

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Dinâmica do microbioma da rizosfera de mandacaru na
Caatinga**

Clederson Ferreira

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

**Piracicaba
2014**

Clederson Ferreira
Bacharel em Ciências Biológicas
ênfase em Biotecnologia

Dinâmica do microbioma da rizosfera de mandacaru na Caatinga

Orientador:
Prof. Dr. **RODRIGO MENDES**

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Ferreira, Clederson
Dinâmica do microbioma da rizosfera de mandacaru na Caatinga / Clederson Ferreira. - -
Piracicaba, 2014.
88 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.
Bibliografia.

1. Caatinga 2. Metagenoma 3. Rizosfera 4. Comunidade bacteriana I. Título

CDD 633.39
F383d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À minha esposa, Kaira Samaini.

Dedico!

Aos meus pais Antônio e Nedi, e aos meus irmãos Anderson e Peterson, que apesar da distância nunca estiveram longe e nunca me deixaram faltar amor, incentivo e o apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

À Deus, sem ele nada seria possível;

À minha esposa Kaira Samaini, por todo o apoio, dedicação, paciência e tornar minha vida muito mais feliz;

À minha família, por todo o amor, dedicação, educação e apoio incondicionais e principalmente por não deixar a distância interferir nos ensinamentos que me foram passados, respeito e humildade sem nunca desistir do objetivo.

Aos meus irmãos, Anderson e Peterson, pelo enorme apoio, ensinamentos, afeto e motivação;

Aos meus sogros, cunhados, cunhadas e amigos pela compreensão, carinho e incentivo sempre que precisei;

Ao Dr. Rodrigo Mendes, pela orientação, pelos ensinamentos, pela compreensão, paciência, dedicação dispensados a mim, e por tornar possível a realização deste trabalho;

Ao professor Dr. João Roberto Spott Lopes, e toda a equipe do Laboratório de Insetos Vetores, pelo grande incentivo, apoio, bons conselhos, e muitos momentos vivenciados;

Ao Dr. Itamar S. Melo, pela oportunidade, motivação e conhecimentos compartilhados;

Ao Dr. Rodrigo Gouveia Taketani e Dra. Vanessa Nessner Kavamura pela boa convivência e pela grande colaboração quando necessária;

Ao Dr. Fernando Dini Andreote, pelo apoio, oportunidade, credibilidade e compreensão;

Ao Dr. Carlos Gava pela colaboração e parceria para a realização deste trabalho;

À Emiliana, Lucas, Fabio, Danilo, Leonardo, Rafael e a todos os colegas do laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, pelo auxílio, companhia e bons momentos vivenciados;

Aos colegas Ademir, Diogo, Pedro, Luana e aos demais colegas do laboratório de Microbiologia do Solo da ESALQ/USP, pelas conversas, distrações e companheirismo;

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo crucial apoio e oportunidade ao financiar com o projeto de mestrado (proc. no. 2011/15760-5);

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” pela oportunidade de aprendizado oferecida para realização deste trabalho;

A todos os funcionários da Embrapa Meio Ambiente, pela disposição e por colaborar sempre e em tudo que foi necessário;

À todos aqueles que de uma forma ou de outra nos dão estímulos para perseguir nossos objetivos.

Muito Obrigado!!!

“Lembre-se que um bom guerreiro compartilha com o outro o que sabe do caminho. Quem ajuda sempre é ajudado, e precisa ensinar o que aprendeu. Por isso ele senta-se ao redor da fogueira e conta como foi seu dia de luta. Um amigo sussurra: por que fala tão abertamente de sua estratégia? Não vê que, agindo assim, corre o risco de ter que dividir suas vitórias com os outros? O guerreiro apenas sorri, e não responde. Sabe que, se chegar ao final da jornada num paraíso vazio, sua luta não terá valido a pena”.

(Paulo Coelho).

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Aquecimento global e desertificação.....	23
2.2 O bioma Caatinga	25
2.3 A vegetação da Caatinga	26
2.4 O mandacaru.....	29
2.5 Interações entre micro-organismos e plantas.....	30
2.6 Micro-organismos de solo em regiões secas	32
2.7 O solo e o microbioma da rizosfera.....	33
2.8 Metagenômica da rizosfera.....	35
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivos específicos.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Desenho experimental	41
4.2 Local de estudo na Caatinga.....	42
4.3 Coleta das amostras de solo rizosférico.....	42
4.4 Análise físico-química das amostras de solo	44
4.5 Extração de DNA total da rizosfera.....	45
4.6 Preparo das bibliotecas.....	45
4.6.1 Biblioteca do gene 16S rRNA	45
4.6.2 Biblioteca de DNA total	46
4.7 PCR de emulsão (em-PCR)	46
4.8 Sequenciamento.....	47
4.9 Análise dos dados e anotações	47
4.9.1 Dados de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA	47
4.9.2 Dados de sequenciamento do DNA total.....	49

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Coleta dos dados	51
5.2 Análise físico-química da rizosfera.....	52
5.3 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	54
5.3.1 Anotação do gene 16S rRNA no RDP.....	56
5.3.2 Anotação do gene 16S rRNA no QIIME	58
5.4 Sequenciamento metagenômico.....	62
5.4.1 Análise da estrutura da comunidade microbiana (DNA total).....	64
5.4.2 Análise funcional	72
6 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS.....	77

RESUMO

Dinâmica do microbioma da rizosfera de Mandacaru na Caatinga

O atual cenário mundial das mudanças climáticas, somado ao aquecimento global e ao aumento das áreas em processo de desertificação tem impactado diretamente nos padrões de produção agrícola. A Caatinga é um bioma que só ocorre no Brasil e possui um clima semiárido, quente e de baixa pluviosidade, sendo que na estação seca a temperatura do solo pode chegar até 60°C. A Caatinga apresenta uma grande riqueza de ambientes e espécies, e boa parte dessa diversidade não é encontrada em nenhum outro bioma. Uma característica muito peculiar da Caatinga é a existência de duas estações bem contrastantes durante o ano, o inverno caracterizado por ser a estação da chuva e o verão a época da seca. A vegetação é composta por Euforbiáceas, Bromeliáceas e Cactáceas, dentre as quais destacam-se o *Cereus jamacaru* (mandacaru), *Pilosocereus gounellei* (xique-xique) e *Melocactus* sp. (cabeça-de-frade). O mandacaru planta que sobrevive às altas temperaturas e baixa disponibilidade de água da Caatinga possui adaptações morfológicas estruturais que contribuem para a sobrevivência da mesma. Além dessas adaptações a comunidade microbiana da rizosfera foi estudada para descobrir quais micro-organismos presentes nesse ambiente auxiliam na manutenção do hospedeiro frente a essas condições adversas. Assim como, quais grupos e funções são mais abundantes nessas condições. Nesse estudo foi feito o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e do DNA total da rizosfera de mandacaru. A comunidade bacteriana foi bem representada pelos filos Actinobacteria, Proteobacteria e Acidobacteria, sendo que o filo Actinobacteria foi mais abundante na seca de acordo com o sequenciamento metagenômico e o filo Acidobacteria foi mais abundante no período de chuva. Em geral o sequenciamento do gene 16S rRNA, indicou que Actinobacteria e Proteobacteria são os filos mais abundantes e os genes relacionados às funções de resistência a doenças foram mais abundantes na estação seca, enquanto genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio foram mais abundantes durante o período chuvoso, revelando assim, um pouco do potencial que o microbioma da rizosfera de mandacaru possui para auxiliar a planta hospedeira.

Palavras-chave: Caatinga; Metagenoma; Rizosfera; Comunidade bacteriana

ABSTRACT

Dynamics of mandacaru rhizosphere microbiome in the Caatinga

The present world scenario of climate change, global warming and the increase in areas undergoing desertification, have directly impacted on current patterns of agricultural crop production. The Caatinga is a specific Brazilian biome because of its semi-arid climate, hot and low rainfall, and the temperature that reaches the 60°C in the dry season. The Caatinga has a huge biodiversity and much of its diversity is not found in any other biome. A peculiar characteristic of the Caatinga biome is the occurrence of two very contrasting seasons during the year, the winter which is characterized by a rainy season and summer the dry season. The vegetation is composed by *Euphorbiaceae*, *Bromeliaceae* and *Cactaceae*, represented by *Cereus jamacaru* (Mandacaru) *Pilosocereus gounellei* (xique-xique) and *Melocactus sp.* (head-to-brother). Mandacaru is the plant that can survive through the specific climate conditions of the Caatinga biome such as high temperatures and low water availability and this is probably due to some structural and morphological adaptations that contribute to its survival. Therefore, we assessed which microorganisms are associated with the plant rhizosphere, and which microbial groups contribute to the maintenance of the host throughout these adverse conditions. Also, we identified which are the most abundant microbial groups in these conditions and which microbial functions are more abundant in both evaluated seasons. Thus the present study assessed the mandacaru rhizosphere microbiome through a partial 16S *rRNA* gene sequencing and metagenomic sequencing. The bacterial community was well represented by the phyla *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Acidobacteria*. The *Actinobacteria* was the most abundant microbial phyla in the dry season according to shotgun sequencing while the *Acidobacteria* was the most abundant microbial phyla in the rainy season. Overall, the 16S *rRNA* sequencing indicated that *Actinobacteria* and *Proteobacteria* were the most abundant groups and additionally, genes related to disease resistance functions were more abundant in the dry season. Genes related to nitrogen metabolism were more abundant during the rainy season revealing some of the potential traits that the mandacaru can explore from its microbiome.

Keywords: Caatinga; Metagenome; Rhizosphere; Bacterial community

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa do Brasil com representação da região nordeste, limites do bioma Caatinga e localização do município de Petrolina, local de estudo.....22
- Figura 2 - Transição entre o período seco e chuvoso na Caatinga, A) Caatinga no período seco e B) Caatinga no período chuvoso.....25
- Figura 3 - Flores e frutos laterais da espécie *Cereus jamacuru* (mandacaru).....27
- Figura 4 - Foto do mandacaru (A), coroa de frade (B) e palminha (C).....28
- Figura 5 - Cacto *Pilosocereus gounellei* (xique-xique) (A e B). Observe o aspecto de candelabro.....28
- Figura 6 - Coroa-de-frade ou cabeça-de-frade.....29
- Figura 7 - Esquema da metodologia realizada para a coleta e o processamento de amostras de rizosfera de mandacaru. O período seco é representado pelo sol e o período chuvoso pela nuvem. O sinal de “igual” significa que foram amostradas as mesmas plantas nos dois períodos. Ao centro, os *barcodes* (tag) adicionados em cada amostra para identificação das bibliotecas de 16S rRNA e por fim os chips 316 utilizados no PGM Ion Torrent.....41
- Figura 8 - Imagem de satélite focando na estação da Embrapa Semiárido, Petrolina (PE) e na área da Caatinga onde foram realizadas as coletas (Ponto de coleta).....42
- Figura 9 - Imagens das coletas nas três plantas selecionadas, onde A, B e C representam a coleta do período chuvoso e D, E e F representam a coleta no período de seca. Nas letras G, H e I, pode ser observado o termômetro para registrar a temperatura do solo e a marcação dos três pontos de coleta de cada planta.....43
- Figura 10 - Gráfico com histórico da precipitação hídrica dos últimos quarenta anos da Caatinga (barras pretas), com histórico hídrico do ano da realização do estudo

(linha azul) e com os dois momentos de amostragem indicados pelas setas vermelhas. Dados coletados da estação meteorológica localizada na sede da Embrapa Semiárido em Petrolina, PE.....51

Figura 11 - Gel de eletroforese dos *amplicons* das bibliotecas de 16S rRNA das amostras em duplicata R1, R2 e R3 (estação chuvosa) na parte superior da imagem e das amostras em duplicata D1, D2 e D3 (estação seca) na parte inferior da imagem. M = marcador (GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder).....55

Figura 12 - *Score* de qualidade por posição no *read* de sequenciamento de 16S rRNA extraído da plataforma Galaxy.....56

Figura 13 - Composição da comunidade microbiana da rizosfera de mandacaru ao nível de filo entre os dois grupos (seca e chuva) com sequências 16S rRNA anotadas no RDP.....58

Figura 14 - Curva de rarefação das amostras de 16S rRNA. Dados extraídos do Qiime.....59

Figura 15 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada na matriz de distância UniFrac, comparando as amostras com base na medida de distância filogenética das UTOs no servidor do QIIME. Os pontos vermelhos (quadrados) do gráfico representam as três plantas na seca (D) e, os três pontos azuis (redondos), representam as plantas na chuva (R).....60

Figura 16 - Análise de avaliação taxonômica de 16S rRNA extraídos do servidor QIIME, onde amostras da chuva são representadas pela letra R e amostras da seca pela letra D. Os números equivalem a cada planta amostrada e o banco de dados de referência foi o Greengenes.....61

Figura 17 - Curvas de rarefação extraídas do servidor MG-RAST, mostrando a disposição dos *reads* do sequenciamento metagenômico entre as 6 amostras analisadas....63

Figura 18 - Estrutura da comunidade bacteriana baseada no sequenciamento metagenômico. Freqüências relativas das sequências de filós entre as 6 amostras de DNA total.

