante na ciclagem de nutrientes no solo (Reichenbach, 2006). A ordem Rhizobiales é conhecida por se associar de forma benéfica com diferentes plantas, fixando nitrogênio, fornecendo nutrientes ou produzindo fito-hormônios (Erlacher *et al.*, 2015).

Esses resultados sugerem que a microbiota metabolicamente ativa da rizosfera das duas variedades de cana-de-açúcar possui composição similar em condições normais de irrigação, pelo menos durante os estágios iniciais de desenvolvimento da planta avaliados nesse experimento. No entanto a comunidade microbiana apresentou mudanças na composição de alguns grupos taxonômicos quando as plantas foram submetidas ao estresse hídrico. Essas alterações na microbiota podem ser explicadas pelo fato das duas variedades de cana-de-açúcar apresentarem respostas diferentes quando submetidas a condições de estresse hídrico (baseado nos resultados de conteúdo de água na planta e composição dos ácidos orgânicos exsudados pelas raízes).

2.3.5. Efeito da variedade de cana-de-açúcar na composição funcional da microbiota metabolicamente ativa associada a rizosfera em diferentes condições de estresse hídrico

A análise estatística PERMANOVA ($p < 0,05$), baseada na anotação em subsistemas do SEED, revelou uma diferença na anotação funcional entre as variedades de cana-de-açúcar avaliadas ($F = 9,97$; $p = 0,006$). Esse resultado foi semelhante ao encontrado para os dados taxonômicos. A comparação entre as variedades de cana-de-açúcar realizado pelo teste de Welch revelou um total de 496 subsistemas com diferença significativa. Por isso, os resultados foram filtrados baseado na diferença entre as proporções ($> 0,2$), mostrando as funções com maior variação (Figura 2.6).

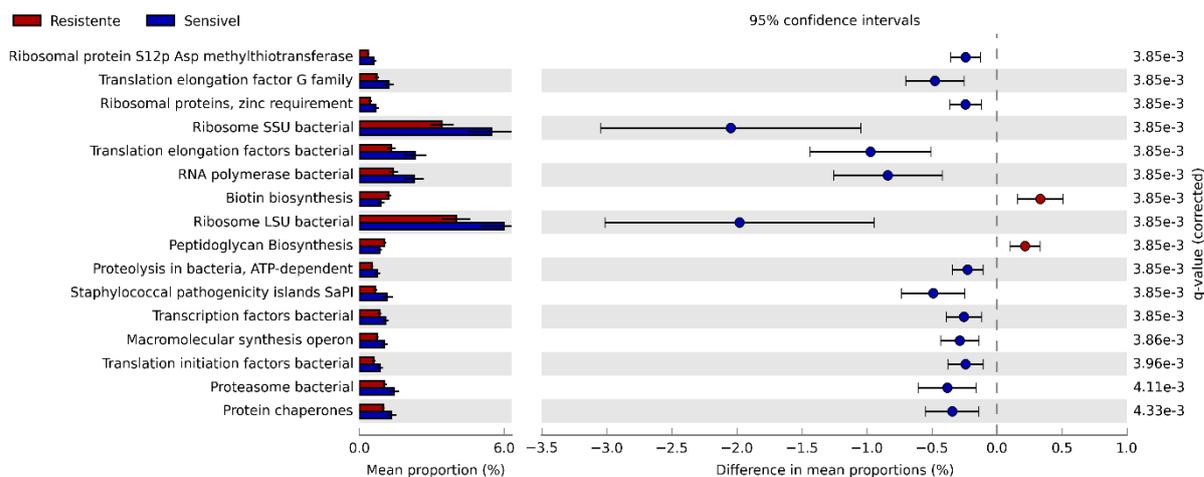


Figura 2.6. Diferenças significativas das categorias funcionais do nível dois do SEED entre as variedades de cana-de-açúcar CTC9001 (resistente) e RB855536 (sensível). Apenas categorias com diferença entre proporções > 0,2 são mostradas.

As funções associadas a biossíntese de biotina e de peptidoglicano apresentaram maior abundância de *reads* nas amostras da rizosfera da variedade resistente de cana-de-açúcar. A biotina (ou vitamina B7) é um importante cofator de várias carboxilases envolvidas na biossíntese de ácidos graxos, gliconeogênese e metabolismo de aminoácidos. As plantas são capazes de liberar biotina a partir das raízes podendo, então, ser utilizada pelos micro-organismos na rizosfera. No entanto, a quantidade de biotina liberada pela planta é frequentemente insuficiente para a microbiota, o que torna a capacidade de sintetizar essa vitamina uma vantagem seletiva para os micro-organismos (Streit & Entcheva, 2003; Vranova *et al.*, 2013). Além disso, Streit *et al.* (1996) demonstraram que a produção de biotina pela bactéria *Rhizobium meliloti* 1021, juntamente com a biotina liberada pelas raízes de alfafa, contribuíram para uma colonização efetiva da bactéria nas raízes dessas plantas. A síntese de peptidoglicano, por sua vez, pode estar envolvida no crescimento e tolerância a estresse em bactérias, uma vez que ele é o principal componente da parede celular desses organismos (Schimel *et al.*, 2007; Radkov *et al.*, 2018). Nota-se, portanto, que a microbiota da rizosfera da variedade resistente de cana-de-açúcar apresentou maior abundância de *reads* importantes para a adaptação celular em ambientes restritivos, o que pode contribuir para a sobrevivência desses micro-organismos durante o estresse hídrico.

A maioria das funções com maior abundância de *reads* na variedade sensível de cana-de-açúcar foi associada a proteínas envolvidas em diferentes etapas de transcrição e tradução. Além disso, duas funções envolvidas na degradação de proteínas (*proteolysis in bacteria* e *proteasome bacteria*) e uma envolvida a ilhas de patogenicidade (*staphylococcal pathogenicity islands SaPI*) também foram encontradas. O proteossoma é um complexo proteico onde se realiza a proteólise, ou seja, a quebra de proteínas pela célula. Além da remoção de proteínas mal dobradas ou danificadas, a proteólise também pode desempenhar papel importante na resposta a mudanças ambientais e estresse intracelular (Konovalova *et al.*, 2014; Becker & Darwin, 2016). As Ilhas de patogenicidade de *Staphylococcus aureus* (SaPIs), por sua vez, são uma grande família de ilhas de patogenicidade encontradas inicialmente em *S. aureus* (motivo pelo qual receberam esse nome). No entanto essa família também foi encontrada em outras bactérias Gram-positivas e são relacionadas a fagos móveis. Essas ilhas possuem genes responsáveis pela infecção da bactéria em animais e plantas (Ruzin *et al.*, 2001). Dessa forma, é possível observar que a microbiota da rizosfera da variedade sensível de cana-de-açúcar apresentou maior abundância de *reads* responsáveis por regular a expressão gênica em todos os níveis (DNA, RNA e proteínas). Além disso, a presença das ilhas de patogenicidade sugere que a microbiota da rizosfera também apresentou maior abundância de *reads* associados a virulência, em relação a variedade resistente.

O perfil funcional das duas variedades de cana-de-açúcar também foi avaliado separadamente nas condições irrigadas (amostras controle R0 e S0) e sob estresse hídrico (amostras submetidas a dois, oito e 12 dias de estresse). Quando a composição funcional da microbiota foi avaliada apenas nas condições controle, nenhum resultado significativo foi encontrado. Isso indica que todas as mudanças funcionais (baseado na abundância de *reads*) reportadas nesse trabalho para a microbiota da rizosfera ocorreram quando as plantas estavam sob o estresse hídrico. Essa suposição foi confirmada ao comparar a composição funcional da rizosfera das variedades de cana-de-açúcar sensível e resistente em condições de estresse. Nesse caso, os mesmos subsistemas funcionais do SEED reportados na Figura 2.6 foram encontrados. Esses resultados sugerem que, assim como observado na anotação taxonômica, a microbiota da rizosfera das duas variedades é semelhante em condições normais de irrigação. Em condições de estresse hídrico, no entanto, a microbiota das duas variedades responde de forma distintas.

Para entender a resposta da comunidade bacteriana na variedade sensível de cana-de-açúcar durante o estresse hídrico, os transcritos com expressão diferencial significativa (determinada pelo programa NOISeq, anexo III) foram submetidos à análise de enriquecimento de GO. A Figura 2.7 mostra o resultado da análise de enriquecimento para os transcritos com expressão diferencial na comparação entre a condição controle e o tratamento com dois dias de estresse hídrico. Nessa condição, os transcritos apresentaram uma diminuição significativa na expressão de genes relacionados a proteínas essenciais para o funcionamento celular. Muitas dessas funções são importantes em etapas de fermentação (atividade da metilmalonil-CoA carboxiltransferase), síntese de clorofila e bacterioclorofila (atividade da glutamil-tRNA redutase), síntese de aminoácidos (atividade da 3-desidroquinato e ligação a proteínas não dobradas) e funções celulares basais (atividade de ATPase de transporte de prótons, atividade de NAD⁺ sintase e ligação de ATP), indicando uma diminuição da atividade bacteriana nas amostras submetidas a dois dias de estresse hídrico (Hoffmann *et al.*, 1989; Herrmann, 1995; Bellinzoni *et al.*, 2002; Schauer *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2011). Os grupos taxonômicos associados a essas funções celulares foram, principalmente, as ordens Cytophagales (11,4%) e Rhizobiales (8,6%), além da família Xanthomonadaceae (8,6%).

Entre as funções com aumento de expressão na microbiota da rizosfera da variedade sensível de cana-de-açúcar em dois dias de estresse hídrico estão as recombinases local-específicas baseadas em tirosina. Essas recombinases são as principais enzimas envolvidas no movimento de elementos genéticos móveis em genomas bacterianos e catalisam vários processos biológicos, incluindo a integração de genomas de fagos, a integração e excisão de cassetes de íntegrans, a segregação correta de plasmídeos e cromossomos e a excisão de fragmentos de DNA específicos, responsáveis pela inativação transitória de genes (Van Houdt *et al.*, 2012). Essa função pode estar diretamente relacionada ao aumento da expressão de transcritos associados ao metabolismo de purinas e pirimidinas (atividade da enzima ribonucleotídeo 5-(carboxiamino)imidazol, atividade da diidroorotato desidrogenase e atividade da fosforibosilaminoimidazol carboxilase) e degradação de proteínas (atividade da endopeptidase do tipo cisteína) (Mueller *et al.*, 1994; Kilstrup *et al.*, 2005). Além disso, houve aumento de transcritos relacionados a síntese de porfirina e clorofila (atividade da glutamato-1-semialdeído 2,1-aminomutase) (Masuda & Fujita,

2008). Os principais táxons associados ao aumento da expressão desses transcritos foram Alphaproteobacteria (8,9%), Cytophagales (6,7%) e Flavobacteriaceae (6,7%).

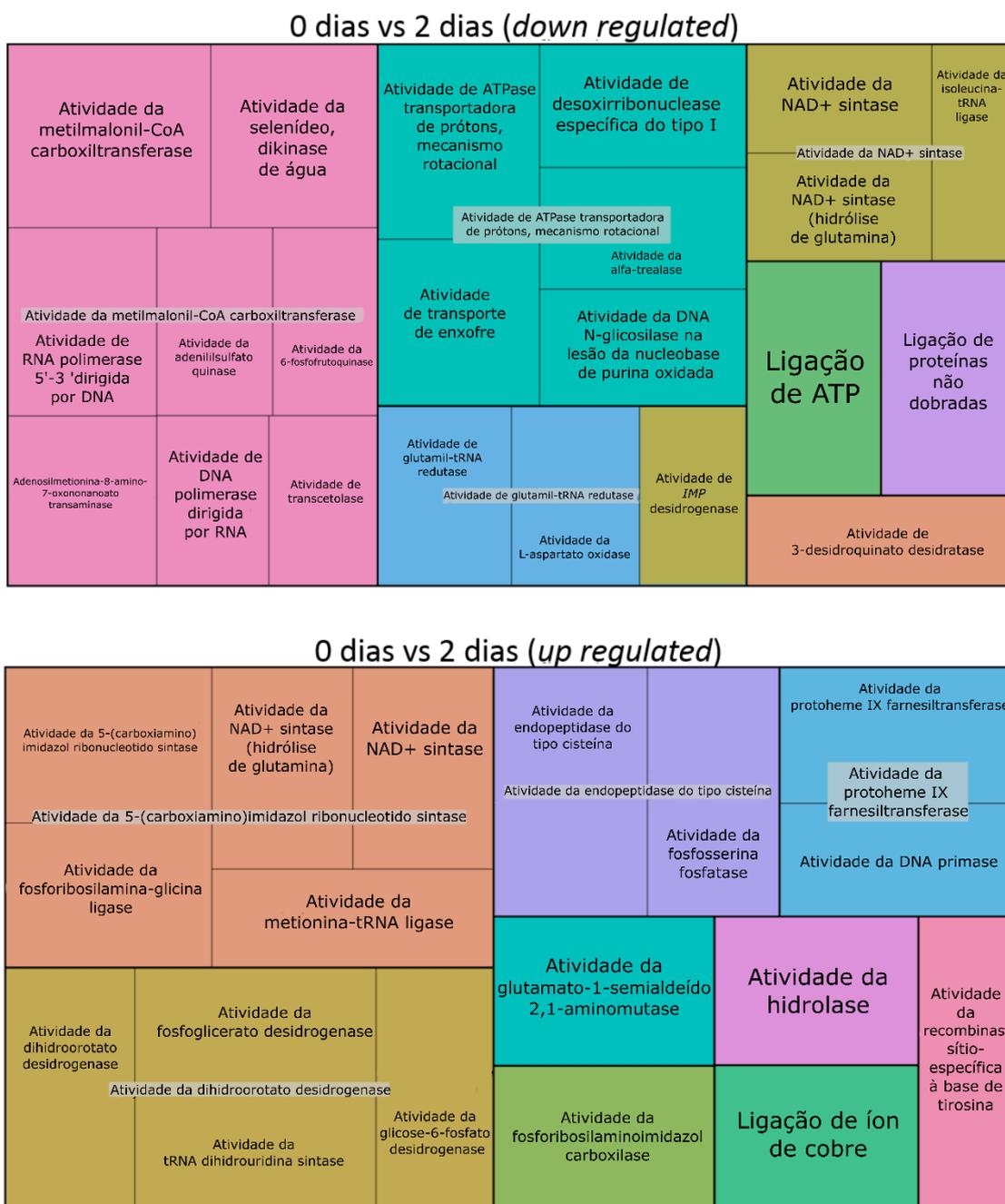


Figura 2.7. Análise de enriquecimento de GO relacionados a processos biológicos resumida e visualizada como um gráfico *Treemap* usando o programa REVIGO para os transcritos *down* e *up regulated* entre zero e dois dias de estresse hídrico. O tamanho dos quadros indica a significância (valor $-\log_{10}$ do *p-value*) dos termos enriquecidos. Quadros com cores iguais correspondem aos termos GO pertencentes a mesma categoria funcional.

Em resumo, pode-se observar que um curto período de estresse hídrico foi capaz de promover mudanças na expressão gênica de alguns membros da microbiota da rizosfera. Essas alterações podem interferir nas associações entre as plantas e as bactérias que estavam estabelecidas em condições normais de irrigação.

A Figura 2.8 mostra o resultado da análise de enriquecimento para os transcritos com expressão diferencial na comparação entre a condição controle e o tratamento com oito dias de estresse hídrico da variedade sensível de cana-de-açúcar. Os resultados mostraram uma diminuição da atividade celular devido à queda na expressão de proteínas ribossomais ou de ligação ao ribossomo (constituente estrutural do ribossomo e ligação ao rRNA), geração de energia (atividade *GTPase* e atividade da metilmalonil-CoA carboxiltransferase), metabolismo de ácidos graxos (atividade da biotina carboxilase) e estruturação celular (atividade de estrutura molecular), indicando um impacto negativo do estresse hídrico na microbiota da rizosfera dessa variedade. Novamente, o grupo taxonômico mais abundante associado a essas funções foi a ordem Cytophagales (33,7%), seguida da família Anaerolineaceae (7,4%).