Dados extraídos do Krona Graph na plataforma MG- RAST, utilizando anotação no banco de dados do M5NR.....65

- Figura 19 - Gráficos para comparação, onde A) Proporção de sequências obtidas para o filo Actinobacteria agrupado por período (chuva e seca). A cor azul representa as amostras do período chuvoso enquanto a cor laranja representa o período de seca. B) proporção de sequências obtidas para o filo Proteobacteria agrupado por período (chuva e seca). A cor azul representa as amostras do período chuvoso enquanto a cor laranja representa o período de seca. Dados analisados no software STAMP com dados obtidos no MG-RAST.....68
- Figura 20 - Análise de agrupamento “Heatmap” da classificação filogenética baseada nos dados de abundância total de UTOs gerado no servidor do MG-RAST utilizando como referência o banco de dados do M5NR, apresentando os filós associadas às amostras a direita e em cima o agrupamento das mesmas. R) amostras no período de chuva e D) amostras no período de seca.....71
- Figura 21 - Comparação de sequências obtidas do MG-RAST utilizando o banco de dados Subsystems e analisados no software Stamp ao nível funcional. A cor azul representa as amostras do período chuvoso enquanto a cor laranja representa o período de seca.....72
- Figura 22 - Análise de agrupamento “Heatmap” da classificação funcional baseada nos dados de abundância total de UTOs gerado no servidor do MG-RAST utilizando como referência o banco de dados do Subsystems, apresentando as funções associada às amostras a direita e em cima o agrupamento das mesmas. R) amostras no período de chuva e D) amostras no período de seca.....74

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Dados registrados e observados no momento de cada coleta nas duas estações (chuva e seca).....44
- Tabela 2 - Análise dos parâmetros físico-químicos dos solos coletados nas duas estações: de chuva e de seca. Valores estão apresentados como as médias \pm o erro padrão (n=3). Em cada linha, valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 5,0%.....53
- Tabela 3 - Identificação dos *Tags* ligados nas amostras para sequenciamento do gene 16S rRNA. Os *Tags* foram compostos por 5 pb – *barcode*, para os 3 pontos da coleta do período chuvoso (amostras de R1 a R3) e seco (amostras de D1 a D3).....55
- Tabela 4 - Número de sequências do sequenciamento 16S após limpeza na plataforma Galaxy.....56
- Tabela 5 - Resultado das amostras sequenciadas (DNA total) anotadas pelo MG-RAST.....63
- Tabela 6 - Táxons mais representativos durante os períodos estudados: chuva (R) e seca (D) após análise no STAMP, para um valor de $p < 0,1$67

1 INTRODUÇÃO

O atual cenário climático do Brasil, em razão do aumento progressivo da concentração de gases de efeito estufa e aumento das temperaturas, indica que dentro de algumas décadas o Norte-Nordeste brasileiro se tornará ainda mais seco. Isto, somado ao aumento das áreas em processo de desertificação, causará um impacto direto nos padrões de produção agrícolas atuais. As chuvas e as elevadas temperaturas interagem de modo que causam constantes mudanças no solo, aumentando assim as áreas em processo de desertificação de alguns biomas.

O bioma é um conjunto de vegetação que abrange áreas contínuas com flora e fauna e são definidas pelas condições físicas predominantes nas regiões. Esses aspectos climáticos e geográficos fazem com que um bioma apresente uma diversidade biológica própria do local.

Na região do nordeste do Brasil, conhecida pela sua biodiversidade, se destaca o bioma da Caatinga, que ocupa cerca de 8% do território do país (GIULIETTI et al., 2006). O nome Caatinga é de origem indígena e significa “mata clara e aberta”. É um bioma exclusivamente brasileiro, sendo considerado um patrimônio biológico, sendo o principal da Região Norte.

A Caatinga compreende aproximadamente uma área de 935 mil km² distribuídas no Piauí, Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (SAMPAIO et al., 2007). A área do bioma Caatinga e a região dos pontos de estudo podem ser observados na Figura 1.

Deste modo, tendo em vista a importância do bioma Caatinga, que ainda é pouco estudado, foram utilizados métodos independentes de cultivo para estudar a dinâmica e a estrutura da comunidade microbiana em amostras de rizosfera de mandacaru (*Cereus jamacaru*) cacto típico da região da Caatinga do semiárido brasileiro, em dois períodos distintos: período de seca e período de chuva.

Considerando a grande importância dos micro-organismos em todos os sistemas biológicos, torna-se essencial o conhecimento da riqueza de informação presente nos diferentes biomas. Além disso, entender as interações de plantas com micro-organismos presentes na rizosfera de um ambiente tão desfavorável, como é o caso do semiárido brasileiro, pode ajudar na preservação destes ambientes e na descoberta de novas alternativas para tolerar a seca.

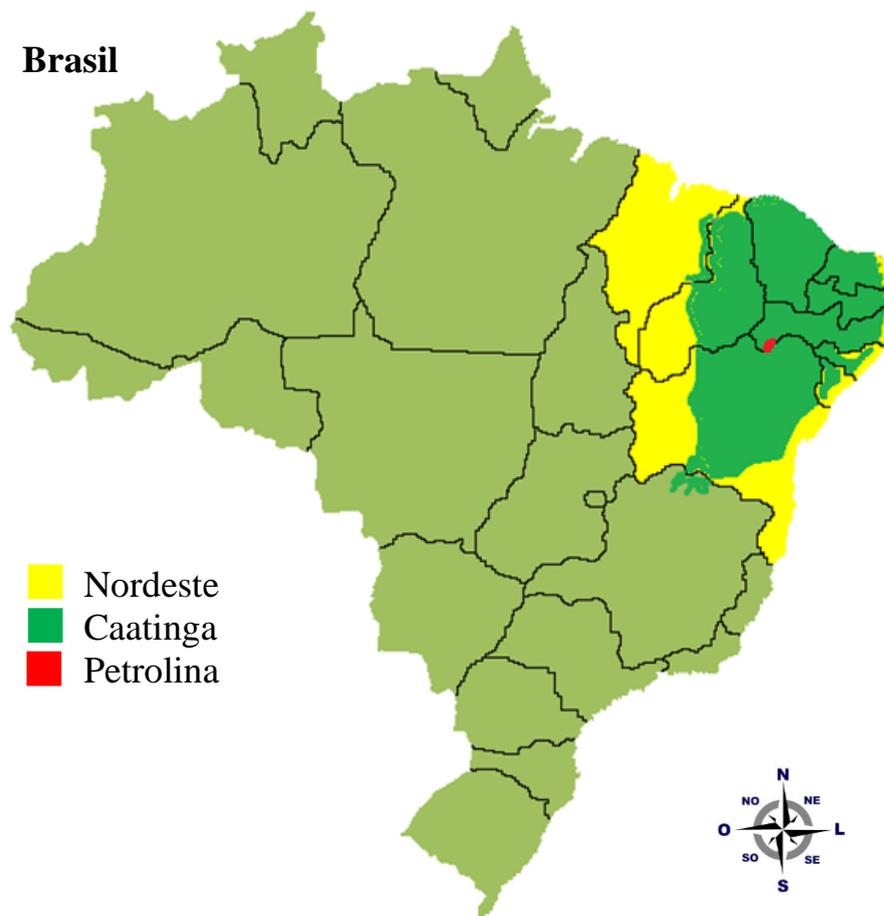


Figura 1 – Mapa do Brasil com representação da região nordeste, limites do bioma Caatinga e localização do município de Petrolina, local de estudo

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aquecimento global e desertificação

Em decorrência das mudanças climáticas globais, a Organização Meteorológica Mundial (OMM) e a United Nations Environment Programme (UNEP) criaram o IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) em 1988 (ASSAD et al., 2004). De acordo com o IPCC, no século XX, houve um aumento de 0,65°C na média da temperatura global, sendo este mais pronunciado na década de 90. Quanto à precipitação, o aumento variou de 0,2% a 0,3% na região tropical, compreendida entre 10° de latitude Norte e 10° de latitude Sul. As causas dessas variações podem ser de ordem natural, antropogênica ou a soma das duas (IPCC, 2007).

Com o aquecimento global, espera-se um cenário de clima mais extremo com secas, inundações e ondas de calor mais frequentes (SALATI, 2004). A elevação na temperatura aumenta a capacidade do ar em reter vapor d'água e, conseqüentemente, há maior demanda hídrica. Em resposta a essas alterações, os ecossistemas de plantas poderão aumentar sua biodiversidade ou sofrer influências negativas (ASSAD et al., 2004).

Culturas tolerantes a altas temperaturas provavelmente serão beneficiadas até o seu limite próprio de tolerância ao estresse térmico. Nas plantas, o aumento da temperatura é diretamente proporcional à atividade fotossintética. As reações catalisadas enzimaticamente podem ser aceleradas, resultando na perda da atividade das enzimas, fator este associado à tolerância das plantas ao calor (ASSAD et al., 2004).

O El Niño é o aquecimento anormal das águas superficiais do Pacífico Equatorial, uma alteração oceânica e atmosférica que afeta o regime de chuvas em boa parte do planeta. No Brasil esse fenômeno tende a provocar secas no Norte e Nordeste e intensificar a pluviosidade no Sul. Simulações feitas com o Besm (Modelo Brasileiro do Sistema Terrestre) mostraram que o hipotético desmatamento total da Amazônia aumentaria a intensidade dos El Niños e reduziria a precipitação anual sobre a região Norte em até 40% (Fundação de Apoio à Pesquisa de São Paulo (FAPESP, 2013).

Os cientistas da NASA e uma equipe internacional de pesquisadores descobriram que ecossistemas tropicais podem gerar dióxido de carbono significativamente quando as temperaturas aumentam, ao contrário de ecossistemas em outras partes do mundo (National Aeronautics and Space Administration (NASA), 2013). O Nordeste do Brasil está sofrendo a pior seca dos últimos cinquenta anos, ameaçando o abastecimento de água em mais de 1.100 cidades (EARTHWEEK, 2012). Em todo o mundo, o ano de 2012 esteve entre os dez anos

mais quentes já registrados. O semiárido vive hoje o segundo ano do período de seca, iniciado em 2011, o qual pode se prolongar por tempo indeterminado (FAPESP, 2013).

Esses dois anos de seca causaram a morte de rebanhos e prejudicaram culturas de milho e algodão e a produção de cana de açúcar regional diminuiu cerca de 30% (FIRE EARTH, 2013). O acesso à água potável foi precário para quase 22 milhões de brasileiros que vivem na região semiárida e sofrem os impactos da maior estiagem dos últimos 50 anos. Para tentar conter os efeitos da situação histórica, mais de 1 milhão de pessoas foram beneficiadas com a Bolsa Estiagem, auxílio financeiro para agricultores e famílias dos municípios em situação de emergência ou calamidade, além da construção de novas cisternas (FIRE EARTH, 2013).

De acordo com o primeiro Relatório de Avaliação Nacional (RAN1) do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas (PBMC) apresentado em agosto de 2013, o clima no Brasil deverá ser mais quente nas próximas décadas devido o aumento gradativo e variável da temperatura média em todas as regiões do país entre 1°C a 6°C até 2100 (FAPESP, 2013) e a ocorrência de chuvas deverá diminuir significativamente em grande parte das regiões Central, Norte e Nordeste e aumentar nas regiões Sul e Sudeste.

Eventos extremos de seca e estiagens prolongadas, principalmente nos biomas da Amazônia, Cerrado e Caatinga devem aumentar e essas mudanças devem se acentuar a partir da metade e no fim do século 21. A temperatura da Caatinga deverá aumentar entre 0,5°C e 1°C e as chuvas diminuirão entre 10% e 20% até 2040. Até o final do século, a temperatura do bioma Caatinga deverá aumentar entre 3,5°C e 4,5°C e a ocorrência de chuva diminuir entre 40% e 50%, acelerando o processo de desertificação (FAPESP, 2013).

As mudanças nos padrões de precipitação nas diferentes regiões do país, causadas pelas mudanças climáticas, terão impactos direto na agricultura, na geração e distribuição de energia e nos recursos hídricos, já que a água deve se tornar mais rara nas regiões Norte e Nordeste e mais abundantes no Sul e Sudeste.

No atual cenário das mudanças climáticas está havendo alterações nos padrões de produção agrícola, principalmente considerando a inevitável redução da água utilizada para irrigação, além do aumento das áreas em processo de desertificação. Neste contexto, como sugerido por Kavamura et al. (2013a), a utilização de micro-organismos tolerantes à seca e que sejam capazes de promover o crescimento e a proteção de plantas sob estresse hídrico, apresenta-se como uma alternativa para diminuir o impacto dessas mudanças no ambiente.

Dessa forma, o acesso ao microbioma da rizosfera de mandacaru nas condições

climáticas da Caatinga representa uma estratégia para a descoberta de micro-organismos e moléculas de potencial biotecnológico, além de elucidar questões relacionadas em como o microbioma suporta a vida do hospedeiro em condições extremas.

2.2 O bioma Caatinga

Na Caatinga, o clima é semiárido, quente e de baixa pluviosidade (média entre 250 e 800 mm anuais), com temperaturas médias anuais compreendidas entre 24°C e 27°C, sendo que na estação seca a temperatura do solo pode chegar até 60°C (SAMPAIO; RODAL, 2000). Segundo Giulietti et al. (2006) há uma grande variação na precipitação anual para a zona semiárida e costeira, oscilando respectivamente de 300 a 2000 mm.

Essas condições particulares são as responsáveis pela grande diversidade de tipos de vegetação que caracterizam o semiárido (GIULIETTI et al., 2006). A biodisponibilidade de água em ambientes áridos é primeiramente determinada pela precipitação e evaporação, mas também é influenciada pelo nível de solutos presentes no substrato (POINTING; BELNAP, 2012).

Uma característica muito peculiar da Caatinga é a existência de duas estações bem contrastantes durante o ano, o inverno e o verão. De acordo com Maia (2004), o inverno é caracterizado por ser a estação da chuva, ocorrendo de três a cinco meses, com chuvas irregulares, torrenciais e de pouca duração, e a época da seca, ou seja, o verão, praticamente sem chuvas e que dura em torno de sete a nove meses. As duas estações acentuam contrastes da Caatinga, um dos fenômenos mais interessantes desse bioma. Na seca ela se encontra despida, cinzenta e espinhosa, enquanto no período chuvoso apresenta um aspecto verde, encoberta de uma significativa quantidade de pequenas folhas (Figura 2).



Figura 2 - Transição entre o período seco e chuvoso na Caatinga, A) Caatinga no período seco e B) Caatinga no período chuvoso. Fonte: <http://www.acaatinga.org.br>

A Caatinga apresenta uma grande riqueza de ambientes e espécies, e boa parte dessa diversidade não é encontrada em nenhum outro bioma. A seca, a luminosidade e o calor característicos dessas áreas resultam em uma vegetação de savana estépica, espinhosa e decidual.

A vegetação é constituída por muitos exemplares da família Cactaceae. Estas plantas possuem mecanismos adaptativos e são consideradas xerófitas, sendo as que habitam áreas menos secas da Caatinga, denominadas hipoxerófilas e as de áreas muito secas, hiperxerófilas (SÁ et al., 2003).

As plantas e os animais da Caatinga apresentam propriedades diversas que lhes permitem viver nessas condições desfavoráveis. Além disso, o conjunto das interações entre eles é adaptado de maneira que as plantas, os animais e as suas relações, formem um bioma especial e único no planeta. Dessa maneira, observam-se inúmeras interações entre os seres vivos da Caatinga que permitem que o bioma total se mantenha e todos os seres que dele fazem parte possam viver, mesmo em condições desfavoráveis (extremas). Ainda conhecemos pouco sobre toda essa “rede de interações” na Caatinga, mas sabemos que, se interrompermos essa rede, a estabilidade do sistema diminui.

Nos últimos anos, as ações antrópicas degradadoras, tem intensificado as erosões e o aumento de déficit hídrico do solo, contribuindo para o processo de desertificação (TRIGUEIRO et al., 2009). Essa desertificação pode levar ao empobrecimento de ecossistemas áridos, semiáridos e subúmidos secos, ocasionando a redução da produtividade vegetal e aceleração da degradação do solo. No semiárido Nordeste, causas naturais e antrópicas, tem aumentado a desertificação em até 60% (BRASIL, 2004).

As mudanças climáticas que vêm acontecendo podem fazer com que essas regiões tornem-se ainda mais secas. Dos ecossistemas originais da Caatinga, 80% foram alterados, em especial por causa de desmatamentos e queimadas (NUNES et al., 2010).

2.3 A vegetação da Caatinga

A vegetação da Caatinga é constituída por diferentes padrões, que variam desde a estrutura de uma floresta, constituída de árvores, muitas vezes com espinhos, caducifólias e semicaducifólias, com sub-bosque de arbustos caducifólios e ervas anuais onde predominam principalmente as leguminosas, até as Caatingas semi-arbustivas, com predominância de Euforbiáceas, Bromeliáceas e Cactáceas.

As Cactácias podem ser encontradas no sudoeste dos Estados Unidos e México,

leste do Brasil e nos Andes Sul-Americanos (TORREZ-CORTÉS et al., 2012). Esse tipo de vegetação apresenta tais evoluções adaptativas: perda ou redução de folhas; transformação do córtex e medula em tecido próprio para o armazenamento de água e ramos laterais modificados em espinhos centrais e radiais (aréolas). O tronco pode ser cilíndrico ou colunar, com ou sem ramificações, segmentados ou não, podendo ainda serem globosos (PEREIRA et al., 2003).

Dentre as cactáceas, a tribo Cereeae possui grande representabilidade no Brasil, sendo distribuídas principalmente no Nordeste (CORTEZ, 2007). Podem ser arbustivos ou arbóreos, com troncos não segmentados, alongados ou globosos, estriados e com muitos espinhos. As flores nascem lateralmente, podendo ser noturnas ou diurnas e os frutos são carnudos (ANDERSON, 2001) (Figura 3).



Figura 3 - Flores e frutos laterais da espécie *Cereus jamacuru* (mandacaru). Foto; John Philip Medcraft

Na Caatinga, ocorrem cinquenta e oito espécies de cactáceas já descritas, das quais quarenta e duas são endêmicas. Entre elas, os principais gêneros são: mandacaru (*Cereus jamacuru*), xique-xique (*Pilosocereus gounellei*), coroa-de-frade (*Melocactus* sp) e palma (Tacinga) (ASSOCIAÇÃO CAATINGA) (Figura 4).

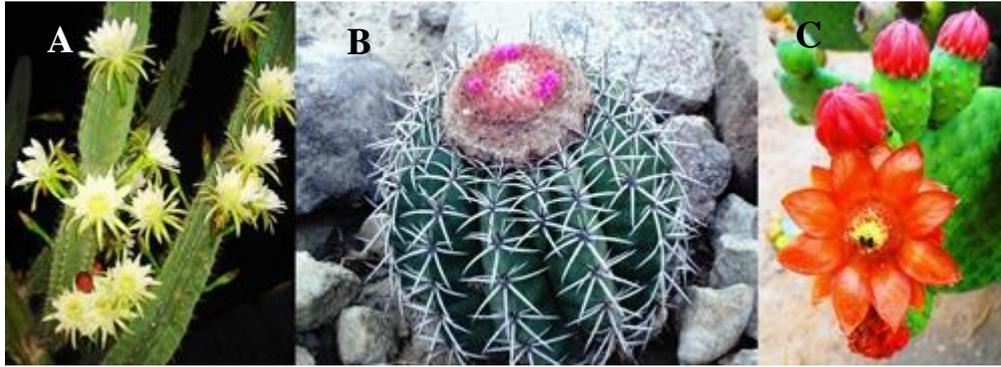


Figura 4 – Foto do mandacaru (A), coroa de frade (B) e palminha (C)

Fonte: <http://www.acaatinga.org.br>.

O *Cereus jamacaru*, popularmente conhecido como mandacaru, é um cacto característico da região semiárida do Brasil e extremamente resistente a longos períodos de seca. O xique-xique é encontrado em afloramentos rochosos e solos pedregosos, mais especificamente na Caatinga de lajedo (TAYLOR; ZAPPI, 2004). É uma espécie colunar e possui forma de candelabro, sendo de estatura baixa e por vezes podendo alcançar de 3 a 4 metros de altura (GORELICK, 2009) (Figura 5).



Figura 5 - Cacto *Pilosocereus gounellei* (xique-xique) (A e B). Observe o aspecto de candelabro. Foto; Jair Ferraz

De acordo com Barbosa (1998), o cacto coroa-de-frade ou também chamado de cabeça-de-frade possui caule globoso na forma de cone e pode chegar até 22 centímetros de altura, possuindo dez arestas com aréolas de espinhos dispostos em grupos de cinco a sete, com flores vermelhas e fruto rosado em forma de baga (Figura 6).



Figura 6 – Coroa-de-frade ou cabeça-de-frade. Foto: Willamy Galvão

Estima-se que os micro-organismos e invertebrados constituem quase 90% dos seres vivos na terra e desempenham um papel fundamental no funcionamento do ecossistema (LINS; ARAÚJO, 2011). Entretanto se conhece menos de 1% das bactérias e menos de 5% de fungos, se fazendo necessária a bioprospecção para o conhecimento da microbiota dos ecossistemas, com destaque atualmente para o bioma da Caatinga (PRADO, 2008).

2.4 O mandacaru

Uma das espécies vegetais abundantes e mais importantes da Caatinga é o mandacaru, que se espalha nas áreas mais secas da região semiárida do Nordeste, em solos rasos, em cima de rochas e se multiplica regularmente, cobrindo extensas áreas da Caatinga (LIMA, 1996; MAIA, 2004). Sua distribuição ocorre principalmente nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Bahia.