Também foi possível observar uma diminuição da expressão de catalases, cuja função é decompor o peróxido de hidrogênio e proteger as células contra o estresse oxidativo. A formação de peróxido de hidrogênio ocorre em condições de estresse bióticos e abióticos e também pode ser liberado pelas raízes das plantas na rizosfera (Chelikani *et al.*, 2012). Dessa forma, bactérias capazes de eliminar de forma eficiente esse composto podem sobreviver em ambientes restritivos e colonizar raízes de plantas. Hussain *et al.* (2014) isolaram bactérias a partir de nódulos de lentilha, grão de bico e feijão cultivados em solos áridos no Paquistão e avaliaram a capacidade desses isolados em promover o crescimento de plantas de trigo em condições de estresse. Os resultados mostraram que espécies de *Rhizobium* sp. e *Mesorhizobium* sp. interagem de forma benéfica com as plantas de trigo sob estresse hídrico. Os autores sugerem que a capacidade de produzir catalase e exopolissacarídeos por essas bactérias foi fundamental para a sua sobrevivência e colonização das plantas.

aglomerados de ferro e enxofre, atividade da fosforibosilaminoimidazol carboxilase e ligação a ubiquitina), carboidratos (atividade de transporte transmembranar da fucose e ligação a carboidratos), vitaminas (atividade da piridoxina:NADP 4-desidrogenase, atividade da 3-metil-2-oxobutanoato hidroximetiltransferase e atividade da 5-formiltetra-hidrofolato ciclo-ligase) e síntese de parede celular (atividade da glutamato racemase) apresentaram um aumento da expressão gênica nas amostras da rizosfera submetidas a oito dias de estresse hídrico. Durante situações de estresse, as bactérias podem realocar recursos e/ou usá-los de forma mais eficiente a fim de permitir a integridade da célula microbiana (Tiemann & Billings, 2011). Dessa forma, os resultados observados sugerem uma modificação do metabolismo de alguns grupos microbianos da rizosfera. Essas mudanças podem ter sido induzidas pelas bactérias como mecanismo de sobrevivência em condições de estresse hídrico. Entre esses grupos microbianos, os mais abundantes foram Proteobacteria (10%), Cytophagales (6,3%), *Devosia* (6,3%) e *Aequorivita* (5%).

A análise de enriquecimento de GO também foi realizada para os transcritos diferencialmente expressos nas amostras tratadas com doze dias de estresse hídrico, em relação à amostra controle (Figura 2.9). Nessa condição de estresse hídrico, foi possível observar diminuição na atividade microbiana devido a diminuição da expressão de transcritos que codificam proteínas ribossomais, proteínas de ligação ao ribossomo, DNA polimerase e metabolismo de proteínas. Os principais grupos taxonômicos afetados foram Cytophagales (25,5%), Bacteroidetes (8,5%) e *Pedospaera* (6,4%). Por outro lado, outros transcritos também associados a ribossomos, metabolismo energético, além de fatores de transcrição apresentaram aumento da expressão nas amostras com 12 dias de estresse hídrico. Esses transcritos foram identificados como Proteobacteria (8,39%), Actinobacteria (5,79%), Polyangiaceae (4,53%) e *Streptomyces* (4,25%). Algumas bactérias podem armazenar grandes quantidades de ribossomos em situações de estresse, o que permite responder com uma rápida alteração na síntese proteica quando o estresse se intensifica (Placella *et al.*, 2012). A grande abundância de proteínas ribossomais e envolvidas na tradução observadas nas análises de enriquecimento nesse período de estresse hídrico sugere que essa estratégia pode estar sendo adotada por alguns grupos microbianos na rizosfera da variedade sensível de cana-de-açúcar.

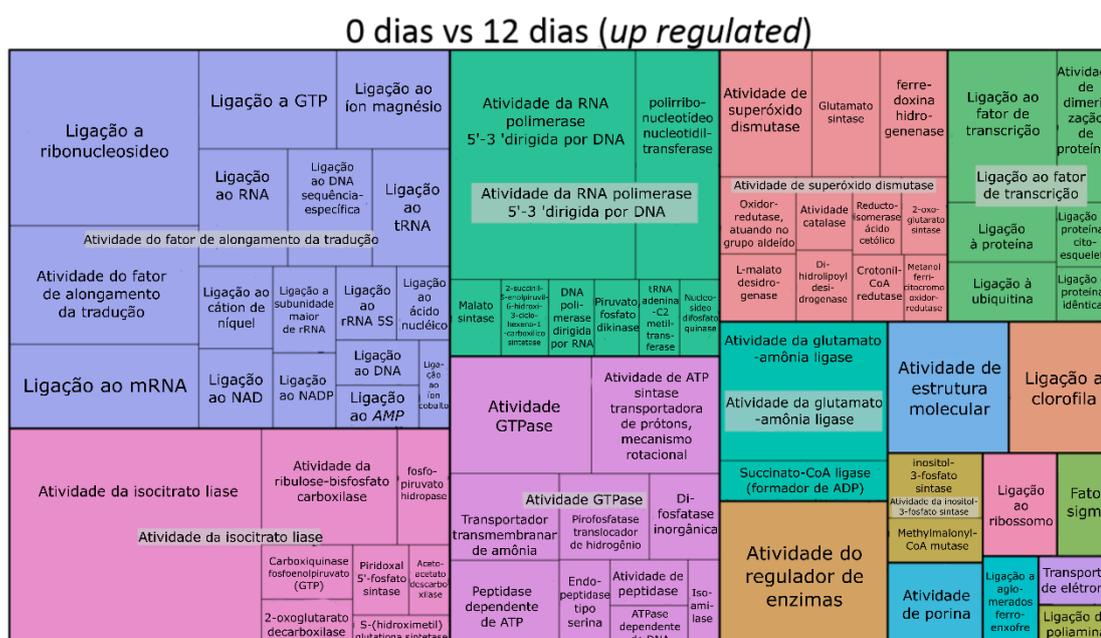
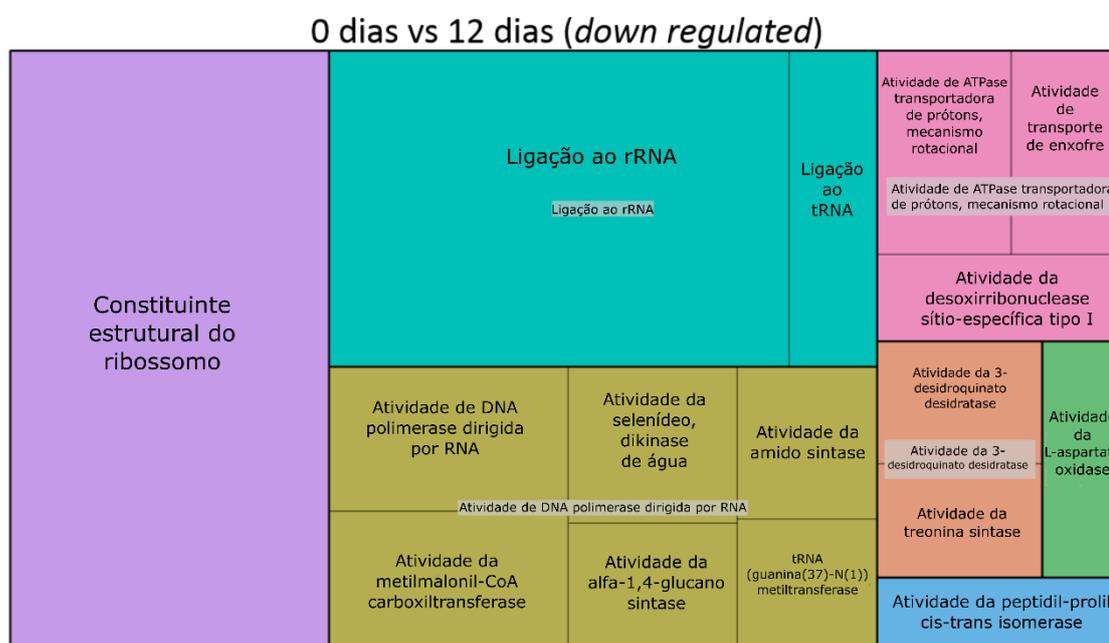


Figura 2.9. Análise de enriquecimento de GO relacionados a processos biológicos resumida e visualizada como um gráfico *Treemap* usando o programa REVIGO para os transcritos *down* e *up regulated* entre zero e doze dias de estresse hídrico. O tamanho dos quadros indica a significância (valor $-\log_{10}$ do *p-value*) dos termos enriquecidos. Quadros com cores iguais correspondem aos termos GO pertencentes a mesma categoria funcional.

Nas amostras submetidas a 12 dias de estresse hídrico também foi reportada um aumento da expressão de genes que codificam proteínas com a

atividade de superóxido dismutase que podem ter contribuído para a adaptação das bactérias nessas condições de estresse. Essa enzima atua na redução de radicais de oxigênio, protegendo as células do estresse oxidativo causado pelo próprio metabolismo da bactéria ou durante o processo de colonização de raízes das plantas (Scott *et al.*, 1987). A atividade da superóxido dismutase já foi reportada como essencial para a colonização de *Sinorhizobium meliloti* em alfafa (Santos *et al.*, 2000), *Pseudomonas putida* em feijão (Kim *et al.*, 2000) e *Bacillus cereus* em plantas de trigo (Wang *et al.*, 2007).

Os transcritos diferencialmente expressos na variedade sensível de cana-de-açúcar não apresentaram uma anotação taxonômica e funcional do metatranscriptoma muito precisa, o que dificultou uma análise detalhada das mudanças ocorridas na microbiota da rizosfera durante o tempo do estresse hídrico. No entanto, algumas diferenças importantes entre as variedades resistente (Capítulo 1) e sensível de cana-de-açúcar puderam ser observadas. Dessa forma, uma comparação entre os resultados obtidos para as duas variedades é apresentada a seguir.

Com dois dias de estresse hídrico, a microbiota da variedade resistente apresentou diminuição de transcritos relacionados a síntese da parede celular, resultando numa desaceleração do crescimento microbiano de grupos como Flavobacteriaceae e Phyllobacteriaceae. Ao mesmo tempo em que algumas bactérias (Proteobacteria e Bacteroidetes) aumentaram mecanismos de adesão celular e mobilidade, importantes para colonizar a rizosfera. Na variedade sensível, o impacto da seca aparentou ser mais proeminente na comunidade bacteriana uma vez que muitos transcritos do metabolismo energético nas células foram reprimidos. Além disso, houve um aumento na expressão de transcritos associados a movimentação de sequências de DNA (fagos e profagos) e regulação gênica. Essas alterações na expressão foram reportadas principalmente em Cytophagales e Rhizobiales.

Nas amostras submetidas a oito dias de estresse hídrico, alguns membros da microbiota, como Cytophagales e Polyangiaceae, tiveram a atividade metabólica inibida tanto na variedade resistente quanto na variedade sensível de cana-de-açúcar, demonstrado pela diminuição de transcritos relacionados a metabolismo de DNA, RNA e obtenção de energia. Por outro lado, ao se comparar os transcritos que apresentaram aumento na expressão no tratamento de oito dias de estresse hídrico, foi possível observar diferenças na resposta na comunidade microbiana associada as

diferentes variedades de cana-de-açúcar. Na variedade resistente houve o aumento de atividades tipicamente envolvidas na proteção das células contra o estresse como a síntese de parede celular e proteólise, além do aumento do metabolismo de fontes simples de carbono, como a metilamina. Nesse caso, os grupos taxonômicos envolvidos foram Flavobacteriaceae, *Aequorivita* e *Rhodanobacter*. Na variedade sensível, os transcritos associados ao metabolismo de DNA, proteínas, carboidratos e vitaminas foram associados com a ordem Cytophagales e os gêneros *Devosia* e *Aequorivita*, indicando um aumento da atividade celular desses grupos bacterianos.

Na condição de estresse hídrico mais severa (12 dias), algumas bactérias da microbiota associada à variedade resistente como *Streptomyces* e Cytophagales apresentaram diminuição de transcritos relacionados a respiração, síntese de ribossomos, dobramento de proteínas e tradução, indicando diminuição da atividade celular desses grupos microbianos. Por outro lado, Sphingomonadales, Xanthobacteriaceae e *Rhodanobacter* aumentaram a expressão de mecanismos de mobilidade celular, secreção e metabolismo de carboidratos mais complexos. Tais mecanismos provavelmente permitiram que essas bactérias sobrevivessem na rizosfera durante o período de estresse hídrico mais acentuado. Na variedade sensível, foi possível observar um comportamento oposto para alguns dos grupos taxonômicos identificados nas amostras. Membros do filo Bacteroidetes (principalmente da ordem Cytophagales) diminuíram a expressão gênica, enquanto que, o gênero *Streptomyces* e outras Actinobacteria não identificadas aumentaram sua atividade celular em doze dias de estresse hídrico, aumentando principalmente a expressão de transcritos relacionados à tradução.

2.3.6. Influência dos exsudados radiculares sobre o perfil de expressão da microbiota associada a rizosfera de cana-de-açúcar RB855536

Um total de 9.514 transcritos que apresentaram diferença significativa na expressão entre a condição controle (0 dias) e algum dos tratamentos de estresse hídrico (Anexo III) foram correlacionados com ácidos cítrico, málico, láctico e succínico exsudados pelas raízes da cana-de-açúcar da variedade sensível. Esses quatro ácidos orgânicos apresentaram mudanças significativas nas taxas de exsudação ao longo do estresse. Baseado na correlação de Spearman ($p < 0,05$), 2.777 (29,2%)

transcritos foram correlacionados com pelo menos um dos ácidos orgânicos analisados (Tabela 2.5).

Tabela 2.5. Número de transcritos que apresentaram correlação significativa (Spearman $p < 0,05$) com os ácidos cítrico, málico, láctico e succínico, exudados pelas raízes de cana-de-açúcar RB855536.

Ácido orgânico	Número de transcritos	
	Correlação positiva ($rs > 0,8$)	Correlação negativa ($rs < -0,8$)
Cítrico	25	232
Málico	137	1.792
Láctico	118	206
Succínico	34	257
Total	314	2.487
Total (não repetidos)	310	2.467

Um total de 1.251 (45%) dos transcritos com correlação significativa ($p < 0,05$) puderam ser classificados em algum nível taxonômico. Para a anotação funcional, incluindo os bancos de dados do SEED, KEGG e GO, o total de transcritos anotados foi de 613 (22%). Os filios com mais transcritos correlacionados com os ácidos orgânicos foram Proteobacteria (39,2%), Actinobacteria (16,2%) e Firmicutes (5,4%). Os dados diferem daqueles encontrados para a variedade resistente, em que o filo Bacteroidetes foi o que mais apresentou correlação significativa com os ácidos orgânicos avaliados.

Ao nível de gênero, *Streptomyces* (Actinobacteria) foi o grupo bacteriano que apresentou maior abundância de transcritos correlacionados com os ácidos orgânicos cítrico, málico e succínico. Esse gênero é encontrado predominantemente no solo e na vegetação em decomposição. A maioria das bactérias desse grupo são capazes de produzir esporos e uma diversidade de metabólitos secundários, como antibióticos. Tais características permitem que *Streptomyces* habite ambientes restritos em nutrientes ou sob outros tipos de estresse abiótico (Anderson & Wellington, 2001; Chater *et al.*, 2010; Labeda, 2011). Além disso, membros desse grupo são capazes de promover o crescimento vegetal em condições normais ou sob estresse através da produção de fito-hormônios e sideróforos (Sadeghi *et al.*, 2012;

Yandigeri *et al.*, 2012). Todos os transcritos de *Streptomyces* foram correlacionados negativamente com um ou mais ácidos orgânicos (isto é, apresentaram diminuição na expressão dos transcritos quando houve aumento na exsudação dos ácidos orgânicos, e vice-versa) e foram associados com biossíntese de aminoácidos, metabolismo de DNA (proteínas de ligação ao DNA e de recombinação de DNA), metabolismo energético, componentes de membrana, metabolismo de RNA, peptidases e o regulador transcricional HrdD. A proteína HrdD é um fator sigma transcrito durante o crescimento de *Streptomyces* e responsável por regular genes envolvidos na biossíntese de antibióticos, além de poder ser induzida sob estresse oxidativo e osmótico (Lee *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). Portanto, um aumento na expressão de transcritos relacionados ao fator sigma HrdD pode estar envolvido na sobrevivência de *Streptomyces* em condições de estresse, o que explica o aumento da expressão de transcritos desse gênero nas amostras submetidas a doze dias de estresse hídrico (observado nas amostras de enriquecimento de GO). Além disso, a diminuição das taxas de exsudação dos ácidos orgânicos nas amostras submetidas a doze dias de estresse hídrico pode ter atuado como sinal químico para a expressão dos genes de *Streptomyces*.