Essa planta perde pouca água devido à forma do seu caule, que é grosso e elipsóide, por ser desprovido de folhas, reduzindo a superfície de evaporação do vegetal e por possuir uma cutícula espessa que reveste os ramos, tornando-a capaz de armazenar uma grande quantidade de água no seu interior. Suas raízes também são importantes para o aproveitamento de água, pois absorvem com facilidade todo o recurso hídrico à sua volta. Em função disso, mantém-se verde e bem adaptado ao clima em que vive durante as estiagens, diferentemente das outras plantas. O tronco do mandacaru possui de quatro a seis costelas chanfradas, dois a quatro espinhos centrais, podendo medir de 8 a 20 centímetros de comprimento e de cinco a sete espinhos radiais de 1,5 centímetros de comprimento (ANDERSON, 2001).

O mandacaru é de grande importância para a sustentabilidade e conservação da biodiversidade da Caatinga, pois seus frutos são alimentos para pássaros e animais silvestres, e em períodos de seca, esta cactácea é largamente utilizada pelos agricultores para alimentação dos animais (CAVALCANTE; RESENDE, 2007) e para suportes forrageiros dos ruminantes (SILVA et al., 2005). Segundo Agra et al. (2008), suas raízes e o seu caule também são utilizados para fins medicinais, visto que melhoram males do coração, doenças respiratórias e renais.

2.5 Interações entre micro-organismos e plantas

Os benefícios econômicos estão relacionados com a descoberta de micro-organismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos para: novos antibióticos, produtos químicos, enzimas e polímeros para aplicações industriais e tecnológicas, biorremediação, biolixiviação, otimização da capacidade microbiana para a fertilização dos solos e despoluição das águas, biosensores, controle biológico de pragas e vetores, indústria alimentícia, entre outros (CANHOS; MANFIO, 2012).

O sucesso dos processos biotecnológicos está diretamente relacionado com a diversidade dos micro-organismos e das moléculas que eles produzem como resultado do metabolismo primário e secundário, bem como com a conservação dos recursos genéticos que eles fornecem (OLIVEIRA et al., 2009).

Muitos estudos sobre as interações entre plantas e micro-organismos da rizosfera concentram-se em patógenos, rizóbios simbióticos e fungos micorrízicos, não apresentando nenhuma evidência que outros grupos de micro-organismos possam afetar o crescimento e até mesmo a sobrevivência das plantas.

Algumas pesquisas mostram que as plantas podem recrutar ativamente micro-organismos benéficos do solo em sua rizosfera para neutralizar ataques de patógenos ou ainda na ocorrência de doenças do solo, uma propriedade conferida pela microbiota com mecanismos ainda desconhecidos (MENDES et al., 2011).

Conforme Brasil Júnior et al. (2002) uma mesma população microbiana que participa de uma mesma transformação bioquímica de compostos do meio ambiente, é caracterizado como um grupo funcional. Os grupos funcionais se concentram no solo da rizosfera, podendo promover ou inibir o crescimento da planta de acordo com as condições ambientais.

A planta pode modificar as características químicas do solo nas regiões próximas das raízes, podendo estas, ocorrerem através dos fragmentos descascados da superfície das raízes e dos exsudatos radiculares, enriquecendo o solo com uma variedade de compostos

orgânicos modificando a atmosfera radicular, a absorção de nutrientes, a concentração de sais e até mesmo o consumo de água, reduzindo assim a umidade, entre outros (NIELSEN; ELSAS, 2001).

Diversas bactérias que vivem na rizosfera (rizobactérias) tem a capacidade de promover o crescimento de plantas. Essas bactérias promovem o crescimento das plantas por meio de fitoestimulação e/ou biofertilização (KUMAR et al., 2011). Este efeito é atribuído à produção de substâncias reguladoras de crescimento, à produção de antibióticos e sideróforos, mineralização e solubilização de nutrientes como o fósforo e fixação de nitrogênio (HARDOIM et al., 2008).

As rizobactérias promotoras de crescimento podem ser divididas de acordo com o seu grupo funcional, sendo estes: bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB), bactérias biocontroladoras promotoras do crescimento de plantas (Biocontrol-PGPB) e bactérias reguladoras de estresse em plantas (PSHR) (CASSÁN et al., 2009).

Os mecanismos utilizados pelas plantas podem ser diretos ou indiretos (SARAF et al., 2011). Os mecanismos diretos afetam diretamente o metabolismo vegetal, sendo alguns: produção de fitohormônios, solubilização de fosfatos, fixação de nitrogênio atmosférico e produção de sideróforos (KAVAMURA, 2012). Os mecanismos indiretos requerem a participação de processos metabólicos defensivos da planta, como: antibiose pela produção de voláteis, competição, parasitismo com a produção de enzimas, indução de resistência (PODILE; KISHORE, 2007) entre outros.

Dentre as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, as do gênero *Pseudomonas* spp. são as mais estudadas, principalmente, devido à sua grande capacidade de suprimir patógenos de solo, de ocorrerem de forma natural e com população elevada, de serem nutricionalmente versáteis e possuírem habilidade de crescer em diversas condições ambientais, de produzirem uma grande variedade de antibióticos, sideróforos e hormônios de crescimento vegetal.

As rizobactérias do grupo fluorescente (*P. fluorescens-putida*) possuem um metabolismo versátil, podendo utilizar vários substratos liberados pelas raízes e também moléculas xenobióticas que atingem a rizosfera (MELO, 2001; DANTAS et al., 2009).

Estudos evidenciaram alterações nas populações bacterianas na rizosfera de milho, trigo, feijão e soja promovida por operações de uso e manejo do solo, aumentando as densidades das populações de actinobactérias e de bactérias resistentes a antibióticos (BALDANI et al., 1982; PEREIRA et al., 1999). Assim sendo, estes micro-organismos podem ser utilizados para biofertilização, fitoestimulação e biocontrole (BLOEMBERG;

LUGTEMBERG, 2001) com aplicações voltadas para a agricultura e recuperação ambiental (LUCY et al., 2004).

Sabe-se que os micro-organismos associados às raízes das plantas que crescem nas condições de alta temperatura e baixa disponibilidade de água também desenvolveram mecanismos de adaptação para sobrevivência às condições adversas. Porém ainda existe pouco conhecimento sobre a microbiota da rizosfera de plantas de regiões extremas (TORRÉS-CORTÉS et al., 2012).

2.6 Micro-organismos de solo em regiões secas

Os organismos com habilidades de suportar condições que do ponto de vista humano são extremas, foram primeiramente observados e denominados de extremófilos por MacElroy em 1974. A maioria dos extremófilos são micro-organismos e atualmente, existem várias definições de acordo com a fisiologia de cada grupo.

Sendo assim, há aqueles que crescem em ambientes com pH elevado (alcalifílicos); em materiais rochosos (endolíticos); em altas concentrações salinas (halofílicos); há os que dependem de poucos nutrientes para seu crescimento (oligotróficos); com relação à temperatura, há aqueles em que a temperatura ideal de crescimento é menor ou igual a 15°C (psicrofílicos) ou maior ou igual a 80°C (hipertermofílicos); os que toleram altos níveis de metais pesados (metalotolerantes) e os micro-organismos que conseguem crescer em ambientes com baixa disponibilidade de água (xerofílicos ou xerotolerantes) (HORIKOSHI, 2007).

Os xerofílicos sobrevivem com apenas uma baixa atividade de água, enquanto os xerotolerantes crescem até na ausência de água (GRANT, 2004). Segundo Manzoni et al. (2012), os fungos são mais xerotolerantes quando comparados com bactérias e por isso são bem estudados nessa característica.

Ainda há poucos estudos relacionando os micro-organismos existentes em locais áridos e semiáridos, assim como micro-organismos associados a plantas deste ambiente. Mas com o atual cenário do aquecimento mundial vem crescendo o interesse por este tema nos últimos anos. Os trabalhos que buscam a diversidade destes ambientes, focam principalmente no uso de técnicas moleculares, como bibliotecas de clones do gene 16S rRNA (CHANAL et al., 2006; BACHAR et al., 2010) e mais recentemente o uso de técnicas de sequenciamento em larga escala (NEILSON et al., 2012).

2.7 O solo e o microbioma da rizosfera

O solo é um local de grande número e variedade de interações biológicas, incluindo competição, predação, parasitismo, comensalismo e mutualismo. As interações biológicas têm um papel fundamental no funcionamento do solo, o que lhe confere sua capacidade de sustentar a vida tanto das plantas como dos animais e outros seres que vivem no solo (BROWN, 2002).

O solo é considerado depósito de atividade microbiana, apesar de o espaço ocupado por micro-organismos vivos ser estimado em menos de 5% do espaço total. Portanto, a predominância de atividade microbiana é encontrada em *hot spots*, por exemplo, agregados com matéria orgânica acumulada e a rizosfera (PINTON et al., 2001).

Os micro-organismos presentes no solo são de suma importância para o funcionamento dos ecossistemas, sendo fundamentais nos processos de fragmentação e decomposição da matéria orgânica e na disponibilização de nutrientes do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

Estes, também têm papel importante na ciclagem de nutrientes (MARSCHNER et al., 2004) e na manutenção da fertilidade, além de desempenhar funções no controle biológico de doenças e pragas, biorremediação de poluentes (BURD et al., 2000) e promover o crescimento de plantas (GLICK, 1995). Devido essas características, para obtenção de uma boa qualidade do solo, é importante manter a diversidade microbiana (BORNEMAN et al., 1996).

A estrutura dos solos se modifica de acordo com a profundidade dos mesmos. Três horizontes principais (A, B e C) são reconhecidos em um perfil de solo típico. O horizonte A é a camada superior, onde se localiza a maior parte da matéria orgânica e encontra-se a maioria dos organismos vivos, o horizonte B ou subsolo é a zona de infiltração e de acumulação dos materiais provenientes do horizonte superior e, o horizonte C é a rocha original da qual o solo derivado (VORONEY, 2007).

O tipo de solo parece ser o fator primário na determinação da composição das espécies microbianas e/ou sua função (COLARES, 2010). Em solo árido, Kuske et al. (2002) observaram que a camada superior do solo (até 10 cm) contém significativamente mais bactérias do que em uma profundidade de aproximadamente 25 centímetros. Um grama de solo pode conter em torno de 10.000 espécies de bactérias (TORSVICK; ØVREÅS, 2002). De acordo com isto, pode-se dizer que a maior fonte de genes do planeta reside na fração microbiana da biodiversidade.

A atividade dos micro-organismos está baseada na diversidade metabólica e

adaptabilidade genética, tornando-os uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável. De acordo com Tiedje et al. (2001), estudos com a diversidade microbiana do solo têm tido um grande avanço das técnicas moleculares. Dessa forma, as ferramentas moleculares e tecnologias baseadas em sequências gênicas vêm revelando novas perspectivas sobre a diversidade dos micro-organismos (CANNAVAN, 2007). O principal argumento a favor dessas técnicas ocorre pelo fato de que a diversidade microbiana permanece naturalmente inalterada ao longo do ano (JOHNSON et al., 2003).

A rizosfera é definida como a porção do solo influenciada pelas raízes, sendo um ambiente dinâmico em que muitos parâmetros influenciam a estrutura de atividades e população das comunidades microbianas (RASCHE et al., 2006), sendo esta um nicho explorado por uma grande variedade de bactérias. É considerado um habitat mutável, já que a sua composição e a sua estrutura são influenciáveis pelo ciclo vegetativo da planta (DANTAS, 2009).

A diversidade e a estrutura de micro-organismos na rizosfera são influenciadas pelo tipo de planta e de solo (LATOURET et al., 1996). Além desses fatores, a espécie e idade da planta, quantidade e tipo de exsudatos radiculares, as condições do solo e do ambiente também influenciam a composição da rizosfera microbiana (ROVIERA, 1995; MARSCHNER et al., 2004).