Outros grupos bacterianos com correlação negativa com os ácidos orgânicos foram outras Actinobacteria e alguns membros de Proteobacteria (Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Polyangiaceae e Rhizobiales), cuja funções identificadas eram de transporte de membrana e fatores de transcrição. Por outro lado, os transcritos que apresentaram correlação positiva com um ou mais ácidos orgânicos pertenciam, em sua maioria, a ordem Cytophagales (Bacteroidetes). As principais funções celulares associadas a essa ordem foram a atividade de transporte de membrana e proteínas ribossômicas. Esses resultados corroboram os dados observados nas análises de enriquecimento de GO, onde Cytophagales é um dos principais grupos taxonômicos com aumento na expressão gênica nas amostras submetidas ao estresse hídrico.

Nas análises de correlação entre os transcritos diferencialmente expressos da microbiota e os ácidos orgânicos exsudados pelas duas variedades de cana-de-açúcar, foi possível observar maior correlações significativas com uma pequena proporção de transcritos analisados. O gênero com maior abundância de transcritos associados aos exsudados da variedade resistente de cana-de-açúcar foi *Aequorivita*, o qual apresentou correlação positiva com proteínas de transporte, peptidases e

fatores de transcrição (Capítulo 1). Na variedade sensível, por sua vez, *Streptomyces* foi o gênero mais abundante, o qual apresentou correlação negativa com os exsudados para as mesmas funções celulares reportadas para *Aequorivita*. Esses resultados sugerem que, as diferenças na taxa de exsudação apresentadas pelas duas variedades de cana-de-açúcar, principalmente aos 12 dias de estresse hídrico, foram capazes de promover repostas diferentes nas bactérias presentes na rizosfera ou, ainda, promover respostas similares em grupos taxonômicos distintos.

2.4. Conclusões

A avaliação do crescimento da variedade de cana-de-açúcar RB855536 revelou um comportamento diferente quando comparada com a variedade CTC9001, uma vez que apresentou diminuição do teor de água na parte aérea e na raiz durante período de estresse hídrico analisado. Além disso, a taxa de exsudação dos ácidos orgânicos também foi diferente para as duas variedades. Essas diferenças não foram capazes de promover diferenças importantes na composição e na atividade microbiana da rizosfera entre as duas variedades em condições normais de irrigação. No entanto, a partir de dois dias de estresse hídrico, foi possível observar diferenças na resposta da microbiota de cada variedade. A variedade resistente de cana-de-açúcar aparenta fornecer condições favoráveis para as atividades bacterianas associadas a mobilidade, colonização e crescimento celular. A variedade sensível apresentou modificações na regulação gênica, principalmente através de proteínas de ligação ao DNA e ao ribossomo. Os mesmos grupos taxonômicos, como *Streptomyces* e *Aequorivita* responderam de forma diferente ao estresse hídrico quando associados a diferentes variedades de cana-de-açúcar, sugerindo uma participação da planta na modulação da atividade microbiana na rizosfera.

2.5. Referências Bibliográficas

- Alexa A, Rahnenfuhrer J (2016). *topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology*. R package version 2.33.0.
- Anderson AS, Wellington EM (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 797-814.
- Badri DV, Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 642–650.
- Baker BJ, Sheik CS, Taylor CA *et al.* (2013) Community transcriptomic assembly reveals microbes that contribute to deep-sea carbon and nitrogen cycling. *ISME Journal*, 7: 1962–1973.
- Becker SH, Darwin KH (2017) Bacterial proteasomes: mechanistic and functional Insights. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81:e00036-16.
- Bellinzoni M, De Rossi E, Branzoni M *et al.* (2002) Heterologous expression, purification, and enzymatic activity of NAD⁺ synthetase. *Protein Expression and Purification*, 25: 547–557.
- Berg G, Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 68: 1–13.
- Cawthray GR (2003) An improved reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of low-molecular mass organic acids in plant root exudates. *Journal of Chromatography A*, 1011(1-2): 233-240.
- Chandra P, Chandra A (2017) Identification and molecular characterization of *Castellaniella ginsengisoli* Isolated from sugarcane-wheat cropping system. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(10): 3509-3515.
- Chater KF, Biró S, Lee K *et al.* (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*: review article. *FEMS Microbiology Reviews*, 34: 171–198.
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61: 192–208.

- Cieslinski G, Van Rees KCJ, Szmigielska AM, Huang PM (1997) Low molecular weight organic acids released from roots of durum wheat and flax into sterile nutrient solutions. *Journal of Plant Nutrition*, 20(6): 753-764.
- Da Costa DP, Dias ACF, Durrer A *et al.* (2014) Composição diferencial das comunidades bacterianas na rizosfera de variedades de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 38:1694-1702.
- De Souza RSC, Okura VK, Armanhi JSL *et al.* (2016) Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Scientific Reports*, 6: 1-15.
- Dias MVB, Snee WC, Bromfield KM *et al.* (2011) Structural investigation of inhibitor designs targeting 3-dehydroquinate dehydratase from the shikimate pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemical Journal*, 436: 729–739.
- Edwards J, Johnson C, Santos-Medellín C *et al.* (2015) Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(8): E911-E920.
- Erlacher A, Cernava T, Cardinale M *et al.* (2015) Rhizobiales as functional and endosymbiotic members in the lichen symbiosis of *Lobaria pulmonaria* L. *Frontiers in microbiology*, 6: 53.
- Gava GJC, Silva MA, Silva RC *et al.* (2011) Produtividade de três cultivares de cana-de-açúcar sob manejos de sequeiro e irrigado por gotejamento. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 3: 250–255.
- González-López J, Rodelas B, Pozo C *et al.* (2005) Liberation of amino acids by heterotrophic nitrogen fixing bacteria. *Amino Acids*, 28: 363–367.
- Guimarães CM, Stone LF (2008) Métodos de Avaliação das Condições Hídricas das Plantas. *Comunicado Técnico 161*, ISSN 1678-961X.
- Gu JF, Qiu M, Yang JC (2013) Enhanced tolerance to drought in transgenic rice plants overexpressing C4 photosynthesis enzymes. *The Crop Journal*, 1(2): 105-114.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1): 1-9.
- Hamonts K, Trivedi P, Garg A *et al.* (2018) Field study reveals core plant microbiota and relative importance of their drivers. *Environmental Microbiology*, 20(1): 124–140.

- Hayward AC, Fegan N, Fegan M, Stirling GR (2010) *Stenotrophomonas* and *Lysobacter*: ubiquitous plant-associated gamma-proteobacteria of developing significance in applied microbiology. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 756–770.
- Herrmann KM (1995) The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiology*, 107: 7-1 2.
- Hoffmann A, Hilpert W, Dimroth P (1989) The carboxyltransferase activity of the sodium-ion-translocating methylmalonyl-CoA decarboxylase of *Veillonella alcalescens*. *European Journal of Biochemistry*, 179: 645-650.
- Hooper AM, Caulfield JC, Hao B *et al.* (2015) Isolation and identification of *Desmodium* root exudates from drought tolerant species used as intercrops against *Striga hermonthica*. *Phytochemistry*, 117: 380-387.
- Huson DH, Auch AF, Qi J, Schuster SC (2007) MEGAN analysis of metagenome data. *Genome Research*, 17: 377-386.
- Hussain MB, Zahir ZA, Asghar HN, Asghar M (2014) Can catalase and exopolysaccharides producing rhizobia ameliorate drought stress in wheat. *International Journal of Agriculture & Biology*, 16: 3-13.
- Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WX *et al.* (1997) Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium gen. nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3): 895-898.
- Kämpfer P, Glaeser SP, Parkes L, van Keulen G, Dyson P (2014) The Family Streptomycetaceae. In: Edward F, DeLong EF, Stephen L *et al.* *The Prokaryotes* (pp. 889-1010). Springer Berlin Heidelberg.
- Kilstrup M, Hammer K, Jensen P, Martinussen J (2005) Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 555-590.
- Kim YC, Miller CD, Anderson AJ (2000) Superoxide dismutase activity in *Pseudomonas putida* affects utilization of sugars and growth on root surfaces. *Applied And Environmental Microbiology*, 66(4): 1460-1467.
- Konovalova A, Søgaard-Andersen L, Kroos L (2014) Regulated proteolysis in bacterial development. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(3): 493–522.
- Labeda DP (2011) Multilocus sequence analysis of phytopathogenic species of the genus streptomyces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61: 2525–2531.

- Lee EJ, Karoonuthaisiri N, Kim HS *et al.* (2005) A master regulator σ^B governs osmotic and oxidative response as well as differentiation via a network of sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology*, 57(5): 1252–1264.
- Li H (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv preprint, arXiv:1303.3997.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014) FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 30(7): 923–930.
- Mahoney AK, Yin C, Hulbert SH (2017) Community structure, species variation, and potential functions of rhizosphere-associated bacteria of different winter wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Frontiers in plant science*, 8: 132.
- Martins N, Gonçalves S, Andrade PB, Valentão P, Romano A (2013) Changes on organic acid secretion and accumulation in *Plantago almogravensis* Franco and *Plantago algarbiensis* Samp. under aluminum stress. *Plant Science*, 198: 1-6.
- Masuda T, Fujita Y (2008) Regulation and evolution of chlorophyll metabolism. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7: 1131-1149.
- Mimmo T, Ghizzi M, Marzadori C, Gessa CE (2008) Organic acid extraction from rhizosphere soil: effect of field-moist, dried and frozen samples. *Plant and Soil*, 312(1-2): 175-184.
- Micallef SA, Shiaris MP, Colón-Carmona A (2009) Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *Journal of Experimental Botany*, 60(6): 1729–1742.
- Mohammadipanah F, Wink J (2016) Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity. *Frontiers in Microbiology*. 28(6): 1541.
- Mueller EJ, Meyer E, Rudolph J, Davisson VJ, Stubbe J (1994) N⁵-carboxyaminoimidazole ribonucleotide: evidence for a new intermediate and two new enzymatic activities in the *de novo* purine biosynthetic pathway of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 33: 2269-2278.
- Nguyen TM, Pham VH, Kim J (2015) *Mesorhizobium soli* sp. nov., a novel species isolated from the rhizosphere of *Robinia pseudoacacia* L. in South Korea by using a modified culture method. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108: 301–310.
- Nicolitch O, Colin Y, Turpault MP, Uroz S (2016) Soil type determines the distribution of nutrient mobilizing bacterial communities in the rhizosphere of beech trees. *Soil Biology and Biochemistry*, 103: 429-445.

- Omori WP, Camargo AF, Goulart KCS, Lemos EGM, Souza JAM (2016) Influence of vinasse application in the structure and composition of the bacterial community of the soil under sugarcane cultivation. *International Journal of Microbiology*, ID: 2349514.
- Parks DH, Beiko RG (2010) Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics*, 26(6): 715–721.
- Patel RK, Jain M (2012) NGS QC toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS ONE*, 7(2): e30619.
- Pisa G, Magnani GS, Weber H *et al.* (2011) Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(12): 1215-1221.
- Placella SA, Brodie EL, Firestone MK (2012) Rainfall-induced carbon dioxide pulses result from sequential resuscitation of phylogenetically clustered microbial groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27): 10931-10 936.
- Puopolo G, Giovannini O, Pertot I (2014) *Lysobacter capsici* AZ78 can be combined with copper to effectively control *Plasmopara viticola* on grapevine. *Microbiological Research*, 169: 633–642.
- Puopolo G, Tomada S, Pertot I (2018) The impact of the omics era on the knowledge and use of *Lysobacter* species to control phytopathogenic micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 124: 15--27.
- Radkov AD, Hsu YP, Booher G, Vannieuwenhze MS (2018) Imaging bacterial cell wall biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 22(1): 1-24.
- Reichenbach H (2006) The Order Cytophagales. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, pp 549-590.
- Rho M, Tang H, Ye Y (2010) FragGeneScan: Predicting genes in short and error-prone reads. *Nucleic Acids Research*, 38(20): e191.
- RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (2010) Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-acúcar. Curitiba, 136pp.
- Rosenzweig N, Tiedje JM, Quensen JF, Meng Q, Hao JJ (2012) Microbial communities associated with potato common scab-suppressive soil determined by pyrosequencing analyses. *Plant Disease*, 96: 718-725.

- Ruzin A, Lindsay J, Novick R (2001) Molecular genetics of SaPI1 - a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 41(2): 365–377.
- Ryan MH, Tibbett M, Edmonds-Tibbett T *et al.* (2012) Carbon trading for phosphorus gain: the balance between rhizosphere carboxylates and arbuscular mycorrhizal symbiosis in plant phosphorus acquisition. *Plant, Cell & Environment*, 35(12): 2170–2180.
- Sadeghi A, Karimi E, Dahaji P *et al.* (2012) Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28:1503–1509.
- Salmeron-Lopez V, Martinez-Toledo MV, Salmeron-Miron V, Pozo C, Gonzalez-Lopez J (2004) Production of amino acids by *Rhizobium*, *Mesorhizobium* and *Sinorhizobium* strains in chemically defined media. *Amino Acids*, 27: 169–174.
- Santos R, Hérouart D, Puppo A, Touati D (2000) Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Molecular Microbiology*, 38(4): 750-759.
- Sasse J, Martinoia E, Northen T (2018) Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends in Plant Science*, 23(1): 25-41.
- Schauer S, Chaturvedi S, Randau L *et al.* (2002) *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(50): 48657–48663.
- Schimel J, Balser T, Wallenstein M (2007) Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, 88(6): 1386-1394.
- Schmieder R, Lim, Y, Edwards R (2012) Identification and removal of ribosomal RNA sequences from metatranscriptomes. *Bioinformatics*, 28(3): 433–435.
- Scott M, Meshnick S, Eaton J (1987) Superoxide dismutase-rich bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 262(8): 3640-3645.
- Simões Neto D, Oliveira A, Rocha A *et al.* (2012) Características agroindustriais da cana-de-açúcar em função da adubação fosfatada, em solos de Pernambuco. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 16(4): 347–354.
- Song F, Han X, Zhu X, Herbert S (2012) Response to water stress of soil enzymes and root exudates from drought and non-drought tolerant corn hybrids at different growth stages. *Canadian Journal of Soil Science*, 92(3): 501-507.

- Streit W (1996) Biotin and other water-soluble vitamins are key growth factors for alfalfa root colonization by *Rhizobium meliloti* 1021. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9(5): 330-338.
- Streit W, Entcheva P (2003) Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 21–31.
- Sun D, Liu C, Zhu J, Liu W (2017) Connecting metabolic pathways: sigma factors in *Streptomyces* spp. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1-7.
- Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T (2011) Revigo summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS ONE*, 6(7): e21800.
- Tamayo P, Slonim D, Mesirov J *et al.* (1999) Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Genetics*, 96: 2907-2912.
- Tarazona S, Furió-Tarí P, Turrà D *et al.* (2015) Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Research*, 43(21): e140.
- Tiemann LK, Billings SA (2011) Changes in variability of soil moisture alter microbial community C and N resource use. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: 1837-1847.
- Van Dam N, Bouwmeester H (2016) Metabolomics in the rhizosphere: tapping into belowground chemical communication. *Trends in Plant Science*, 21(3): 256-265.
- Van Houdt R, Leplae R, Lima-Mendez G, Mergeay M, Toussaint A (2012) Towards a more accurate annotation of tyrosine-based site-specific recombinases in bacterial genomes. *Mobile DNA*, 3(1): 6.
- Vranova V, Rejsek K, Skene K, Janous D, Formanek P (2013) Methods of collection of plant root exudates in relation to plant metabolism and purpose: a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176: 175–199.
- Walters WA, Jin Z, Youngblut N *et al.* (2018) Large-scale replicated field study of maize rhizosphere identifies heritable microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201800918.
- Wang L, Chen X, Wu G *et al.* (2017) Enhanced ϵ -poly-L-lysine production by inducing double antibiotic-resistant mutations in *Streptomyces albulus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40:271–283.
- Wang Y, Wang H, Yang C, Wang Q, Mei R (2007) Two distinct manganese-containing superoxide dismutase genes in *Bacillus cereus*: their physiological characterizations

and roles in surviving in wheat rhizosphere. *FEMS Microbiology Letters*, 27: 206–213.