Devido compostos secretados pelas raízes, como íons, enzimas, mucilagem, entre outros, a rizosfera possui intensa atividade microbiana (BAIS et al., 2006). Bactérias colonizadoras de rizosfera possuem um eficiente metabolismo para assimilar os compostos orgânicos presentes em exsudatos das raízes (BARRAQUIO, 2000).

A influência das raízes sobre os micro-organismos do solo é avaliada através da relação entre as densidades das populações microbianas, em diferentes distâncias da sua superfície e do solo adjacente à raiz. Desta forma, o número de micro-organismos na rizosfera normalmente é maior do que no solo livre de raízes (PELCZAR et al., 1997). Como as raízes se movem através do solo, suas características bióticas físicas e químicas são afetadas, e essas mudanças são acompanhadas por alterações na atividade da comunidade microbiana (DEANGELIS et al., 2009).

O movimento das raízes através do solo cria gradientes ambientais dinâmicos que são constantemente reiterados com o novo crescimento da raiz, como a introdução de carbono, nutrientes e água, além de criar depósitos de compostos antimicrobianos e hormônios (HAWKES et al., 2007) através de escalas temporais que podem durar de horas a

dias (DEANGELIS et al., 2009). A resposta para as alterações induzidas pela raiz é rápida e aumentam a nutrição e reprodução dos micro-organismos (HERMAN et al., 2006). Esta atividade microbiana reforçada pode acelerar a ciclagem de nutrientes, bem como outras funções, como patogênese (DEANGELIS et al., 2009).

Mudanças nas propriedades químicas da rizosfera induzidas pelas raízes podem ocorrer de várias maneiras, podendo ser: alteração na concentração iônica (esgotamento ou acúmulo) como consequência direta de taxas diferenciadas de absorção de água e nutrientes; mudanças de pH em resposta a fontes de nitrogênio e deficiência de fósforo e ferro; exsudação de compostos de baixo peso molecular para melhorar a mobilização de nutrientes; excreção de enzimas como fosfatases, para a liberação de nutrientes minerais e, alterações no potencial redox do solo rizosférico (GAIAD et al., 2011).

Moreira e Siqueira (2002) consideram a rizosfera como sendo o “paraíso dos micro-organismos”, devido a espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus* apresentarem tempos de geração menores na rizosfera do que no solo não rizosférico, pelo fato de haver maior disponibilidade de substratos.

As atividades das raízes criam um ambiente favorável para o desenvolvimento de populações fúngicas, entretanto, o efeito rizosférico sobre estas parecem ser mais limitados do que para as populações bacterianas, devido à proximidade das raízes resultarem na germinação dos esporos dormentes, que são predominantes no solo não rizosférico (DANTAS, 2009).

Os micro-organismos rizosféricos podem se dividir em oportunistas e estrategistas. Os oportunistas são pequenos, de crescimento rápido, têm alta capacidade competitiva e se localizam principalmente nas raízes mais novas. Os estrategistas são maiores, de crescimento mais lento e têm alta longevidade e predominam nas raízes mais velhas. Eles podem se dividir ainda em saprófitas, simbiontes e patógenos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002).

De acordo com Melo (2001), os micro-organismos do solo podem ainda ser divididos com base na relação do efeito que causam nas plantas, podendo estes serem benéficos, prejudiciais ou neutros. Os micro-organismos benéficos podem influenciar o crescimento das plantas através do aumento da disponibilidade de nutrientes minerais, da produção de hormônios de crescimento e da supressão de microrganismos nocivos da rizosfera.

2.8 Metagenômica da rizosfera

A falta de conhecimento sobre a diversidade microbiana deve-se em grande parte aos

métodos utilizados para o isolamento e cultivo dos micro-organismos em laboratório (RANJARD et al., 2000). Uma fração, em torno de 0,1% ou no máximo 10,0% do total da população dos organismos é cultivável através de técnicas microbiológicas tradicionais, deixando uma vasta proporção dessa biota desconhecida (AMANN et al., 1995).

Novas abordagens de trabalho envolvendo metodologias de biologia molecular e bioinformática permitem a prospecção de informações a partir de dados genômicos em bases de dados e a análise de micro-organismos sem a necessidade de isolamento e cultivo, a partir da clonagem direta de DNA de amostras ambientais (metagenoma) (OLIVEIRA et al., 2009).

O termo metagenoma é derivado do conceito estatístico de meta-análise (processo de combinar estatisticamente análises separadas) e genômica (análise ampla do material genético de um organismo) (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003). Geralmente, os objetivos dos projetos metagenômica incluem: i) identificar genes funcionais e/ou novas vias metabólicas, ii) estimar a diversidade microbiana, iii) compreender a dinâmica da população de uma comunidade inteira, iv) montar o genoma de um organismo não cultivado e, v) identificar biomarcadores para ambientes específicos (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2008). A metagenômica envolve a clonagem de fragmentos grandes de DNA obtido a partir de amostras ambientais, em vetores tipo BAC, fosmídeos ou cosmídeos, e análise das bibliotecas em busca de uma nova expressão fenotípica na linhagem hospedeira de *E. coli* (HANDELSMAN et al., 1998; RONDON et al., 1999a; RONDON et al., 2000).

Ao contrário da genômica, que tem como foco o sequenciamento do DNA de um organismo, a metagenômica envolve o acesso à sequência de uma comunidade de organismos de um determinado ambiente, além de análises de DNA ambiental (DANTAS, 2009).

Diversos estudos têm confirmado que o acesso ao patrimônio genético das espécies através da abordagem metagenômica oferece uma fonte quase ilimitada para encontrar novos genes os quais codificam produtos gênicos biotecnologicamente relevantes ou responsáveis por vias metabólicas de ciclagem de nutrientes do solo (ELENDE et al., 2006; LEE et al., 2007; IBRAHIM et al., 2007; KIM et al., 2008; DEANGELIS et al., 2009).

Assim, considerando a grande importância dos micro-organismos em todos os sistemas biológicos e seu grande potencial biotecnológico, torna-se essencial a utilização de métodos que permitam acessar a riqueza de informações contida no metagenoma dos diferentes biomas e assim estudar as interações de plantas com a microbioma presente na rizosfera de um ambiente tão desfavorável como o semiárido.

A metagenômica tem se tornado uma tecnologia básica usada para estudos de

ecologia e evolução de micro-organismos (HUGENHOLTZ; TYSON, 2008).

Existem outros métodos de estudo para micro-organismos objetivando determinar a diversidade microbiana tanto de ambientes aquáticos quanto terrestres. Os métodos podem ser baseados na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e caracterização por microssatélites (KIRK et al., 2004).

Antigamente, a maioria dos micro-organismos de ambientes naturais era inacessível à investigação científica até o surgimento da análise filogenética molecular, um método que utiliza a heterogeneidade dentro da sequência do RNA ribossômico (rRNA) para inferir relações evolutivas (LILES et al., 2003).

Os RNAs ribossomais estão entre as macromoléculas mais conservadas em todos os sistemas vivos. Grandes porções de genes do rRNA possuem sequências conservadas que podem ser utilizadas para medir a distância evolutiva mesmo entre organismos mais distantemente relacionados, já que diferenças na sequência de nucleotídeos do rRNA são índices de mudanças evolutivas (DANTAS, 2009).

As bactérias possuem três subunidades do rRNAs, o 5S (~120 nucleotídeos), o 16S (~1600 nucleotídeos) e o 23S (~3000 nucleotídeos). Os rRNAs 5S e 16S têm sido os mais utilizados para a maioria das caracterizações filogenéticas baseadas na análise do rRNA, principalmente por razões técnicas e históricas. O rRNA 5S, por ser relativamente pequeno, foi amplamente utilizado no final dos anos 60 para análise de sequências. Todavia, a escassez de regiões de variabilidade no rRNA 5S limitou a sua utilização.

Para as bactérias e arqueias, o rRNA 16S é usado para determinar as relações filogenéticas (ATLAS; BARTHA, 1998). De acordo com Woese et al. (1990), estudos relataram que o rRNA 16S é um excelente cronômetro molecular, uma vez que este é encontrado em todos os organismos, possui longas regiões altamente conservadas ao mesmo tempo que tem regiões suficientemente variáveis para determinar relações filogenéticas próximas e não estão sujeitas a sofrer mudanças rápidas de sequência pela sua função central na expressão de genes.

A diversidade de micro-organismos está relacionada com o tempo de residência da água, taxa de crescimento microbiano e características ambientais. Estudos filogenéticos evidenciaram que populações de bactérias e arqueias são complexas, cosmopolitas e geralmente consistem em membros não cultiváveis ou não identificados (PACE, 1997).

Antes o conhecimento sobre a ecologia microbiana em ambientes naturais era limitado por se basearem em técnicas clássicas de Microbiologia. Entretanto, os recentes avanços em técnicas de biologia molecular, juntamente com os constantes desenvolvimentos

em tecnologias de informação e computadores, têm transformado os estudos de Ecologia Molecular Microbiana e atualmente, estudos sobre comunidades naturais são possíveis sem a necessidade de técnicas baseadas em cultivo (NISHIO et al., 2010). As novas técnicas moleculares permitem a realização de estudos sobre expressão gênica, assim como um melhor entendimento sobre as interações entre comunidades microbianas no ecossistema.

3 OBJETIVOS

No atual contexto de mudanças climáticas e considerando o constante aumento dos índices de desertificação do semiárido nordestino, destaca-se o mandacaru, planta que sobrevive às altas temperaturas e a pouca disponibilidade de água da Caatinga. Essas condições fizeram com que o mandacaru desenvolvesse muitas adaptações morfológicas estruturais que contribuem para sua sobrevivência, porém, o conhecimento do papel dos micro-organismos presente na rizosfera do mandacaru frente às condições adversas é escasso. Assim, objetivo deste trabalho foi avaliar o microbioma da rizosfera de mandacaru para identificar grupos microbianos e funções mais abundantes nas estações de seca e chuvosa.

3.1 Objetivos específicos

a) Identificação da composição taxonômica da comunidade microbiana da rizosfera de mandacaru por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA nas estações seca e chuvosa da Caatinga.

b) Avaliação da estrutura e funções da comunidade microbiana da rizosfera de mandacaru nas duas estações da Caatinga (seca e chuvosa) por meio do sequenciamento *shotgun* (DNA total).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

Uma visão geral da metodologia adotada nesse trabalho é apresentada na Figura 7, a qual mostra de maneira resumida os períodos de amostragem da rizosfera (estação seca e chuvosa), bem como realizado o processamento das amostras. Três plantas foram selecionadas e marcadas, sendo estas utilizadas em ambas estações analisadas, exatamente nos mesmos pontos do sistema radicular de cada uma das plantas de mandacaru. Foram realizadas três extrações independentes de DNA a partir da amostra composta de rizosfera proveniente de cada planta. As três extrações foram posteriormente unidas, totalizando seis amostras de DNA, três plantas amostradas no período da chuva e as mesmas plantas amostradas no período seco. O material obtido foi utilizado para construção de seis bibliotecas (16S rRNA e DNA total), sendo estas, posteriormente submetidas ao sequenciamento no PGM Ion Torrent (*Life Technologies*) utilizando-se o Ion chip 316.

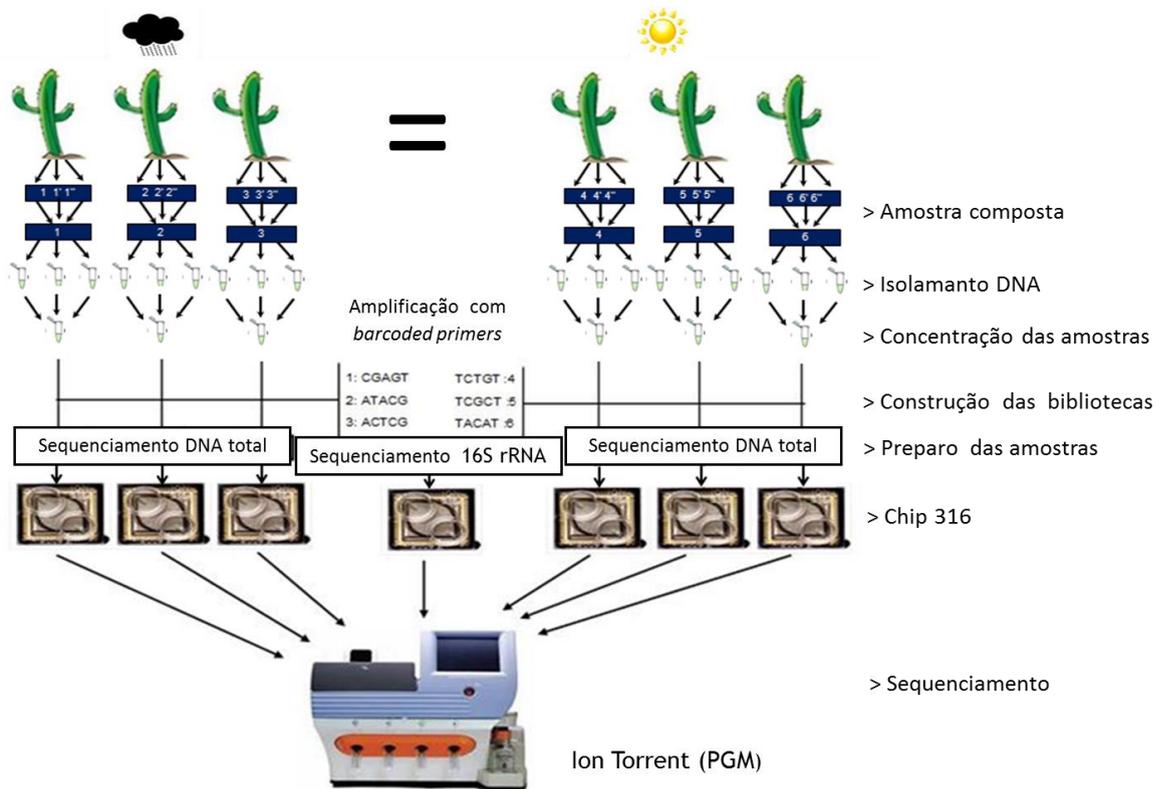


Figura 7 - Esquema da metodologia realizada para a coleta e o processamento de amostras de rizosfera de mandacaru. O período seco é representado pelo sol e o período chuvoso pela nuvem. O sinal de “igual” significa que foram amostradas as mesmas plantas nos dois períodos. Ao centro, os *barcodes* (tag) adicionados em cada amostra para identificação das bibliotecas de 16S rRNA e, por fim os chips 316 utilizados no PGM Ion Torrent

4.2 Local de estudo na Caatinga

A área de estudo do presente trabalho compreende a cidade de Petrolina em Pernambuco. O local de amostragem foi selecionado após observar a região da Caatinga e perceber a degradação causada pela seca e pela ação antrópica. Foi então escolhida uma área próxima da sede da Embrapa Semiárido (Petrolina), pois esta é uma das poucas áreas da Caatinga que ainda é conservada, possui características homogêneas, vegetação nativa da região e sem influência do homem. As plantas de mandacaru avaliadas estão em uma área preservada e dispostas num raio de menos de 10 metros uma das outras. As coordenadas geográficas de cada ponto amostrado são: S:09° 04'27.7''/W:040° 19'48.3''; S:09° 04'27.8''/W:040° 19'48.5'' e S:09° 04'28.0''/W:040° 19'48.2''. Uma visão geral da região amostrada pode ser visualizada na Figura 8.



Figura 8 – Imagem de satélite focando na estação da Embrapa Semiárido, Petrolina (PE) e na área da Caatinga onde foram realizadas as coletas (Ponto de coleta)

4.3 Coleta das amostras de solo rizosférico

Inicialmente, três plantas de *Cereus jamacaru* (mandacaru) foram selecionadas mantendo uma distância de 5 a 10 m entre elas, e cada uma no momento da primeira amostragem foi marcada com etiquetas de identificação e estacas nos três pontos da rizosfera de cada planta escolhida conforme pode ser observado na Figura 9.



Figura 9 – Imagens das coletas nas três plantas selecionadas, onde A, B e C representam a coleta do período chuvoso e D, E e F representam a coleta no período de seca. Nas letras G, H e I, pode ser observado o termômetro para conferir a temperatura do solo e a marcação dos três pontos de coleta de cada planta selecionada e cada ponto exemplifica

Em cada uma das três plantas de mandacaru foi feita uma amostragem composta coletada a partir de três pontos distintos da rizosfera, com aproximadamente 15 centímetros de raio em relação à planta e até 10 cm de profundidade. As três porções da rizosfera de cada planta foram homogêneas dentro de sacos plásticos e armazenadas, parte em tubos de 50 mL vedados para análise de umidade relativa e extração de DNA e parte em sacos plásticos para análises físico-químicas.

As duas amostragens (09/11/2011 e 03/05/2012) foram realizadas exatamente nos mesmos pontos da rizosfera das três plantas, inicialmente marcados com as estacas. Os dados de temperatura do solo e do ar, horário da coleta, condição do tempo, altura da planta, elevação e localização do terreno foram registrados nas duas coletas, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados registrados e observados no momento de cada coleta nas duas estações (chuva e seca)

Pontos	Data	Hora (min.)	Temp. (°C)		Clima	Altitude (m)	Altura (m)	Coordenadas	
			Ar	Solo				S	W
R 1	09/11/11	08h15	24	25	Nub.	383	3.80	09° 04'27.7''	040° 19'48.3''
R 2	09/11/11	08h45	24,5	25,5	Nub.	382	4.80	09° 04'27.8''	040° 19'48.5''
R 3	09/11/11	09h05	25	26	Nub.	383	4.50	09° 04'28.0''	040° 19'48.2''
D 1	03/05/12	10h50	34	36	Sol	383	4.15	09° 04'27.7''	040° 19'48.3''
D 2	03/05/12	09h50	33	35	Sol	382	5.05	09° 04'27.8''	040° 19'48.5''
D 3	03/05/12	10h00	31	34	Sol	383	4.80	09° 04'28.0''	040° 19'48.2''

Os pontos nomeados como R1, R2 e R3 representam a coleta do período chuvoso (*Rainy*) e os pontos D1, D2 e D3 representam a coleta do período da seca (*Drought*). A altura corresponde a altura de cada planta no momento das coletas

4.4 Análise físico-química das amostras de solo

A porção de rizosfera homogeneizada destinada para as análises físico-químicas, foram encaminhadas para Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo LTDA (ICASA), Campinas, São Paulo, onde foram realizadas as análises, incluindo pH, conteúdo de matéria orgânica, macro e micro nutrientes. O material para essas análises foram recolhidos nos dois momentos da coleta (chuva e seca).

No Laboratório de Microbiologia Ambiental (Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP) foi realizada a análise da umidade relativa das amostras por meio da técnica de pesagem até peso constante. Também foram realizadas análises medindo a concentração de nitrogênio e carbono no Laboratório de Solo e Água da mesma estação Embrapa citada acima.

4.5 Extração de DNA total da rizosfera

O material amostrado foi armazenado à temperatura ambiente em caixa térmica e transportado para o Laboratório, onde a extração do DNA metagenômico das amostras de solo rizosférico de mandacaru foram realizadas de acordo com a metodologia utilizada por Mendes et al. (2011) e com o kit comercial *Power Soil™ DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories, EUA) conforme as recomendações do fabricante a partir de 0,25 g de rizosfera.

A quantidade e qualidade do isolamento do DNA foi verificada primeiramente em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TBE 1X; 90 V por 45 min.. Após a eletroforese, o gel foi banhado em solução de brometo de etídio ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) para corar o gel e tornar visível as bandas de DNA quando expostas a luz ultravioleta. Após, o gel foi fotografado e o DNA restante foi armazenado no ultrafreezer (-80°C) até as próximas etapas.

4.6 Preparo das bibliotecas

4.6.1 Biblioteca do gene 16S rRNA

A construção da biblioteca de *amplicons* do gene 16S rRNA de *Bacteria* e sequenciamento foi conduzida a partir do DNA já extraído anteriormente, onde as seis amostras de rizosfera de mandacaru, do período chuvoso e de seca, foram amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores 967F (CAA CGC GAA GAA CCT TAC C) e 1046R (CGA CAG CCA TGC ANC ACC T) flanqueadores da região V6 do gene 16S rRNA (SOGIN et al., 2006). Porém, o *primer forward* foi modificado pela adição de um adaptador PGM *sequencing* e um *tag* de identificação (*barcode*) composto por cinco pares de bases diferentes para cada amostra que serviu para identificar a origem de cada uma das sequências.

Cada biblioteca de *amplicon* foi gerada por meio da reação de amplificação em solução contendo 5,0 μL de tampão da enzima Dream Taq; 1,0 μL de dNTP (2,5 mM); 0,5 μL de cada oligonucleotídeo iniciador; 1,0 μL de Dream Taq polymerase; 1 μL de DNA metagenômico de cada amostra e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para completar um volume final de 49 μL . Após, cada uma das seis bibliotecas foi dividida em duas por motivos de volume, e então, realizado duas reações de amplificação no termociclador (Applied Biosystems) seguindo as condições a seguir: desnaturação inicial a 94°C por 5 min; 30 ciclos de 94°C por 30 s, 57°C por 45 s e 72°C por 1 min; extensão final de 10 min a 72°C s (SOGIN et al., 2006).

Para conferir a qualidade das amostras foi realizada uma eletroforese com gel de agarose 1,5% (p/v) e posteriormente corado com solução de brometo de etídio ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) e

fotografado. As duas reações de cada amostra foram unidas novamente para a etapa de purificação, onde os 50 µl de cada biblioteca foi purificado utilizando 90 µl de Agencourt® (AMPure® XP *Reagent*) e estante magnética, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante Life Technologies – *Ion Amplicon Library Preparation (Purify the Amplicon Libraries)*.

Após a purificação das bibliotecas, a quantificação foi realizada por meio do NanoDrop (Thermo Scientific) e do Qubit® (dsDNA Assay kit, 500 assays) e a concentração das mesmas foram ajustadas e preparado um *pool* equimolar com a concentração final de 26 pM, onde tinha a mesma concentração de cada amostra e então, 18 µl foram utilizados para a reação de em-PCR (etapa de reação em cadeia da polimerase em emulsão (PCR de emulsão)).

4.6.2 Biblioteca de DNA total

Antes do preparo das bibliotecas de DNA total, o material que estava armazenado no ultrafreezer (-80°C) foi checado no NanoDrop (*Thermo Fisher Scientific, USA*) e por qPCR tempo real para confirmar a integridade e confirmar a concentração do material genético de cada amostra. Então esse material (DNA) foi fragmentado com o kit enzimático (*Ion Shear*) para obter fragmentos com tamanhos aproximados de 200 pb. Posteriormente, por meio de um gel de agarose, foram selecionados os fragmentos de 200 pb e utilizado kits de quantificação do Ion Torrent a fim de estabelecer a concentração real do DNA total fragmentado para seguir com a etapa de PCR de emulsão.