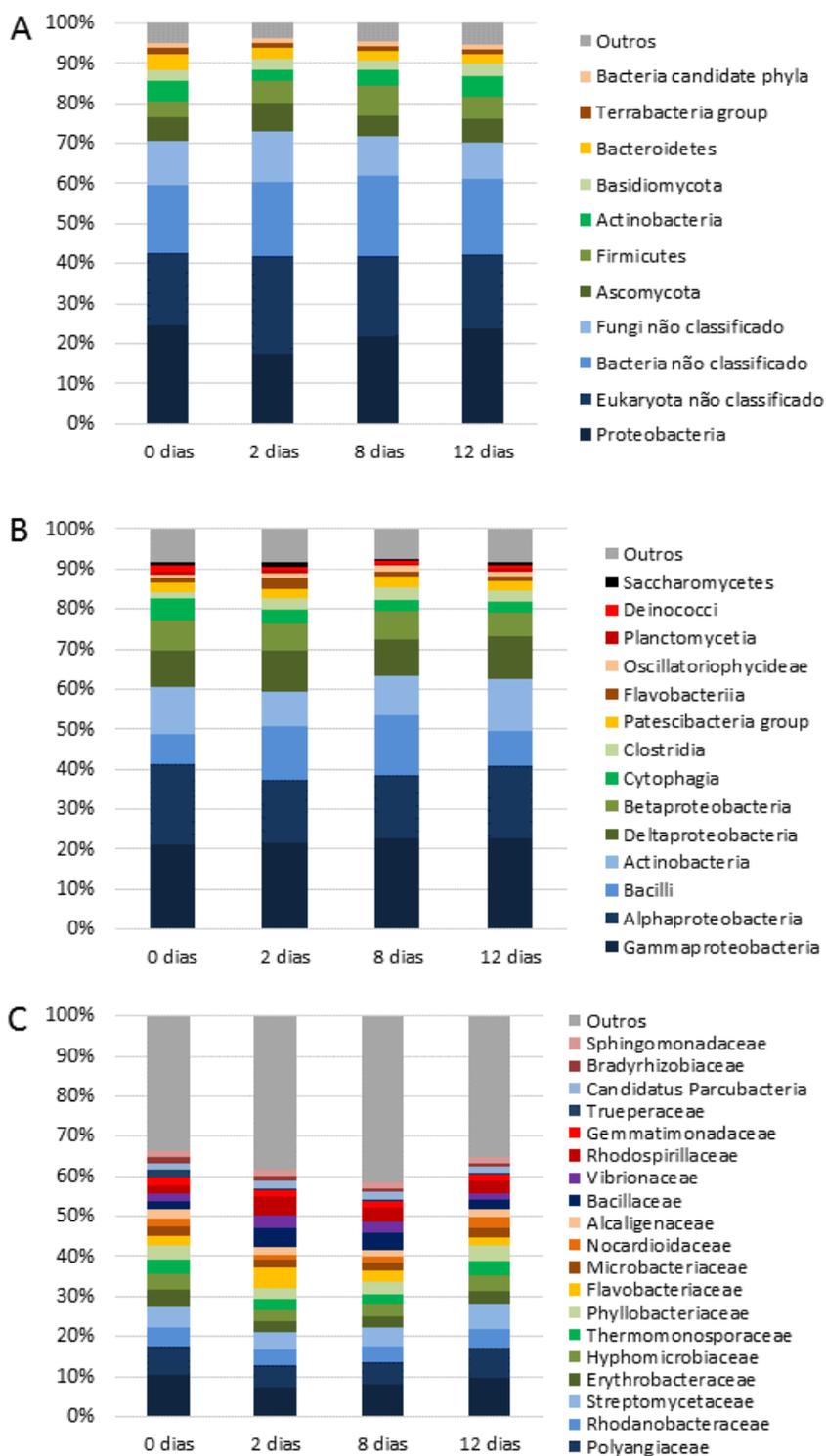
Yaish MW, Al-Lawati A, Jana GA, Patankar HV, Glick BR (2016) Impact of soil salinity on the structure of the bacterial endophytic community identified from the roots of caliph medic (*Medicago truncatula*). *PLoS ONE*, 11(7): e0159007.

Yandigeri MS, Kumar KM, Singh D *et al.* (2012) Drought-tolerant endophytic actinobacteria promote growth of wheat (*Triticum aestivum*) under water stress conditions. *Plant Growth Regulation*, 68: 411–420.

Yeoh Y, Paungfoo-Lonhienne C, Dennis P *et al.* (2016) The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying nitrogen fertilizer application. *Environmental Microbiology*, 18(5): 1338–1351.

Zhang N, Wang D, Liu Y *et al.* (2014) Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant and Soil*, 374: 689–700.

Anexo I



Composição taxonômica dos *reads* ao nível de filo (A), classe (B) e família (C) da comunidade bacteriana associada a rizosfera de cana-de-açúcar RB855536, submetida a diferentes tempos de estresse hídrico.

Anexo II



Abundância de *reads* das categorias funcionais baseadas do banco de dados do SEED (nível 1) encontrados na microbiota da rizosfera de cana-de-açúcar RB855536.

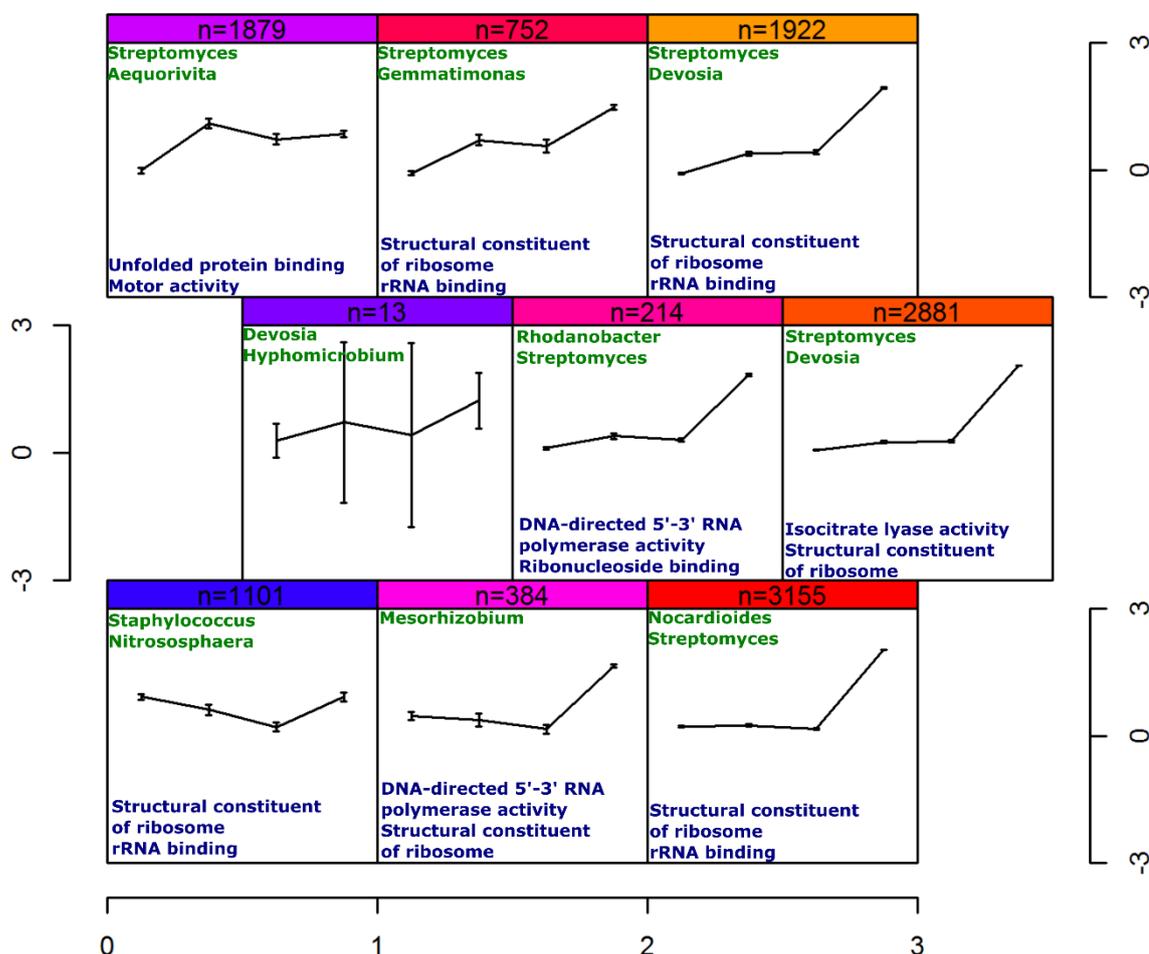
Anexo III

Número de genes diferencialmente expressos (DE) na microbiota da rizosfera da cana-de-açúcar RB855536 em diferentes condições de estresse hídrico.

Amostras comparadas	Genes DE	<i>Up regulated</i>*	<i>Down regulated</i>*
0 dias x 2 dias	2.004	1.643 (82%)	361 (18%)
0 dias x 8 dias	2.002	1.275 (63,7%)	727 (36,3%)
0 dias x 12 dias	8.102	7.488 (92,4%)	614 (7,6%)
2 dias x 8 dias	610	295 (48,4%)	315 (51,6%)
2 dias x 12 dias	4.210	3.514 (83,5%)	696 (16,5%)
8 dias x 12 dias	4.263	3.725 (87,4%)	528 (12,6%)
Total	21.191	17.940 (87,7%)	3.241 (15,3%)
Total (únicos)	12.301	10.866 (88,3%)	2.157 (11,7%)

*Em relação ao menor tempo de estresse hídrico comparado

Anexo IV



Self-organizing map (SOM) análise dos 12.301 transcritos diferencialmente expressos na microbiota associada a rizosfera de cana-de-açúcar RB855536. Em cada quadro, o eixo x indica amostras (0, 2, 8 e 12 dias de estresse hídrico) e o eixo y indica a média centralizada da expressão gênica de um determinado conjunto de transcritos (valor “n” na parte superior). Cores similares na parte superior indicam semelhança no padrão de expressão dos transcritos. Cada quadro contém o nome dos dois GO mais enriquecidos (menor valor de p) e os gêneros mais abundantes relacionados ao perfil de expressão apresentado.

CAPÍTULO 3

DIVERSIDADE E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL POR BACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB DIFERENTES NÍVEIS DE ESTRESSE HÍDRICO

DIVERSITY AND PLANT GROWTH PROMOTING ACTIVITY OF
BACTERIA ISOLATED FROM SUGARCANE RHIZOSPHERE UNDER
DIFFERENT LEVELS OF DROUGHT STRESS

Abstract

Changes in rainfall patterns can negatively affect many important cultivars, including sugarcane, decreasing their growth and productivity. In the rhizosphere, the soil bacteria and the plants are closely related, with the plant-associated microbiota playing an important role in promoting plant growth under both normal and stress conditions. In this study, the cultivable diversity of bacteria in the sugarcane rhizosphere under different levels of drought stress was characterized and screened for plant growth activities. The results suggested that the microbial community associated with the sugarcane rhizosphere was strongly affected by drought, but some important genera of bacteria such as *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, and *Bacillus* remained present during the entire experiment, indicating the adaptability of these organisms and their importance in the rhizosphere community. Many isolates exhibited positive results for one or more plant growth activity, and they were also capable of growing under simulated drought stress (in the presence of PEG), suggesting that the microorganisms isolated from the sugarcane rhizosphere could be explored for uses such as biofertilizers or biocontrol agents in agriculture.

Keywords: Rhizosphere, indole acetic acid, ACC deaminase, 16S rRNA gene, drought.

Introduction

The rhizosphere is the part of the soil directly influenced by plant roots, due to the release of exudates such as sugars and organic acids. These exudates are sources of nutrients and vitamins used by various bacteria, stimulating the development of microbial communities. The rhizosphere microbiota consists of a heterogeneous group of microorganisms that may be present in free forms in the soil, or reside on the root surfaces [14]

Many bacteria present in the rhizosphere are known as plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs), since they can directly or indirectly improve the growth and health of the plants present. The importance of these rhizosphere-associated microbiota is due to their production of phytohormones [6], biosurfactants [52], antimicrobials [72], and siderophores [53, 64]. In addition, they can increase the availability of nutrients such as phosphorus and nitrogen [57, 73].

Some bacteria present in the rhizosphere can confer resistance or improve the performance of plants under stress conditions. Under drought stress, for example, PGPRs are able to alter the hormonal content of plants, improving their tolerance and increasing their water absorption capacity [4]. Mayak et al. [45] evaluated the performance, under water stress, of tomato and pepper plants inoculated with the bacterium *Achromobacter piechaudii* ARV8, which produces the enzyme ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase. This enzyme is responsible for preventing the production of ethylene, hence relieving the symptoms caused by stressful situations such as drought. Plants inoculated with the bacterium and exposed to water stress continued to accumulate biomass, despite the decreased water availability.

Synthetic chemicals such as fertilizers and pesticides are currently used to improve the nutrition and health of crops, respectively, with the aim of increasing food production. However, the use of these synthetic chemicals results in environmental pollution, human diseases, and microbial resistance [55, 70]. The use of PGPRs as bioinoculants for crops could replace, at least in part, the use of fertilizers and pesticides. Hence, the PGPRs represent an environmentally friendly way to increase food production in normal or stressed environments [72, 84].

In order to understand the composition of the rhizosphere microbial community and the ways that its members relate to plants, many studies have focused

on exploring the diversity of bacteria in this environment. Due to the limitations of bacterial growth in culture media, most of these studies used next-generation sequencing approaches to acquire huge amounts of taxonomic and functional information. However, the isolation and characterization of PGPRs is still important, since they can be used as biofertilizers and pathogen biocontrol agents, among other applications [33, 48, 51].

Sugarcane is an important tropical crop used in the production of sugar, biofuels, and energy [11, 26]. However, there are concerns about increasing drought frequency in plantation areas. Water shortage causes reductions of soil moisture, water absorption by plant roots, and nutrient transport, resulting in decreased productivity [3, 17]. Therefore, the isolation and characterization of microorganisms present in the sugarcane rhizosphere is essential for the development of effective commercial inoculants for this and other important agricultural crops. Considering these issues, the aim of the present study was to characterize the cultivable bacterial community in the sugarcane rhizosphere and to screen isolates for plant growth activities.

Materials and Methods

Sampling of the sugarcane rhizosphere

The experiment was carried out under greenhouse conditions at the State University of Campinas, Campinas, Brazil (22°20'S, 47°06'W). Plants of sugarcane variety CTC9001, four months old, were obtained from the Sugarcane Technology Center, Piracicaba, Brazil. This variety is known for its fast growth and development in the initial phases, high productivity, and drought tolerance [12, 15]. The plants were submitted to different periods of drought stress, remaining without irrigation for two (WS2 - Water Stress 2), eight (WS8), and twelve (WS12) days (using four plants for each condition). Four plants under normal irrigation (WS0) were used as the control condition. Rhizosphere samples were collected by removing the plants from the pots and shaking to eliminate soil agglomerates not associated with the roots. The soil still adhering to the roots was collected by vigorous shaking in sterile plastic bags.

Isolation of bacteria associated with the sugarcane rhizosphere

Ten grams of each rhizosphere soil sample were added to 90 mL of sterile saline solution (0.85% NaCl), followed by shaking for 20 min. A ten-fold serial dilution was performed (10^{-5}) and 0.1 mL aliquots were spread on nutrient agar (NA, Merck) and M9 minimal medium [68], in duplicate, in order to obtain bacteria with different nutritional requirements. The plates were incubated at 30 °C until the appearance of colony forming units (CFU) (48 h for nutrient agar and 72 h for M9 minimal medium). The CFUs that showed different morphologies and colors on the plates were re-isolated in order to obtain pure cultures. The purified isolates were stored as described by D'Onofrio et al. [16]. Briefly, the isolates were resuspended in NA or M9 minimal medium containing 15% glycerol, and were then stored at -80 °C.

Screening of root-associated bacteria with potential for plant growth promoting activities

Indole acetic acid (IAA) production assays

The IAA production assays were performed using the test developed by Bric et al. [9]. For this, bacteria were grown in Petri dishes containing NA or M9 minimal medium, supplemented with 5 mM L-tryptophan, and a nitrocellulose membrane was placed on the colonies. The Petri dishes were then incubated until the colonies reached diameters of approximately 2 mm. After incubation, the nitrocellulose membranes were removed and placed on filter paper saturated with Salkowski reagent (2% of 0.5 M FeCl_3 in 35% perchloric acid). The appearance of a reddish halo in the membrane surrounding the colony was an indication of IAA production.