4.7 PCR de emulsão (em-PCR)

Tanto as bibliotecas do gene 16S rRNA como as bibliotecas de DNA total passaram pela reação de em-PCR (etapa de reação em cadeia da polimerase em emulsão (PCR de emulsão)) antes do sequenciamento. Onde, estas bibliotecas de *amplicons* e DNA total foram ligadas a esferas (*Ion Sphere*) de acordo com o protocolo fornecido pela Life Technologies (Ion PGM™ 200 Xpress™ *Template Kit*). Essa união de bibliotecas (sequências) com esferas ocorre em um ambiente microfluídico onde os reagentes ficam limitados ao interior de micelas da emulsão. Desta forma, ocorre a reação de amplificação dos fragmentos de DNA ligados às esferas revestidas por streptavidina pelo adaptador B (biotina). Apenas as esferas que apresentarem um, e somente um, fragmento de DNA serão capazes de gerar sequências. Então após a amplificação é necessário recuperar as esferas contendo os produtos de amplificação (*haired* esferas). Para tanto é realizada uma quebra da emulsão que consiste na retirada do óleo emulsificado.

Após essa quebra foi realizado um enriquecimento (*Enrichment*), onde as esferas recuperadas podem ser contadas (utilizando contador de partículas) no início e após o procedimento de enriquecimento. Nesta etapa são eliminadas as esferas que falharam na amplificação e que, portanto, não contém fragmentos do gene 16S ou de DNA amplificado ligado à superfície.

4.8 Sequenciamento

A qualidade da amplificação foi confirmada em gel de agarose 2,0% (p/v) (Figura 11). Os produtos das duas PCRs foram unidos e utilizadas para purificação de 50 µl de cada biblioteca utilizando 90 µl de Agencourt® AMPure® XP Reagent e estante magnética, de acordo com protocolo fornecido por *Life Technologies – Ion Amplicon Library Preparation (Purify the amplicon libraries)* (www.iontorrent.com).

Após realizada a construção das bibliotecas (16S rRNA e DNA total) e enriquecimento, foi feito o preparo e o carregamento das amostras nos chips por meio das esferas (*Ion Sphere*). Cada biblioteca de DNA total foi adicionada em um Ion chip 316, totalizando 6 chips, enquanto as bibliotecas de 16S rRNA foram unidas e adicionadas em apenas um Ion chip 316. Por fim, o sequenciamento de segunda geração foi realizado de acordo com as recomendações da Life Technologies utilizando o kit *Ion Sequencing Kit User Guide* v2.0, onde os chips foram adicionados ao PGM Ion Torrent para os sequenciamentos. Nesses sequenciamentos, foi utilizado Ion chip 316 e kits com capacidade de obtenção de fragmentos de até 200 pb e um volume total de informação de até 10 Mb com precisão superior a 99,0%.

4.9 Análise dos dados e anotações

4.9.1 Dados de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Os dados das amostras do sequenciamento 16S foram baixados do sequenciador PGM Ion Torrent, passaram primeiramente por uma limpeza e um controle de qualidade que foram realizados na plataforma Galaxy (<https://main.g2.bx.psu.edu/root>), onde os dados obtidos no sequenciador PGM foram convertidos em sequência no formato Fast33. A plataforma Galaxy utiliza este formato para uniformizar os dados e as subsequentes análises (BLANKENBERG et al., 2010).

Os comandos “FastQ groomer convert” e “FastQ quality trimmer by sliding window” foram executados para avaliação das sequências e para realizarem um filtro de qualidade, permitindo assim, gerar um gráfico de qualidade das sequências pelo comando “FastQC: read QC reports”. Para retirar os *primers forward* e *reverse* das sequências, foi executado o comando “Clip adapter sequences”, onde foi informada a sequência reversa complementar ao *primer reverse*.

Para diferenciar as seis amostras que estavam no mesmo arquivo, foi executado o comando “FASTQ to FASTA coverter”, que transforma as sequências no formato.fasta. Neste momento foi inserido no Galaxy um arquivo (.txt) com as sequências de *barcodes* utilizadas no sequenciamento, por meio do comando “Barcode splitter”. Então foi feito o *download* dos arquivos .fasta, separados anteriormente e inseridos novamente na plataforma Galaxy para retirar os *primers forward* e os *tags* por meio do comando “Trim sequences”. O comando “Filter sequences by length” foi utilizado para filtrar *reads* com um tamanho mínimo de 50 bases por sequência, que serve para eliminar sequências muito curtas e padronizar o tamanho das restantes.

Após a limpeza das sequências, estas foram inicialmente processadas no RDP (*Ribosomal Database Project*), onde foram analisadas com base na ferramenta *Classifier* (COLE et al., 2007), empregado para atribuições taxonômicas. Em seguida, as análises das sequências foram realizadas utilizando o programa QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) (CAPOROSO et al., 2010). Para as análises no QIIME foram empregadas linhas de comando específicas, conforme as análises desejadas. Deste modo, o agrupamento das UTOs (*Operational Taxonomic Units*) foi realizado para um nível de distância de 3,0%, empregando-se para tanto o comando *picy_UTOs.py*. O comando *align_seqs.py* foi empregado para o alinhamento pelo método PYNAST. A classificação taxonômica foi feita pelo comando *assing_taxonomy.py*, utilizando o método *Blast* e o banco de dados do *Greengenes* chamado *Caporoso Reference UTOs* (GREENGENES, 2012). A tabela de UTOs foi obtida por meio do comando *make_otu_table.py*.

Os gráficos de classificações taxonômicas foram obtidos através do comando *summarize_taxa_through_plots.py*. A análise de β -diversidade também foi realizada empregando-se, a seguinte sequência de linhas de comando: *beta_diversity.py*, *make_pricinpalcoordinates.py* e *make_2d_plots.py*. Os números de UTOs e suas respectivas sequências foram computados para o cálculo dos índices de diversidade de *Shannon* e para a estimativa de riqueza de espécies, pelo método não paramétrico de *Chao* (CHAO e BUNGE,

2008). Os softwares aqui descritos foram implementados na plataforma Linux “ubuntu 2012” (sistema operacional baseado em Linux).

4.9.2 Dados de sequenciamento do DNA total

Ao final do sequenciamento, o PGM Ion Torrent realiza automaticamente uma avaliação da qualidade das sequências e as filtra, separando assim as sequências de boa qualidade. Após, pode-se exportar esses arquivos como fastQ e/ou SFF para análises mais acuradas.

As sequências geradas no sequenciamento metagenômico foram baixadas da plataforma do PGM Ion Torrent no formato FastQ. Posteriormente, os dados de DNA total foram inseridos no servidor MG-RAST (Metagenome Rapid Annotation Using Subsystem Technology) (<http://metagenomics.anl.gov/>).

Uma vez no MG-RAST, os parâmetros padrão foram utilizados para a classificação taxonômica e funcional. O banco de dados M5NR foi usado para anotação e classificação taxonômica, enquanto o banco de dados de proteína Subsystems, foi utilizado para anotação e classificação funcional da metagenômica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta dos dados

Uma das principais características do semiárido brasileiro é o déficit hídrico. Mas isso não significa falta de chuva, pois a média pluviométrica vai de 250 mm a 800 mm anuais, dependendo da região. Porém, as chuvas são irregulares no tempo e no espaço. Além disso, a quantidade de chuva é menor do que o índice de evaporação, que pode chegar a 3 mil mm/ano, ou seja, a evaporação é três vezes maior do que a quantidade de chuva que cai.

Essas condições particulares são as responsáveis pela grande diversidade de tipos de vegetação que caracterizam o semiárido (GIULIETTI et al., 2006). Na Caatinga há duas estações bem marcadas e contrastantes durante o ano, o inverno e o verão, respectivamente, estações da chuva e da seca (MAIA, 2004). A estação da chuva tem duração entre três e cinco meses, com chuvas torrenciais e de pouca duração, e a época da seca, praticamente sem chuvas e que dura em torno de sete a nove meses.

Considerando as duas estações, foram realizadas duas coletas, sendo uma em cada estação. A precipitação hídrica dos últimos 40 anos no local amostrado está ilustrada na Figura 10.

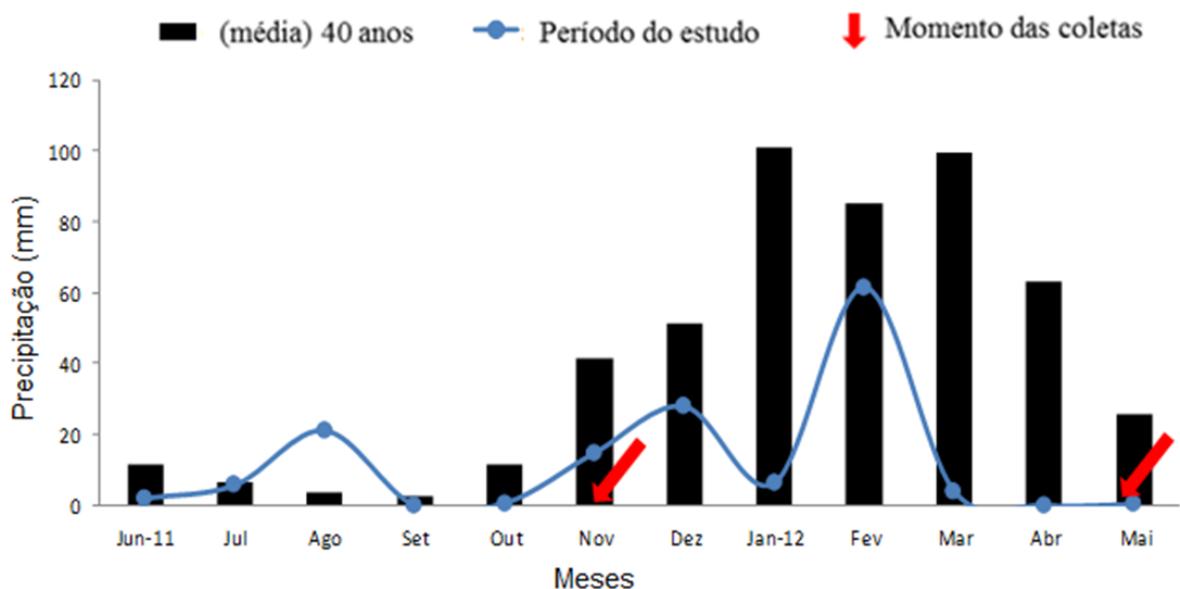


Figura 10 - Gráfico com histórico da precipitação hídrica dos últimos quarenta anos da Caatinga (barras pretas), com histórico hídrico do ano da realização do estudo (linha azul) e com os dois momentos de amostragem indicados pelas setas vermelhas. Dados coletados da estação meteorológica localizada na sede da Embrapa Semiárido em Petrolina, PE

Considerando o histórico dos últimos 40 anos (Figura 10), a precipitação observada no período do estudo foi atípica. A amostragem realizada no início de novembro, supostamente período de seca, foi precedida por um acúmulo de chuva concentrado no mês de agosto, incluindo chuva na semana que antecedeu a coleta. Por outro lado, a amostragem após a estação chuvosa esperada, aconteceu após um período de seca. A seca que ocorreu no período do estudo foi um evento histórico e a mais severa registrada nos últimos 50 anos na Caatinga. Para efeito de comparação dos dados consideramos a coleta realizada em novembro como período chuvoso (R = *rainy*) e a amostragem realizada no início de maio como período chuvoso (D = *drought*).

Um fator importante para este estudo é que as amostras de rizosfera foram coletadas no pico de cada temporada, porém, lembrando que não tivemos um ano típico de precipitação pluviométrica, assim, a distinção entre as amostras foi minimizada, ou seja, não tivemos o contraste entre um teor de água limitada ou abundante.