ACC deaminase activity assays

Detection of the bacteria producing the ACC deaminase enzyme was performed as described by Penrose and Glick [59]. The isolated bacteria were cultivated in minimal mineral medium [5] containing ACC as the only source of nitrogen. As a control condition, the bacteria were also grown in minimal mineral medium containing ammonia as the nitrogen source. The plates were incubated at 30 °C for up to five days. Bacteria that were able to grow in both the medium containing ACC and in the control medium were considered positive for ACC deaminase activity.

Bacterial inorganic phosphate solubilization assays

For the phosphate solubilization assays, bacteria were grown in Petri dishes containing Pikovskaya agar medium [32], with calcium orthophosphate as the inorganic phosphorus source. The isolates were maintained at 30 °C for up to five days. The appearance of a colorless halo around the colony was an indication of solubilization and use of the inorganic phosphate in the medium.

Nitrogen fixation assays

Evaluation of the ability of the bacteria to fix atmospheric nitrogen was performed by growing the organisms in selective liquid Burk's medium [56] at 30 °C for five days. A bacterium isolated in Burk medium, directly from the soil samples, was used as a positive control, while the medium without addition of bacteria was used as a negative control. Growth (indicated by turbidity of the medium) revealed the ability of the bacteria to use atmospheric nitrogen as a nitrogen source.

Osmotolerance assays

A total of 90 isolates that were able to produce the ACC deaminase enzyme were cultivated in NA medium supplemented with increasing amounts of polyethylene glycol (PEG) (5, 10, 20, 30, and 40%). Growth in the presence of the different concentrations of PEG was determined by the turbidity of the medium.

16S rDNA sequencing-based identification of the isolated bacteria

Bacteria isolated from the sugarcane rhizosphere were identified by sequencing of the V3-V6 region of the 16S rRNA gene. The amplification reactions were performed directly from an isolated colony using primers 338F (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG) [36] and 1046R (CGACAGCCATGCANCACT) [44]. Each reaction (50 µL) consisted of 1 x reaction buffer (Fermentas), 1 U Taq (Fermentas), 2 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, and 0.4 mM of each primer. The reactions were performed with an initial denaturation at 94 °C for 5 min, 35 cycles consisting of 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, and 72 °C for 3 min, and a final extension at 72 °C for 20 min.

Bacteria for which direct amplification of the colony was not possible were cultivated in 2 mL of NA medium at 30 °C for 48 h. Next, total DNA was isolated using

the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), and amplification reactions of the 16S rRNA gene (V3-V6 region) were performed as described above.

The PCR products obtained from the colony or total DNA were purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), and were then sequenced at the Genotyping and Sequencing Multiuser Laboratory (State University of Campinas, Brazil), using the 3500xL platform (Applied Biosystems).

The quality of the sequences was evaluated using DNA Baser software (Heracle BioSoft). Bacteria identification was performed at the Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>), using the RDP classifier tool [86], with a minimum identity of 80%. The 16S rRNA gene sequences of all the identified isolates can be accessed at GenBank/EMBL/DDBJ, under the accession numbers MH046419 - MH046773.

Phylogenetic analysis

In order to reduce the number of sequences used in the phylogenetic tree, clustering was performed of all isolates that presented the same taxonomic classification (based on a minimum identity of 80% in the RDP database) and the same pattern of presence/absence of plant growth promotion activity (IAA production, ACC deaminase activity, phosphate solubilization, and nitrogen fixation). Afterwards, one isolate was randomly selected to represent the growth promotion activity of each group in the phylogenetic tree. The partial 16S rRNA gene sequences from the selected isolates were used to construct a maximum likelihood phylogenetic tree, using the Kimura 2-parameter distance model and 1000 bootstrap samplings. The cyanobacterium *Gleobacter violaceus* was used as an outgroup. All the procedures were performed using the MEGA 6.0 tool [75].

Plant growth assays

Eighteen bacterial isolates were randomly selected from those exhibiting plant growth promoting activities. The isolates were used in a 15-day greenhouse trial employing tomato plants (Santa Cruz Kada, commercial variety). Firstly, seed asepsis was performed by immersion in 70% alcohol for 1 min, immersion in 3% sodium hypochlorite for 3 min, and finally washing with sterile distilled water until removal of the hypochlorite. Three seeds per vase were placed in 350 mL capacity pots containing Multiplant® commercial substrate. The substrate was previously autoclaved twice for 1

h at 120 °C. After germination, thinning was performed, leaving only one seedling per pot.

The selected isolates were grown in Luria-Bertani culture medium [68] for 72 h at 30 °C and 120 rpm. The culture medium was then centrifuged for 8 min at 4 °C, 8000 rpm, followed by discarding of the supernatant and resuspension of the pellet in sterile 0.85% saline solution. The centrifugation process was repeated for two further cycles [66]. Finally, the bacteria concentration in the solution was adjusted to an optical density of $A_{540} = 0.5$, corresponding to approximately 10^8 colony forming units (CFU), using a spectrophotometer at a wavelength of 540 nm.

Soil inoculations were performed by adding 2 mL of the bacteria suspensions to the pots, three days after planting the seeds, when the seedlings had already emerged. After three days, dissolved tryptophan was applied (0.1 g of tryptophan per kg of substrate) in order to stimulate IAA production by the isolates that were capable of producing this phytohormone [49]. The lengths of the main root and shoot, together with the total biomass (fresh and dry weight), were determined 15 days after planting. The shoot/root ratio was also determined.

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) and Fisher's test ($p < 0.05$) were applied to evaluate the differences between the mean CFU concentrations obtained for the rhizosphere samples, for the cultures in NA and M9 minimal medium. The same statistical analyses were applied to the measurements of plant growth in the greenhouse trial. All the statistical procedures were performed using PAST v. 3.15 software [34].

Results and Discussion

Cultivable bacterial diversity in the sugarcane rhizosphere samples

The bacteria isolated from the sugarcane rhizosphere samples submitted to different periods of drought stress presented CFU concentrations ranging from 2.03×10^6 to 3.93×10^5 CFUs per gram of soil on the NA medium, and from 5.6×10^4 to 3.03×10^5 CFUs per gram of soil on the M9 minimal medium. Application of Fisher's test ($F = 4.4$, $p = 0.025$) revealed significant differences among the numbers of CFUs found in the rhizosphere samples, for cultures using both NA and M9 minimal medium.

The samples submitted to 12 and 8 days of drought stress presented significantly fewer colonies than the sample without stress. The average CFU concentrations for the samples submitted to 2 days of water stress were similar to those for the samples without stress (Fig. 1).

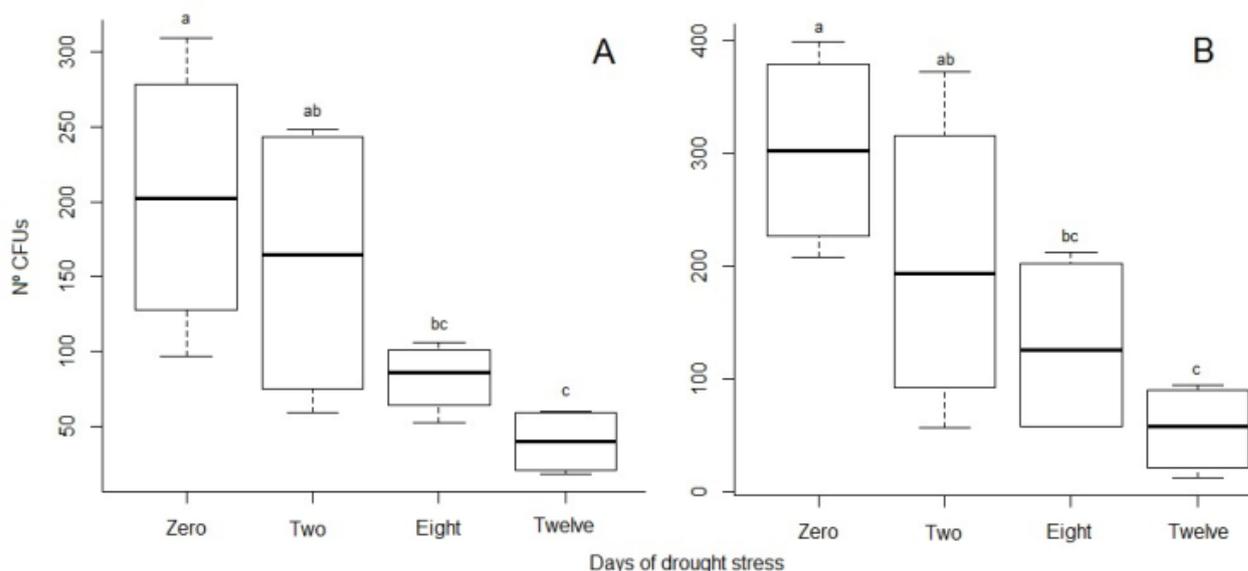


Fig. 1. Box plots of the numbers of CFUs isolated from the rhizosphere samples submitted to different periods of drought stress, cultured using nutrient agar (A) and M9 minimal medium (B). Different letters represent a significant difference (5% significance level, Fisher's test). The values are presented using a logarithmic scale.

It is well known that the soil microbial community is directly affected by drought conditions [30, 74]. In studies with cultivable bacteria, Griffiths et al. [29] evaluated the diversity and activity of bacteria in grassland soil in Scotland, using three different culture media. In all cases, the total number of CFUs decreased when the soil was submitted to different periods of water stress (from around 3 to 60 days). Bogino et al. [8] also observed a decrease in the number of CFUs per g of soil in alfalfa rhizosphere samples, under water stress conditions. The authors suggested that the decreased number of CFUs was due not only to the low availability of water, but also to changes in the root exudates of the plants under stress. These results corroborate the present data, indicating that changes in the diversity of cultivable bacteria could represent a rapid response to environmental stresses and might reflect the general behavior of the community. In addition, the data obtained with cultivable bacteria could

complement non-cultivable approaches, helping to understand the dynamics of the microbial community under water stress [7, 8, 10].

Colonies exhibiting morphological differences (a total of 364) were purified by subculturing and were identified by sequencing of the V3-V6 region of the 16S rRNA gene. The results showed that the prevalent genera were *Arthrobacter*, with 188 isolates (51.7%), followed by *Pseudomonas* (55 isolates, 15.1%), *Bacillus* (26 isolates, 7.14%), and *Microbacterium* (20 isolates, 5.5%). Only four isolates (0.82%) could not be identified (Table S1).

The numbers of bacteria genera shared among the different rhizosphere samples are shown as a Venn diagram in Fig. 2. The genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, and *Falsibacillus* were recovered from all the samples, independent of the duration of drought stress (including the control condition). These genera were capable of survival during the drought stress and could be considered the core cultivable microbiota of the sugarcane rhizosphere. Pisa et al. [61], using 16S rDNA clone libraries, reported that *Bacillus* was the predominant genus in the rhizosphere of sugarcane variety RB72454. Paungfoo-Lonhienne et al. [57] also found *Bacillus* and *Streptomyces* in 16S rDNA pyrosequencing of sugarcane variety Q208. *Pseudomonas* is commonly reported in the sugarcane rhizosphere, acting as a plant growth promoting bacterium [46] or as a pathogenic strain [47]. The genus *Arthrobacter* has also been reported in the sugarcane rhizosphere, probably due to its capacity to fix nitrogen and survive in saline soils [18, 40]. The genus *Microbacterium* was reported as a member of the endophytic community of sugarcane, contributing to nitrogen fixation in the plant [41, 83]. Finally, the genus *Falsibacillus* has not been reported to date in studies of microbial diversity associated with sugarcane.

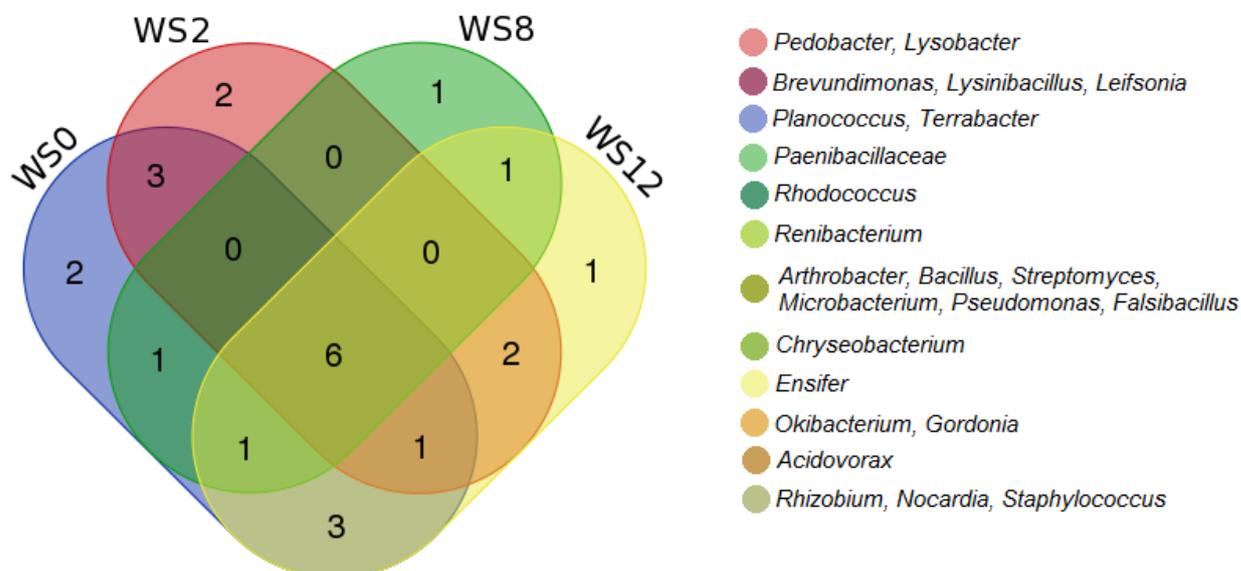


Fig. 2. Venn diagram showing the numbers of different genera found in the sugarcane rhizosphere samples submitted to different periods of drought stress. WS0: 0 days (control); WS2: 2 days; WS8: 8 days; WS12: 12 days.

The genera described above have also been identified as members of the microbiota in other rhizospheres, such as those of grapevines [65], wheat [79], rice [71], and pear [88]. The occurrence of these genera in the sugarcane rhizosphere samples, under normal and drought conditions, as well as in other crops, may indicate an important interaction of these bacteria with plants, contributing to the survival and health of the latter.

The genera *Pedobacter*, *Lysobacter*, *Brevundimonas*, *Lysinibacillus*, *Leifsonia*, *Planococcus*, and *Terrabacter* were found in low abundance (0.57 to 2.3% of the total isolates) and only in the control samples (WS0) and the samples submitted to 2 days of drought stress (WS2). Previous studies have also found the presence of these genera in small proportions in the sugarcane rhizosphere environment, using cultivable and non-cultivable techniques [38, 39, 57, 63]. Some of these bacteria have been found to be capable of surviving and promoting plant growth in extreme environments, such as saline soils [18, 62]. However, in the present case, these genera were not found in the samples submitted to water stress, possibly indicating that they were affected by the drought conditions.

The genera *Ensifer* and *Renibacterium* were only recovered from samples WS8 and WS12, submitted to 8 and 12 days of drought stress, respectively. These genera are rarely found in the rhizosphere environment and have not previously been isolated from the sugarcane rhizosphere. *Ensifer* has been reported in low abundance in potato [78] and citrus [2] rhizospheres. *Renibacterium* has only been reported in the wild grass rhizosphere [63], but has also been found in marine environments, associated with corals [42] or involved in fish diseases [28]. It is likely that the drought stress in the sugarcane rhizosphere samples resulted in environmental changes that contributed to the growth of rarer and less well known genera, such as those mentioned above. The presence of *Ensifer* sp. and *Renibacterium* sp. in the sugarcane rhizosphere provides a new target group of bacteria that could be studied for promoting plant growth under drought stress.

Plant growth promoting activity of the sugarcane rhizosphere isolates

Analysis of the plant growth promoting activities of the bacteria isolated from the sugarcane rhizosphere revealed that 307 (84.3%) isolates presented positive results in at least one of the tests (IAA, ACC deaminase, phosphate solubilization, and nitrogen fixation) (Table 1).

Table 1. Numbers of isolates presenting IAA production, ACC deaminase production, phosphate solubilization, and nitrogen fixation, for the sugarcane rhizosphere samples submitted to different water stress conditions.

Sample	Total CFUs	IAA production	ACCd production	Phosphate solubilization	Nitrogen fixation
WS0	130	32 (24.6 %)	35 (26.9 %)	35 (26.9 %)	62 (47.7 %)
WS2	88	31 (35.2 %)	20 (22.7 %)	21 (23.9 %)	50 (56.8 %)
WS8	80	21 (26.3 %)	19 (23.8 %)	10 (12.5 %)	45 (56.3 %)
WS12	66	15 (22.7 %)	16 (24.2 %)	4 (6.1 %)	37 (56.1 %)
Total	364	99 (27.2 %)	90 (24.7 %)	70 (19.2 %)	194 (53.3 %)

ACCd: ACC deaminase

A 16S rDNA phylogenetic tree was constructed to cluster the bacteria that presented the same pattern of presence/absence of the plant growth promotion activities analyzed, according to their taxonomic classification (Fig. 3).

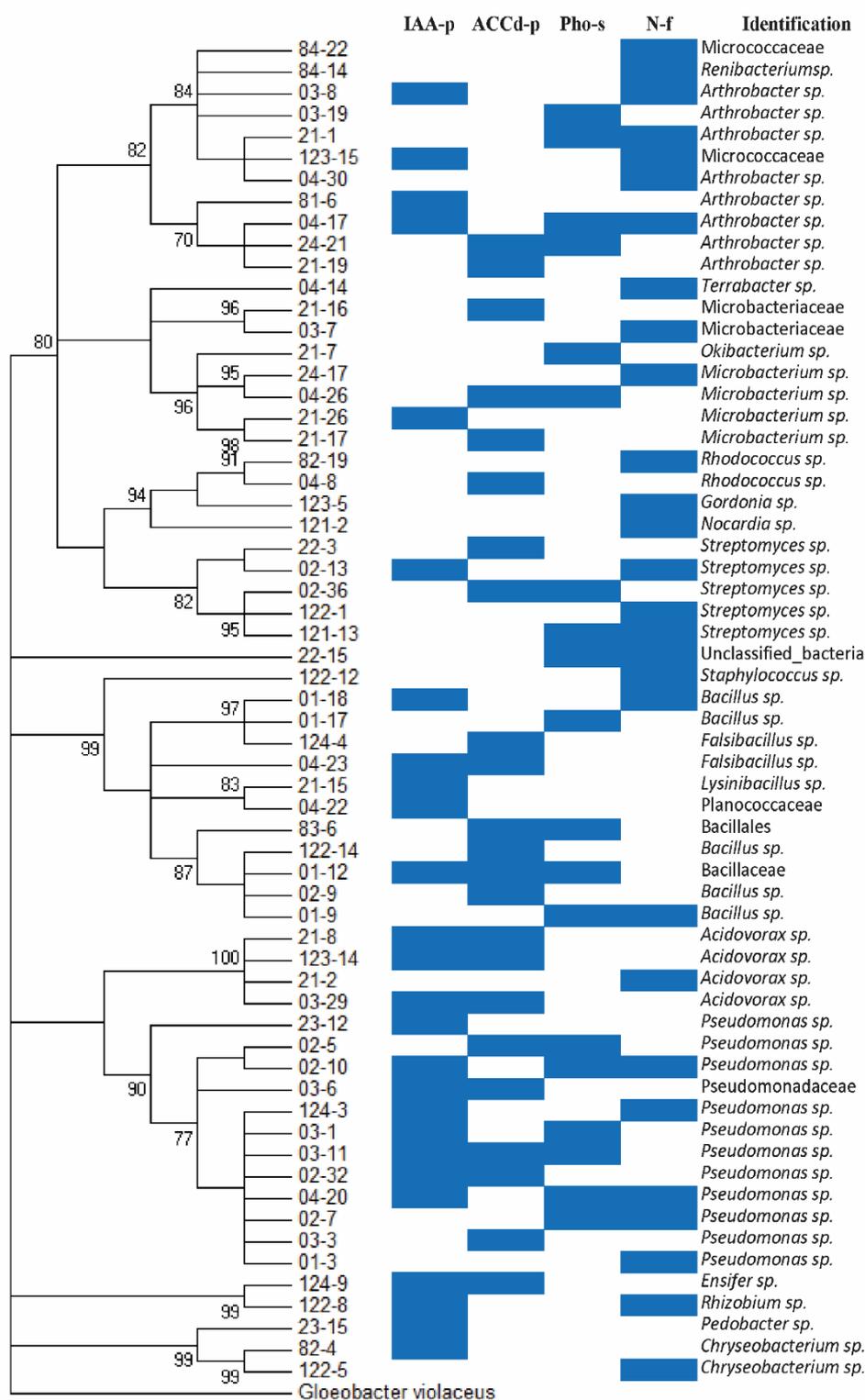


Fig. 3. Maximum likelihood phylogenetic tree using partial 16S rRNA gene sequences from isolates showing positive results for plant growth promoting activity. The numbers at the nodes indicate the bootstrap support levels for 1000 replications. The heat map shows the results of the tests performed, with blue indicating a positive test result and

white indicating a negative result. IAA-p: IAA production; ACCd-p: ACC deaminase production; Pho-s: phosphate solubilization; N-f: nitrogen fixation.

Among the isolates, 99 (27.2%) were able to produce IAA, 90 (24.7%) produced ACC deaminase, 70 (19.23%) solubilized inorganic phosphate, and 193 (53%) were able to grow in a nitrogen-free medium. The high proportion of nitrogen-fixing bacteria found here suggests an important role of the bacteria in providing the plants with this nutrient. It is known that sugarcane is able to associate with diazotrophic bacteria in order to improve the efficiency of nitrogen uptake by biological fixation [80]. Furthermore, studies have shown that the use of a consortium of different diazotrophic bacteria leads to better results, in terms of biological nitrogen fixation, compared to the use of single isolates [13, 19, 53]. The isolation of a great diversity of bacteria able to grow in a nitrogen-free medium (Table 1, Fig. 3) could contribute to the formulation of new consortia for nitrogen fixation in cultivations of sugarcane and other plants.

The phylum Proteobacteria showed the highest proportion of isolates capable of producing indole acetic acid (Fig. 3). Within this phylum, the genera *Acidovorax* and *Pseudomonas* were the main producers, representing 75% of the isolates with positive results. IAA is an auxin that promotes root elongation and stimulates the growth of lateral and adventitious roots [6]. The presence of bacteria producing this phytohormone could stimulate plant growth, even under stress conditions such as drought, since the increased root growth should improve the uptake of water from the soil.

Marulanda et al. [43] evaluated three IAA-producing strains, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas* sp., and *Bacillus megaterium*, isolated from dry soils, in terms of their effectiveness in stimulating the growth of *Trifolium repens* plants in soils under drought stress. Inoculation using each bacterium separately increased the biomass and water content of the plants, especially when associated with mycorrhizae.

The genus *Acidovorax* is commonly associated with plant diseases, and the bacterium *Acidovorax avenae* is responsible for red stripe disease in sugarcane [90]. Members of this genus have been detected in abundance in rhizosphere samples from healthy cucumber [76] and lettuce [69] crops. These findings suggest that members of this genus participate in the microbial community of the plant rhizosphere.

The genus *Acidovorax* showed a high proportion of isolates capable of producing the ACC deaminase enzyme (75%), followed by the genus *Rhodococcus* (67%) (Fig. 3, Table S1). This enzyme reduces high levels of ethylene in plants, promoting plant growth under stress conditions [71]. Studies of the genome of *Rhodococcus fascians* revealed the presence of the gene encoding the ACC deaminase enzyme, suggesting the potential of this bacterium to promote plant growth [20, 50].

In the analysis of phosphate solubilization, the most prominent genera were *Okibacterium* (67%) and *Pseudomonas* (60%) (Fig. 3, Table S1). Members of the genus *Okibacterium* have been isolated from *Salsola affinis* roots [85] and from the rhizosphere of *Thlaspi goesingense* [37]. Ortiz et al. [54] evaluated the ability of *Pseudomonas* bacteria (isolates or in consortia) to improve the growth of *Trifolium repens* under dry conditions. Among the isolates tested, *Pseudomonas putida* was evaluated due to its high efficiency in the solubilization of phosphorus and its ability to produce phytohormones. The inoculation of soil with *Pseudomonas*, together with other bacteria, led to elongation of the plant roots and greater efficiency in capturing nutrients and water from the soil, enabling the plants to develop, even in arid conditions.

Due to the low availability of phosphorus in soils, agricultural crops are constantly supplemented with phosphate fertilizers. However, this practice has high financial and environmental costs, since the fertilizers are obtained from non-renewable sources of phosphorus [27]. Hence, the use of inoculants containing phosphate solubilizing bacteria, such as those isolated in this work, could help to increase the availability of the inorganic phosphorus that occurs naturally in the soil.

Nitrogen is an important macronutrient that is usually added to soil in the form of fertilizers. The use of inoculants containing bacteria capable of fixing atmospheric nitrogen could increase the availability of this nutrient, consequently helping to reduce the use of chemical fertilizers that can cause serious environmental problems, including the contamination of soil, surface water, and subterranean aquatic systems [82].

In this work, the ability to fix atmospheric nitrogen was found not only for *Rhizobium* sp. (67%), a genus commonly associated with nitrogen fixation in sugarcane roots [46, 57, 61], but also for the phylum Actinobacteria (Fig. 3), with *Arthrobacter* sp. being the most abundant of this phylum exhibiting nitrogen-fixing

activity (77%). The genus *Arthrobacter* includes bacteria capable of using various nitrogen sources including atmospheric nitrogen [31], atrazine [23, 67], and glyphosate [60], but has rarely been reported as the main nitrogen-fixing genus in the plant rhizosphere environment.

The isolates that presented positive ACC deaminase results were also tested for growth under drought stress conditions, using different concentrations of PEG in the growing medium. Among the bacteria that produced ACC deaminase, 30 (33.3%) and 54 (60%) isolates were able to grow in the presence of PEG at concentrations of 30 and 40%, respectively. The combination of these two characteristics could be important in the development of superior bioinoculants, since ACC deaminase reduces the levels of ethylene in plants and assists growth under stress conditions, while high concentrations of PEG would ensure the selection of bacteria able to survive in soils with low water availability [59, 88].

Plant growth promotion activity of the bacterial isolates

Eighteen bacterial isolates were selected for evaluation of their potential to improve plant growth under greenhouse conditions (Table 2).

Among the 18 selected isolates, 8 presented positive results for IAA production and ACC deaminase activity, 6 were able to solubilize inorganic phosphate and produced ACC deaminase, and 5 presented positive results for the three characteristics. Additionally, all the isolates were able to grow in the presence of 30 or 40% PEG, indicating their resistance to saline/dry conditions.

Table 2. Identification and characteristics of the bacteria selected for use in the tomato plant growth assays.

Isolate	IAA production	ACCd* activity	Phosphate solubilization	PEG (%)	Identification (bootstrap)
WS01-02		X		40	Unclassified
WS02-30	X	X		40	<i>Pseudomonas</i> (100%)
WS02-32	X	X		40	<i>Pseudomonas</i> (100%)
WS03-14	X	X	X	40	<i>Pseudomonas</i> (100%)
WS03-17	X	X	X	40	<i>Bacillus</i> (99%)
WS03-29	X	X		40	<i>Acidovorax</i> (100%)
WS04-19	X	X	X	40	<i>Pseudomonas</i> (100%)
WS04-23	X	X		40	<i>Falsibacillus</i> (91%)
WS23-08	X	X		40	<i>Pseudomonas</i> (100%)
WS24-02	X	X	X	40	<i>Pseudomonas</i> (100%)
WS24-03	X	X	X	40	<i>Pseudomonas</i> (100%)
WS83-05	X	X		40	<i>Falsibacillus</i> (98%)
WS121-06		X		40	<i>Arthrobacter</i> (98%)
WS121-16		X		40	<i>Streptomyces</i> (98%)
WS121-17		X		40	<i>Arthrobacter</i> (100%)
WS123-12	X	X		40	<i>Arthrobacter</i> (99%)
WS122-13		X	X	30	<i>Streptomyces</i> (100%)
WS124-07	X	X		40	<i>Pseudomonas</i> (100%)

*ACCd: ACC deaminase.

In the greenhouse experiments, the selected isolates were separately used to inoculate the soil in the pots containing tomato seedlings. Comparison of the growth parameters of the inoculated and control plants (Table S2) revealed that isolate WS02-30, identified as *Pseudomonas* sp., promoted increased root length, relative to the control, resulting in a significantly lower shoot/root ratio (Fig. 4).

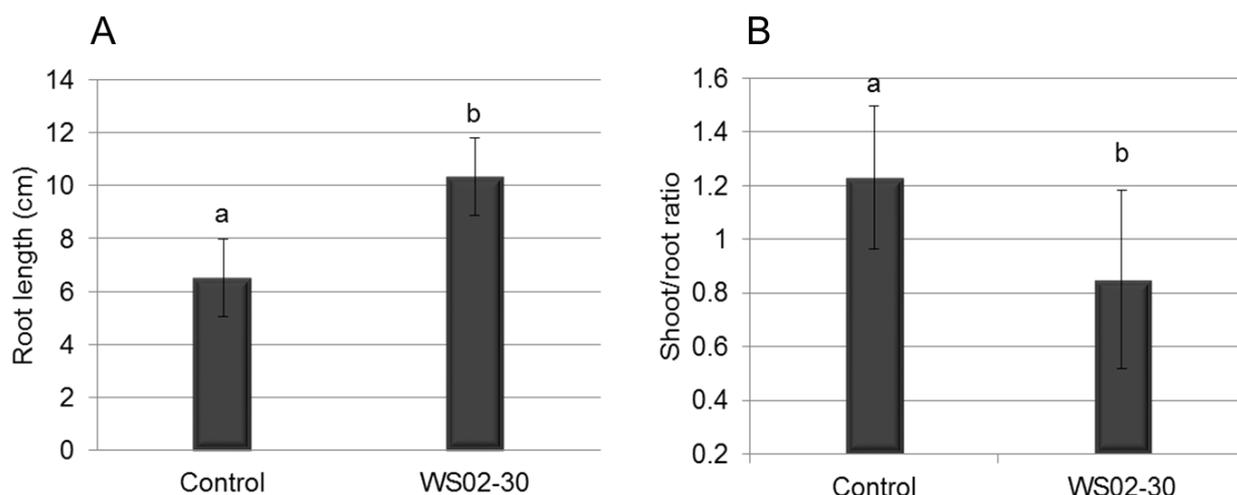


Fig. 4. Root lengths (A) and shoot/root ratios (B) of tomato plants grown without (control) and with soil treatment using bacterial isolate WS02-30 (*Pseudomonas* sp.). Different letters indicate a significant difference (5% significance level, Fisher's test).

Pseudomonas has been widely reported as a PGPR genus in cultivations of plants including peas [88], white clover [54], grapevine [65], and poplar [77]. Ahemad and Khan [1] used the *Pseudomonas aeruginosa* PS1 strain as an inoculant for greengram plants grown in soil contaminated with insecticides. Plants grown using the bacterial inoculation presented increases in the shoot and root parameters (including root length and root dry weight), even for polluted soils. Zerrouk et al. [89] evaluated the effect of *Pseudomonas fluorescens* 002 on maize roots under salt and aluminum stress. The results showed that inoculation with the bacterium led to increased growth of primary, lateral, and seminal roots, as well as higher root dry mass. *Pseudomonas* bacteria are also abundant members of the sugarcane microbiome [47]. In the present case, the *Pseudomonas* genus was responsible for 15% of the isolates, with most of them (93%) presenting positive results for one or more of the plant growth activities tested, especially IAA.

Tryptophan is the main substance acting to stimulate the synthesis and secretion of IAA by bacteria. This phytohormone could then be taken up by the plant and, together with the endogenous plant IAA, could stimulate loosening of the plant cell walls, enabling the growth of shoot and root cells, as well as enhanced development of the lateral roots. As a consequence of root elongation, the uptake of nutrients and water by the plant would then be increased [25, 58]. The *Pseudomonas* sp. WS02-30 isolate used to inoculate the tomato plant substrate was an IAA producer

that could have been responsible for the observed root elongation, since tryptophan was added to the soil. The decrease of the shoot/root ratio was also in agreement with the increased root length.

Ethylene is an important metabolite in the normal development of plants. However, when the ethylene level is elevated (known as ethylene stress), plant growth and development are reduced, which can lead to defoliation, inhibition of root elongation, and leaf senescence [24, 71]. One way to reduce ethylene levels in plants is to encourage the action of bacteria able to produce the ACC deaminase enzyme. The substrate used by this enzyme is ACC, the direct precursor of ethylene, which is converted to α -ketobutyrate and ammonia [25, 87]. The WS02-30 isolate also presented a positive result for ACC deaminase activity, which, as mentioned above, is a useful characteristic when plants are under stress conditions.

Ethylene and auxins such as IAA are involved in complex mutual interactions that regulate root elongation [35, 81]. Therefore, inoculation with a bacterium able to synthesize both ACC deaminase and IAA could promote plant growth under drought and other stress conditions [21, 22]. The results obtained for the *Pseudomonas* sp. WS02-30 isolate indicated the potential of this bacterium for assisting plants under drought stress, since it was able to produce both IAA and the ACC deaminase enzyme. Furthermore, the isolate was able to grow in a medium containing 40% PEG, reflecting its ability to survive in environments with low water availability.

In conclusion, the cultivable microbial community of the sugarcane rhizosphere was strongly influenced by drought, since the total number of colonies recovered per sample decreased as the period under drought stress increased. However, some groups of bacteria (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, and *Falsibacillus*) were not influenced by drought stress, suggesting the ability of these genera to survive in dry environments. In addition, many isolates tested positive for one or more plant growth activities, especially IAA production, which could help the plants to survive under drought conditions. The pot experiments showed that *Pseudomonas* sp. WS02-30 increased the root length of the tomato plants, probably due to its ability to produce IAA and ACC deaminase. The findings of this work, involving the isolation and testing of a large number of bacteria, indicate new possible ways to accelerate the growth of agronomically important plants during conditions of drought stress.

References

1. Ahemad M, Khan MS (2012) Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] using fungicide-tolerant and plant growth promoting *Pseudomonas* strain. Saudi J Biol Sci 19: 451-459.
2. Akhtar N, Ali A, Bashir U, Haider MS (2011) Morphological and biochemical studies on bacterial microfauna from lahore soils. Pakistan J Phytopathol 25: 137–140.
3. Alcázar R, Bitrián M, Bartels D, Koncz C, Altabella T, Tiburcio AF (2011) Polyamine metabolic canalization in response to drought stress in Arabidopsis and the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. Plant Signal Behav 6: 243–250. <https://doi.org/10.4161/psb.6.2.14317>
4. Aroca R, Ruiz-Lozano J (2009) Sustainable agriculture reviews. In: Lichtfouse E. (ed) Climate change, intercropping, pest control and beneficial microorganisms, sustainable agriculture reviews. Springer, New York, pp. 121–135. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5961-9>.
5. Avanzi IR, Gracioso LH, Perpetuo EA (2009) Isolation and identification of phenol degrading bacteria from the industrial area of Cubatão-SP, through the 16S amplification technique. Revista Ceciliansa 1: 66-70.
6. Bal HB, Da, S, Dangar TK, Adhya TK (2013) ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. J Basic Microbiol 53: 972–984. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200445>
7. Bérdy J (2012) Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. J Antibiot 65: 441–441. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.54>
8. Bogino P, Abod A, Nieves F, Giordano W (2013) Water-limiting conditions alter the structure and biofilm-forming ability of bacterial multispecies communities in the alfalfa rhizosphere. PLoS One 8: 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079614>
9. Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE (1991) Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Appl Environ Microbiol 57: 535–538.
10. Bull AT (2004) Microbial diversity and bioprospecting. ASM Press, Washington. <https://doi.org/10.1128/9781555817770>
11. Carvalho-Netto OV, Bressiani JA, Soriano HL et al (2014) The potential of the energy cane as the main biomass crop for the cellulosic industry. Chem Biol Technol Agric 1: 20. <https://doi.org/10.1186/s40538-014-0020-2>.
12. Cane Technology Center – CTC (2012) Varieties CTC: varieties highlights.

CTC, Piracicaba.

13. Chaves VA, dos Santos SG, Schultz N, Pereira W, Sousa JS, Monteiro RC, Reis VM (2015) Initial development of two sugarcane varieties inoculated with diazotrophic bacteria. *Rev Bras Cienc do Solo* 39: 1595–1602. <https://doi.org/10.1590/01000683rbc20151144>
14. Compant S, Van Der Heijden MGA, Sessitsch A (2010) Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiol Ecol* 73: 197–214. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00900.x>.
15. De Souza FJM, Pascoaloto IM, Figueiredo PAM, Lima CR, Lisboa LAM (2016) Biometric parameters of the growth and development of sugarcane (*Saccharum spp.*) in its early stages. *Revista Mirante* 9: 1. ISSN 19814089.
16. D'Onofrio A, Crawford JM, Stewart EJ et al (2010) Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chem Biol* 3: 254–264. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.02.010>
17. Davies WJ (2006) Responses of plant growth and functioning to changes in water supply in a changing climate. In: Morison JIL, Morecroft MD (eds) *Plant growth and climate change*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 96–117.
18. Dhanraj BN (2013) Bacterial diversity in sugarcane (*Saccharum officinarum*) rhizosphere of saline soil. *Int Res J Biol Sci* 2: 60–64.
19. Dos Santos SG, da Silva Ribeiro F, da Fonseca CS, Pereira W, Santos LA, Reis VM (2017) Development and nitrate reductase activity of sugarcane inoculated with five diazotrophic strains. *Arch Microbiol* 0: 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1357-2>
20. Francis IM, Stes E, Zhang Y, Rangel D, Audenaert K, Vereecke D (2016) Mining the genome of *Rhodococcus fascians*, a plant growth-promoting bacterium gone astray. *N Biotechnol* 33: 706–717. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.01.009>
21. Gamalero E, Glick BR (2010) Bacterial ACC deaminase and IAA: interactions and consequences for plant growth in polluted environments. In Golubev IA (ed) *Handbook of phytoremediation*. Nova Science Publishers, New York, pp 763–774
22. Gamalero E, Glick BR (2015) Bacterial modulation of plant ethylene levels. *Plant Physiol* 169: 13-22.
23. Getenga Z, Dörfler U, Iwobi A, Schmid M, Schroll R (2009) Atrazine and terbuthylazine mineralization by an *Arthrobacter sp.* isolated from a sugarcane-cultivated soil in Kenya. *Chemosphere* 77: 534–539.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.031>

24. Glick BR (2010) Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol Adv* 28: 367-374.
25. Glick BR (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res* 169: 30–39. doi:10.1016/j.micres.2013.09.009
26. Goldemberg J (2007) Ethanol for a sustainable energy future. *Science* 315: 808–810. <https://doi.org/10.1126/science.1137013>
27. Graham PH, Vance CP (2014) Update on legume utilization legumes : importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131: 872–877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004.872>
28. Grayson TH, Cooper LF, Atienzar FA, Knowles MR, Gilpin ML (1999) Molecular differentiation of *Renibacterium salmoninarum* Isolates from worldwide locations. *Appl Environ Microbiol* 65: 961–968.
29. Griffiths RI, Whiteley AS, Anthony G, Donnell O, Bailey MJ, Donnell AGO (2003) Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress. *Appl Environ Microbiol* 69: 6961–6968. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.6961>
30. Griffiths BS, Laurent P (2013) Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol Rev* 37: 112-129.
31. Gtari M, Ghodhbane-Gtari F, Nouioui I, Beauchemin N, Tisa LS (2012) Phylogenetic perspectives of nitrogen-fixing actinobacteria. *Arch Microbiol* 194: 3–11. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0733-6>
32. Gupta R, Singal R, Shankar A et al (1994) A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* 40: 255–260. <https://doi.org/10.2323/jgam.40.255>
33. Guttman DS, McHardy AC, Schulze-Lefert P (2014) Microbial genome-enabled insights into plant–microorganism interactions. *Nat Rev Genet* 15; 797–813. <https://doi.org/10.1038/nrg3748>
34. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.025>
35. Hu Y, Vandenbussche F, Van Der Straeten D (2017) Regulation of seedling growth by ethylene and the ethylene–auxin crosstalk. *Planta*: 245, 467-489.

36. Huse SM, Welch, DBM (2011) Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biol* 8: 149–155. <https://doi.org/10.1002/9781118010518.ch19>
37. Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel WW, Sessitsch A (2004) Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Appl Environ Microbiol* 70: 2667–2677. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2667>
38. Kruasuwan W, Thamchaipenet A (2016) Diversity of culturable plant growth-promoting bacterial endophytes associated with sugarcane roots and their effect of growth by co-Inoculation of diazotrophs and actinomycetes. *J Plant Growth Regul* 35: 1074–1087. <https://doi.org/10.1007/s00344-016-9604-3>
39. Kumar G, Kanaujia N, Bafana A (2012) Functional and phylogenetic diversity of root-associated bacteria of *Ajuga bracteosa* in Kangra valley. *Microbiol Res* 167: 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.09.001>
40. Lamizadeh E, Enayatizamir N, Motamedi H (2016) Isolation and Identification of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from the rhizosphere of sugarcane in saline and non-saline soil. *Int J Curr Microbiol App Sci* 5: 1072–1083.
41. Lin L, Guo W, Xing Y et al (2012) The actinobacterium *Microbacterium* sp. 16SH accepts pBBR1-based pPROBE vectors, forms biofilms, invades roots, and fixes N₂ associated with micropropagated sugarcane plants. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 1185-1195.
42. Mahmoud HM, Kalendar AA (2016) Coral-associated actinobacteria: diversity, abundance, and biotechnological potentials. *Front Microbiol* 7: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00204>.
43. Marulanda A, Barea JM, Azcón R (2009) Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM Fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *J Plant Growth Regul* 28: 115–124. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9079-6>
44. Masoud W, Takamiya M, Vogensen FK, Lillevang S, Al-Soud WA, Sørensen SJ, Jakobsen M (2011) Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. *Int Dairy J* 21: 142–148. [doi:10.1016/j.idairyj.2010.10.007](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.10.007)
45. Mayak S, Tirosh T, Glick BR (2004) Plant growth-promoting bacteria that confer

resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci* 166: 525–530. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.10.025>

46. Mehnaz S, Baig DN, Lazarovits G (2010). Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. *J Microbiol Biotechnol* 20: 1614–1623. doi:10.4014/jmb.1005.05014

47. Mehnaz S (2013) Microbes - friends and foes of sugarcane. *J Basic Microbiol* 53: 954–971. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200299>

48. Mitter EK, de Freitas JR, Germida JJ (2017) Bacterial root microbiome of plants growing in oil sands reclamation covers. *Front Microbiol* 8: 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00849>.

49. Mohite B (2013) Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *J Soil Sci Plant Nutr* 3: 638-649.

50. Nascimento FX, Rossi MJ, Soares CRFS, McConkey BJ, Glick BR (2014) New insights into 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) deaminase phylogeny, evolution and ecological significance. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099168>

51. Newman MM, Lorenz N, Hoilett N et al 2016. Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. *Sci Total Environ* 553: 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.078>

52. Nielsen TH, Sørensen D, Tobiasen C, Andersen JB, Christophersen C, Givskov M, Sørensen J (2002) Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas spp.* from the sugar beet rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 68: 3416–3423. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3416-3423.2002>

53. Oliveira ALM, Urquiaga S, Döbereiner J, Baldani JI (2002) The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil* 242: 205–215. <https://doi.org/10.1023/A:1016249704336>

54. Ortiz N, Armada E, Duque E, Roldán A, Azcón R (2015) Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. *J Plant Physiol* 174: 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.08.019>

55. Papadakis EN, Vryzas Z, Kotopoulou A, Kintzikoglou K, Makris KC, Papadopoulou-Mourkidou E (2015) A pesticide monitoring survey in rivers and lakes of northern Greece and its human and ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicol*

Environ Saf 116: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.033>

56. Park M, Kim C, Yang J, Lee H, Shin W, Kim S, Sa T (2005) Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol Res* 160: 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.10.003>

57. Paungfoo-Lonhienne C, Lonhienne TGA, Yeoh YK et al (2014) A new species of *Burkholderia* isolated from sugarcane roots promotes plant growth. *Microb Biotechnol* 7: 142–154. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12105>

58. Penrose DM, Moffatt BA, Glick BR (2001) Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC deaminase-containing bacteria on roots of canola seedlings. *Can J Microbiol* 47: 77-80.

59. Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol Plant* 118: 10–15. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x>

60. Pipke R, Amrhein N (1988) Isolation and characterization of a mutant of *Arthrobacter* sp. strain GLP-1 which utilizes the herbicide glyphosate as its sole source of phosphorus and nitrogen. *Appl Environ Microbiol* 54: 2868–2870.

61. Pisa G, Magnani GS, Weber H et al (2011) Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. *Brazilian J Med Biol Res* 44: 1215–1221. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500148>

62. Rajput L, Imran A, Mubeen F, Hafeez FY (2013) Salt-tolerant PGPR strain *Planococcus rifietoensis* promotes the growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivated in saline soil. *Pakistan J Bot* 45: 1955–1962.

63. Rau N, Mishra V, Sharma M, Das MK, Ahaluwalia K, Sharma RS (2009) Evaluation of functional diversity in rhizobacterial taxa of a wild grass (*Saccharum ravennae*) colonizing abandoned fly ash dumps in Delhi urban ecosystem. *Soil Biol Biochem* 41: 813–821. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.01.022>

64. Ribeiro CM, Cardoso EJBN (2012) Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiol Res* 167: 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.03.003>

65. Rolli E, Marasco R, Vigani G et al (2015) Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environ Microbiol* 17: 316–331. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12439>.

66. Romeiro RS (2001) *Methods in Plant Bacteriology*. Editora UFV, Viçosa

67. Sagarkar S, Mukherjee S, Nousiainen A, Björklöf K, Purohit HJ, Jorgensen KS, Kapley A (2013) Monitoring bioremediation of atrazine in soil microcosms using molecular tools. *Environ Pollut* 172: 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.07.048>
68. Sambrook E, Fritsch TM, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
69. Schreiter S, Ding GC, Heuer H et al (2014) Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. *Front Microbiol* 5: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00144>
70. Sebilo M, Mayer B, Nicolardot B, Pinay G, Mariotti A (2014) Long-term fate of nitrate fertilizer in agricultural soils. *Proc Natl Acad Sci* 111: E766. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321350111>
71. Singh GY, Singh US, Sharma AK (2015) Bacterial mediated amelioration of drought stress in drought tolerant and susceptible cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *African J. Biotechnol.* 14, 764–773. <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14405>
72. Someya N, Akutsu K (2005) Biocontrol of plant diseases by genetically modified microorganisms: current status and future prospects. In: Siddiqui ZA (ed) *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Springer, Dordrecht, pp. 297–312.
73. Sundara B, Natarajan V, Hari K (2002) Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *F Crop Res* 77: 43–49. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(02\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(02)00048-5)
74. Taketani RG, Lançon MD, Kavamura VN, Durrer A, Andreote FD, Melo IS (2017) Dry season constrains bacterial phylogenetic diversity in a semi-arid rhizosphere system. *Microb Ecol* 73: 153-161.
75. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
76. Tian Y, Gao L (2014) Bacterial diversity in the rhizosphere of cucumbers grown in soils covering a wide range of cucumber cropping histories and environmental conditions. *Microb Ecol* 68: 794–806. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0461-y>
77. Timm CM, Pelletier DA, Jawdy SS et al (2016) Two poplar-associated bacterial isolates induce additive favorable responses in a constructed plant-microbiome system. *Front Plant Sci* 7: 497.
78. Turnbull AL, Liu Y, Lazarovits G (2012) Isolation of bacteria from the

rhizosphere and rhizoplane of potato (*Solanum tuberosum*) grown in two distinct soils using semi selective media and characterization of their biological properties. *Am J Potato Res* 89: 294–305. <https://doi.org/10.1007/s12230-012-9253-4>

79. Upadhyay SK, Singh DP, Saikia R (2009) Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. *Curr Microbiol* 59: 489–496. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9464-1>

80. Urquiaga S, Xavier RP, de Morais RF et al (2012) Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. *Plant Soil* 356: 5–21. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1016-3>

81. Van de Poel B, Smet D, Van Der Straeten D (2015) Ethylene and hormonal cross talk in vegetative growth and development. *Plant Physiol* 169: 61-72.

82. Vargas L, Brígida ABS, Mota Filho JP et al (2014) Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways. *PLoS One* 9: 1–37. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114744>

83. Velázquez E, Rojas M, Lorite MJ, Rivas R, Zurdo-Piñeiro JL, Heydrich M, Bedmar EJ (2008) Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. *J Basic Microbiol* 48: 118-124.

84. Vurukonda, SSKP, Vardharajula S, Shrivastava M, SkZ A (2016) Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol Res* 184: 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>

85. Wang HF, Zhang YG, Li L et al (2015) *Okibacterium endophyticum* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from roots of *Salsola affinis* C. A. Mey. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* 107: 835–843. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0376-0>

86. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 73: 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>

87. Yang J, Kloepper JW, Ryu CM (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci* 14: 1-4.

88. Zahir ZA, Munir A, Asghar HN, Shaharoon B, Arshad M (2008) Effectiveness of rhizobacteria containing acc deaminase for growth promotion of peas (*Pisum*

sativum) under drought conditions. J Microbiol Biotechnol 18: 958–963.

89. Zerrouk IZ, Benchabane M, Khelifi L, Yokawa K, Ludwig-Müller J, Baluska F (2016) A *Pseudomonas* strain isolated from date-palm rhizospheres improves root growth and promotes root formation in maize exposed to salt and aluminum stress. J Plant Physiol 191: 111-119.

90. Zia-ul-Hussnain S, Haque MI, Mughal SM et al (2011) Isolation and biochemical characterizations of the bacteria (*Acidovorax avenae subsp. avenae*) associated with red stripe disease of sugarcane. African J Biotechnol 10: 7191–7197. <https://doi.org/10.5897/AJB11.953>

Table S1. Screening of plant growth promoting activities and identification of the bacteria isolated from sugarcane rhizosphere submitted to different drought conditions.

Taxon	IAA production	ACCd* activity	Phosphate solubilization	Nitrogen fixation	No plant growth activity	Total
<i>Acidovorax</i>	3	3	0	1	0	4
<i>Arthrobacter</i>	36	36	19	145	3	188
<i>Bacillus</i>	3	8	8	6	11	26
<i>Brevundimonas</i>	0	0	0	0	3	3
<i>Chryseobacterium</i>	3	0	0	1	6	10
<i>Ensifer</i>	1	1	0	0	0	1
<i>Falsibacillus</i>	2	3	0	0	2	5
<i>Gordonia</i>	0	0	0	3	0	3
<i>Leifsonia</i>	0	1	0	1	0	2
<i>Lysinibacillus</i>	2	0	0	0	0	2
<i>Microbacterium</i>	1	2	3	1	13	20
Micrococcaceae	0	0	0	0	1	1
<i>Nocardia</i>	0	0	0	2	0	2
<i>Okibacterium</i>	0	0	2	0	1	3
Paenibacillaceae	0	0	0	0	1	1
<i>Pedobacter</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Planococcus</i>	1	0	0	0	0	1
Pseudomonadaceae	1	0	1	1	0	1
<i>Pseudomonas</i>	41	27	33	19	4	55
<i>Renibacterium</i>	1	0	0	2	0	2
<i>Rhizobium</i>	2	0	0	2	1	3
<i>Rhodococcus</i>	0	2	0	1	0	3
<i>Staphylococcus</i>	0	0	0	1	4	5
<i>Streptomyces</i>	1	6	3	3	5	14
<i>Terrabacter</i>	0	0	0	3	0	3
Unclassified	0	1	0	1	2	4
TOTAL	99	90	70	194	57	

*ACCd: ACC deaminase.

Table S2. Pot experiment results.

Isolate	Root length (cm)	Shoot length (cm)	Shoot / root	Fresh weight (g)	Dry weight (g)
Pot experiment 1					
Control	7.69	6.51	1.233	222.67	13.17
WS01-2	7.25	6.28	1.20	240.03	13.80
WS02-30	7.91	10.34	0.85	285.61	16.29
WS03-29	8.13	6.54	1.26	318.76	15.80
Pot experiment 2					
Control	12.05	10.1	1.366	890.44	263.01
WS02-32	11.30	11.50	1.02	1205.23	441.66
WS03-17	11.95	10.75	1.26	768.85	273.87
WS83-5	11.40	10.65	1.07	802.54	267.07
WS121-16	13.10	10.75	1.23	955.90	253.99
WS121-17	12.10	12.35	1.04	822.45	246.55
Pot experiment 3					
Control	8.57	8.64	1.028	529.714	33.957
WS122-13	8.46	11.44	0.79	511.20	29.58
WS123-12	9.30	8.94	1.08	476.18	28.03
WS124-7	8.33	10.50	0.88	415.08	23.55
Pot experiment 4					
Control	7.49	7.37	1.115	320.31	21.3
WS03-14	7.83	9.90	0.94	404.44	27.95
WS04-19	7.75	8.82	0.89	400.46	28.02
WS04-23	7.79	7.50	1.14	426.97	24.95
WS23-8	7.07	9.38	0.81	471.37	27.79
WS24-2	7.66	7.38	1.17	348.97	21.67
WS24-3	7.99	9.55	0.93	359.58	25.61
WS121-6	7.08	8.78	0.87	422.25	28.23

CONCLUSÕES GERAIS

Nesse trabalho, técnicas dependentes e independentes de cultivo foram utilizadas para avaliar a resposta ao estresse hídrico da microbiota associada a rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001, resistente a seca. A análise dos dados do metatranscriptoma revelou que a composição taxonômica e funcional da comunidade microbiana associada a rizosfera foi afetada pelo período de estresse hídrico avaliado. De modo geral, o estresse hídrico provocou uma diminuição de grupos bacterianos conhecidos por promoverem o crescimento vegetal, enquanto que as categorias funcionais mais afetadas pelo estresse hídrico foram associadas a colonização das plantas e ao metabolismo geral dos micro-organismos. Dessa forma, é possível concluir que o estresse hídrico pode afetar as interações benéficas de algumas bactérias com a planta hospedeira. Esses resultados foram observados principalmente nas amostras submetidas a oito dias de estresse hídrico, condição em que um maior número de transcritos *down regulated* foi reportado. Por outro lado, o estresse hídrico favoreceu o aumento da abundância de alguns grupos bacterianos conhecidos por crescer em ambientes com baixa disponibilidade de água e degradar diferentes compostos, além de grupos taxonômicos pouco explorados. Os resultados sugerem que a capacidade de degradar proteínas e utilizar fontes alternativas de carbono auxiliaram as bactérias a sobreviver em condições de estresse. Entre as bactérias que foram capazes de resistir ao estresse hídrico, o gênero *Aequorivita* se mostrou relevante entre os demais membros da comunidade microbiana da rizosfera, uma vez que os resultados de correlações sugerem uma interação positiva entre os transcritos desse gênero e os ácidos orgânicos exsudados pela planta (cítrico, isocítrico e málico). A taxa de exsudação desses ácidos orgânicos foi maior nas amostras submetidas ao estresse hídrico mais intenso, sugerindo que esta seja uma das estratégias da variedade resistente de cana-de-açúcar para sobreviver ao estresse.

O estresse hídrico também afetou a comunidade microbiana cultivável associada a rizosfera de cana-de-açúcar CTC9001, uma vez que foi observado uma diminuição do número total de colônias obtidas à medida que o período de estresse hídrico aumentava. No entanto, alguns gêneros microbianos puderam ser isolados em todas as condições de estresse e muitos deles apresentaram resultados positivos para a promoção de crescimento vegetal. Esses isolados são importantes fontes de

estudos futuros para acelerar o crescimento da cana-de-açúcar e de outras plantas economicamente importantes.

A comparação dos dados do metatranscriptoma das variedades CTC9001 (resistente a seca) e RB855536 (sensível a seca) revelou diferenças importantes na composição e na atividade microbiana da rizosfera entre as duas variedades em condições de estresse hídrico. Essas diferenças já puderam ser observadas no período mais curto de estresse hídrico avaliado (dois dias) e podem ter sido influenciadas pelas diferenças na composição e na taxa de exsudação dos ácidos orgânicos liberados pelas raízes das plantas. A variedade resistente de cana-de-açúcar aparenta fornecer condições favoráveis para as atividades bacterianas associadas a mobilidade, colonização e crescimento celular. A variedade sensível apresentou grande abundância de transcritos associados a proteínas de ligação ao DNA e ao ribossomo, sugerindo modificações na regulação gênica dos membros da microbiota. Os gêneros *Streptomyces* e *Aequorivita* responderam de forma diferente ao estresse hídrico e à presença dos exsudados radiculares quando associados a diferentes variedades de cana-de-açúcar, sugerindo uma participação da planta na modulação da atividade microbiana na rizosfera.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbamondi GR, Tommonaro G, Weyens N *et al.* (2016) Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1): 1.
- Ahemad M, Kibret M (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26(1): 1-20.
- Ambreetha S, Chinnadurai C, Marimuthu P, Balachandar D (2018) Plant-associated *Bacillus* modulates the expression of auxin-responsive genes of rice and modifies the root architecture. *Rhizosphere*, 5: 57-66.
- Anzuay MS, Ludueña LM, Angelini JG, Fabra A, Taurian T (2015) Beneficial effects of native phosphate solubilizing bacteria on peanut (*Arachis hypogaea L*) growth and phosphorus acquisition. *Symbiosis*, 66(2): 89-97.
- Bal HB, Das S, Dangar TK, Adhya TK (2012) ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *Journal of Basic Microbiology*, 00: 1–13.
- Barnawal D, Pandey SS, Bharti N *et al.* (2017) ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria protect *Papaver somniferum* from downy mildew. *Journal of applied microbiology*, 122(5): 1286-1298.
- Berendsen RL, Pieterse CM, Bakker PA (2012) The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17(8): 478-486.
- Boaretto LF, Carvalho G, Borgo L, Creste S, Landell MG *et al.* (2014) Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 74: 165-175.
- Chaparro JM, Badri DV, Vivanco JM (2013) Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *ISME Journal*, 8: 790-803.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2013) Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, agosto/2013. CONAB, Brasília, 19 pp.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2017) Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, abril/2017. CONAB, Brasília, 62 pp.

- Compant S, van der Heijden MGA, Sessitsch A (2010) Climate change effects on beneficial plant-microorganism interactions. *FEMS Microbiology Ecology*, 73: 197–214.
- Cotta SR, Dias ACF, Marriel IE *et al.* (2014) Different effects of transgenic maize and nontransgenic maize on nitrogen-transforming archaea and bacteria in tropical soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(20): 6437-6445.
- Creus CM, Sueldo RJ, Barassi CA (2004) Water relations and yield in *Azospirillum* inoculated wheat exposed to drought in the field. *Canadian Journal of Botany*, 82: 273–281.
- De La Fuente GN, Frei UK, Lübberstedt T (2013) Accelerating plant breeding. *Trends in plant science*, 18(12): 667-672.
- De Souza RSC, Okura VK, Armanhi JSL *et al.* (2016) Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Scientific Reports*, 6: 1-15.
- Dobereiner J (1961) Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia derx* in the rhizosphere of sugar cane. *Plant and Soil XV*, 3: 1-6
- Fuentes-Ramirez LE, Caballero-Mellado J (2005) Bacterial biofertilizers. In: Siddiqui ZA (eds), PGPR: Biocontrol and biofertilization. Springer, Netherlands, pp. 143-172.
- Graham PH, Vance CP (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131: 872-877.
- Glick BR (2010) Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology advances*, 28(3): 367-374.
- Glick BR (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169: 30–39.
- Goswami D, Dhandhukia P, Patel P, Thakker JN (2014) Screening of PGPR from saline desert of Kutch: growth promotion in *Arachis hypogea* by *Bacillus licheniformis* A2. *Microbiological Research*, 169(1): 66-75.
- Hardy JT (2003) Climate Change: causes, effects and solutions. Wiley, Chichester 206 pp.
- Inman-Bamber NG, Smith DM (2005) Water relations in sugarcane and response to water deficits. *Field Crop Research*, 92(2): 185-202.
- IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change (2007) Climate change 2007: synthesis report. IPCC, Geneva, 104 pp.

- IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change (2014) Climate change 2014: synthesis report. IPCC, Geneva, 151 pp.
- Kossmann J (2012) Grand challenges in plant biotechnology. *Frontiers in plant science*, 3: 61.
- Kudoyarova GR, Vysotskaya LB, Arkhipova TN *et al.* (2017) Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(11): 253.
- Le Houerou HN (1996) Climate change, drought and desertification. *Journal of Arid Environment*, 34: 133–185.
- Lin W, Wu L, Lin S *et al.* (2013) Metaproteomic analysis of ratoon sugarcane rhizospheric soil. *BMC Microbiology*, 13(1): 135.
- Marschner P, Solaiman Z, Rengel Z (2006) Rhizosphere properties of *Poaceae* genotypes under P-limiting conditions. *Plant and Soil*, 283: 11-24.
- Marulanda A, Barea JM, Azcón R (2009) Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(2): 115-124.
- Mehnaz S (2013) Microbes—friends and foes of sugarcane. *Journal of Basic Microbiology*, 53(12): 954-971.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente (2017) Índice de vulnerabilidade aos desastres naturais relacionados às secas no contexto da mudança do clima: sumário executivo. Ministério do Meio Ambiente, Ministério da Integração Nacional, WWF-Brasil. – Brasília, 36 pp.
- Ortiz N, Armada E, Duque E, Roldán A, Azcón R (2015) Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: Effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. *Journal of Plant Physiology*, 174: 87-96.
- PBMC - Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas (2014) Sumário executivo: primeiro relatório de avaliação nacional. PBMC, Rio de Janeiro, 34 pp.
- Pham VT, Rediers H, Ghequire MG *et al.* (2017) The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. *Archives of microbiology*, 199(3): 513-517.
- Pieterse CM, de Jonge R, Berendsen RL (2016) The soil-borne supremacy. *Trends in plant science*, 21(3): 171-173.

- Pisa G, Magnani GS, Weber H *et al.* (2011) Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(12): 1215-1221.
- Prabu G, Kwar PG, Pagariya MC, Prasad DT (2011) Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(2): 291-304.
- Pritchard SG (2011) Soil organisms and global climate change. *Plant Pathology*, 60(1): 82-99.
- Puri A, Padda KP, Chanway CP (2016) Evidence of nitrogen fixation and growth promotion in canola (*Brassica napus L.*) by an endophytic diazotroph *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R. *Biology and fertility of soils*, 52(1): 119-125.
- Puri A, Padda KP, Chanway CP (2018) Nitrogen-fixation by endophytic bacteria in agricultural crops: recent advances. *Nitrogen in Agriculture-Updates*, InTech.
- Sarkar A, Ghosh PK, Pramanik K (2018) A halotolerant *Enterobacter* sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. *Research in Microbiology*, 169: 20-32.
- Scortecci KC, Creste S, Calsa Jr T *et al.* (2012) Challenges, opportunities and recent advances in sugarcane breeding. *In Plant Breeding*, InTech.
- Singh RP, Shelke GM, Kumar A, Jha PN (2015) Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to “stress ethylene” produced in plants. *Frontiers in microbiology*, 6: 937
- Smalla K, Sessitsch A, Hartmann A (2006) The Rhizosphere: soil compartment influenced by the root. *FEMS Microbiology Ecology*, 56: 165.
- Tejera N, Lluch C, Martinez-Toledo MV, Gonzalez-Lopez J (2005) Isolation and characterization of *Azotobacter* and *Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil*, 270(1): 223-232.
- Vargas L, Santa Brígida AB, Mota Filho JP *et al.* (2014) Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways *Plos One*, 9(12): e114744.
- Yang J, Kloepper JW, Ryu CM (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in plant science*, 14(1): 1-4.
- Zhang J, Wang P, Fang L *et al.* (2017) Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from mushroom residues and their effect on tomato plant growth promotion. *Polish Journal of Microbiology*, 66(1): 57-65.

ANEXO 1



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpqib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "*Impacto do estresse hídrico na microbiota associada a rizosfera de diferentes variedades de cana-de-açúcar*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Leticia Bianca Pereira".

Nome do(a) aluno(a): Leticia Bianca Pereira

Assinatura:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Laura M. M. Ottoboni".

Nome do(a) orientador(a): Laura M. M. Ottoboni

Data: 30 de agosto de 2018

ANEXO 2**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Impacto do estresse hídrico na microbiota associada a rizosfera de diferentes variedades de cana-de-açúcar**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30 de agosto de 2018

Assinatura :



Nome do(a) autor(a): **Leticia Bianca Pereira**

RG n.º 44.867.926-7

Assinatura :



Nome do(a) orientador(a): **Laura M. M. Ottoboni**

RG n.º 68554965