Uma advertência importante é a heterogeneidade da distribuição dos microrganismos na rizosfera, já que o crescimento microbiano é geralmente observado em grupamentos em vez de forma homogênea (SCHWARZENBACH et al., 2007; WOLFE et al., 2007). Esse efeito foi minimizado com a utilização da metodologia de Mendes et al., (2011), onde a coleta das amostras a partir de três pontos distintos em cada planta de estudo é homogeneizada para obter uma amostra composta, representando cada planta.

5.2 Análise físico-química da rizosfera

Os micro-organismos são os principais impulsionadores dos processos biogeoquímicos no solo. Assim, é importante avaliar as propriedades físico-químicas do solo e como estas propriedades podem ser relacionadas com os perfis microbianas em diferentes solos (PEIXOTO et al., 2010).

Considerando a análise realizada no mesmo ponto de amostragem, porém nos dois períodos distintos, foram observadas diferenças estatísticas significativas para alguns parâmetros químicos dos solos analisados, como teor de umidade, que foi maior na primeira coleta (período chuvoso) sendo de 6,7% enquanto na segunda coleta (período de seca) de 0,5%, evidenciando a inversão do padrão de chuvas no período do estudo como ilustrado na Figura 10.

Alguns nutrientes como fósforo (P), manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn), boro (B), apresentam uma maior concentração no período da seca ($p < 0,01$). O teor de matéria e enxofre (S) foram maiores no período da chuva ($0,01 \leq p < 0,05$). As concentrações de

potássio (K), magnésio (Mg), alumínio (Al), cálcio (Ca), carbono (C), nitrogênio (N), sódio (Na), ferro (Fe) e acidez/potencial (H/Al) não apresentaram diferenças significativas para as amostras de rizosfera entre os períodos de chuva e seca (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise dos parâmetros físico-químicos dos solos coletados nas duas estações: de chuva e de seca. Valores estão apresentados como as médias \pm o erro padrão (n=3). Em cada linha, valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey a 5,0%

Amostra	Chuva (R)	Seca (D)
pH (CaCl₂)	4,4 \pm 0,20a	4,6 \pm 0,12a
MO (gdm⁻³)**	25,6 \pm 2,3a	16 \pm 1,0b
Teor de Umidade (%)**	6,7 \pm 0,39a	0,5 \pm 0,06b
P avaliado (mg dm⁻³)*	4,3 \pm 0,33b	8,3 \pm 1,0a
		mmolc dm ⁻³
K	2,6 \pm 0,28a	2,3 \pm 0,31a
Mg	4,3 \pm 0,88a	4,3 \pm 0,66a
Al	2 \pm 0,57a	1,5 \pm 0,40a
Ca	26 \pm 5,13a	23,6 \pm 0,33a
C	1,24 \pm 0,14a	1,38 \pm 0,20a
N	0,38 \pm 0,28a	0,10 \pm 0,0a
H/Al	32,3 \pm 2,96a	30 \pm 2,0a
SB	33,0 \pm 6,12a	30,4 \pm 0,88a
CTC	65,3 \pm 4,75a	60,4 \pm 1,99a
V (%)	49,8 \pm 5,98a	50,4 \pm 1,84a
Ca/Mg	6,1 \pm 0,84a	5,8 \pm 1,10a
Mg/K	1,6 \pm 0,15a	1,8 \pm 0,32a
		mg dm ⁻³
S**	11,3 \pm 0,66b	31,3 \pm 6,36a
Na	3,33 \pm 1,45a	2,3 \pm 0,33a
Fe	156 \pm 46a	290,6 \pm 88a
Mn*	16,9 \pm 2,5b	60,6 \pm 7,8a
Cu*	0,83 \pm 0,06b	2,63 \pm 0,32a
Zn*	2,63 \pm 0,06b	7,1 \pm 0,32a
B*	0,40 \pm 0,03a	7,8 \pm 0,01b

Análise de Tukey onde letras a e b entre as colunas apresentam diferença estatística significativa e * $p < 0,01$ e ** $0,01 \leq p < 0,05$. MO = Matéria orgânica; H/Al = Acidez potencial; SB = Soma de bases; CTC = Capacidade de troca de cátions; V = Saturação por bases

Lobato et al. (2010), no estudo de perdas de nutrientes em área de Caatinga por erosão hídrica, analisou os nutrientes e a matéria orgânica, na qual constatou que a vegetação rasteira é muito importante no controle do processo de erosão e as maiores perdas registradas são sempre de matéria orgânica. A matéria orgânica do solo desempenha papel fundamental para as plantas e para o solo: atua como um cimento que faz a união entre as partículas de solo, formando os agregados. Estes são importantes porque tornam o solo mais poroso, melhorando e aumentando a infiltração da água e conseqüentemente, reduzindo a quantidade de nutrientes que é lixiviado com a enxurrada, além de aumentarem a resistência do solo ao

impacto das gotas de chuva, tornando-o mais resistente aos processos erosivos (PETRERE; CUNHA, 2010).

A matéria orgânica é importante, também, para aumentar a capacidade de troca catiônica (CTC), que é a capacidade que o solo tem de armazenar nutrientes para as plantas, tais como: cálcio, potássio e magnésio. Além disso, a matéria orgânica é capaz de fornecer nitrogênio, fósforo e enxofre para a nutrição das plantas (LOBATO et al., 2010; PETRERE; CUNHA, 2010).

As raízes podem induzir mudanças nas propriedades físico-químicas da rizosfera, as quais podem acarretar alteração na concentração iônica (esgotamento ou acúmulo), mudanças de pH, exsudação de compostos de baixo peso molecular, excreção de enzimas e alterações no potencial redox do solo rizosférico (GREGORY; HINSINGER, 1999), além de enriquecimento do solo (variedade de compostos orgânicos), absorção de nutrientes e até no consumo de água, reduzindo a umidade, entre outros (NIELSEN; ELSAS, 2001).

5.3 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

A quantificação foi realizada após a purificação das bibliotecas, por meio do Qubit e conferida em gel de agarose (Figura 11). As amostras utilizadas para sequenciamento do gene 16S rRNA foram ligadas a um *tag* (identificação) composto por 5 pares de bases (pb) – *barcode* que serve para identificar cada sequência das bibliotecas no momento de fazer a anotação dos dados. (Tabela 3).

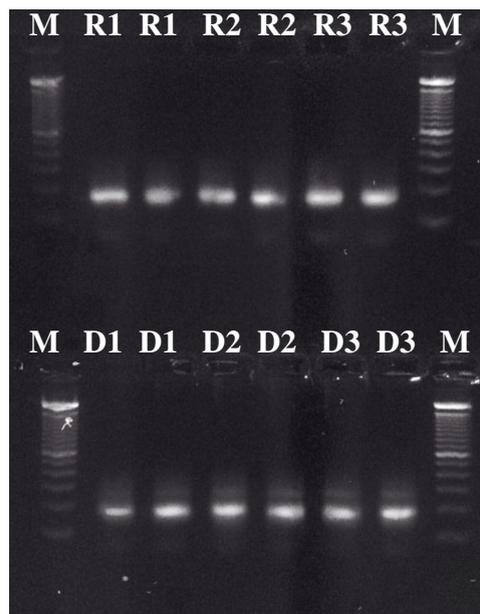


Figura 11 - Gel de eletroforese dos *amplicons* das bibliotecas de 16S rRNA das amostras em duplicata R1, R2 e R3 (estação chuvosa) na parte superior da imagem e das amostras em duplicata D1, D2 e D3 (estação seca) na parte inferior da imagem. M = marcador (GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder)

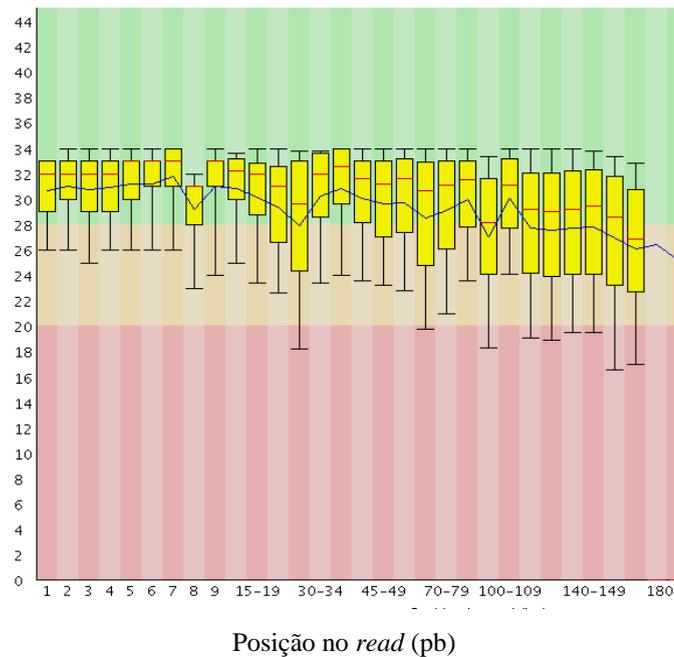
Tabela 3 - Identificação dos *Tags* ligados nas amostras para sequenciamento do gene 16S rRNA. Os *Tags* foram compostos por 5 pb – *barcode*, para os 3 pontos da coleta do período chuvoso (amostras de R1 a R3) e seco (amostras de D1 a D3)

Amostras	Tag	Barcode
R1	36	CGAGT
R2	37	ATACG
R3	38	ACTCG
D1	39	TCTGT
D2	40	TCGCT
D3	41	TGCGT

Os dados brutos obtidos no sequenciador *Ion Personal Genome Machine™ (PGM™)* (*Ion Torrent, Life Technologies*) foram convertidos e extraídos do servidor em formato Fasta para que pudessem ser manipulados. Na saída do sequenciamento foi gerada uma quantidade total de 103.265 sequências (Tabela 4) que foram manipuladas inicialmente na plataforma Galaxy online (<https://main.g2.bx.psu.edu/root>), onde foi construído um gráfico para averiguar a qualidade do sequenciamento 16S rRNA (Figura 12). Em média, as sequências tiveram um *score* de qualidade de 30-32 e a contagem de sequências para cada amostra está representada na Tabela 4.

Tabela 4 - Número de seqüências do sequenciamento 16S após limpeza na plataforma Galaxy

Amostra	R1	R2	R3	D1	D2	D3
N° seqüências	17.82	5.246	18.046	21.454	19.760	20.932

Figura 12 - *Score* de qualidade por posição no *read* de sequenciamento de 16S rRNA extraído da plataforma Galaxy

O resultado de qualidade das seqüências é de suma importância e, quando esta foi comparada a outro estudo de avaliação de comunidade microbiana de dois tipos de solos de ambientes secos, nota-se que a qualidade média das seqüências constatadas por Steven et al. (2012), foi de 18, enquanto a obtida neste trabalho foi entre 30-32 (Figura 12). Whiteley et al. (2012) avaliando a região V6 conseguiram um *score* de qualidade de mais ou menos 20, utilizando kits de tamanho de fragmentos semelhantes (200 pb), destacando uma boa qualidade das *reads* do presente estudo quando comparados com outros trabalhos.

5.3.1 Anotação do gene 16S rRNA no RDP

Para classificação das seqüências obtidas utilizou-se o algoritmo *Classifier* do *Ribosomal Database Project* (RDP), com "cutoff" de 50,0% por tratar de seqüências menores que 250 pb, onde foram analisadas com base na ferramenta *Classifier* (COLE et al, 2007). Este algoritmo compara cada seqüência do gene 16S rRNA com seqüências de bibliotecas de referência depositadas em um banco de dados para fazer atribuições taxonômicas. Ao comparar as seqüências encontradas com bibliotecas de organismos conhecidos, alguns

táxons presentes em amostras ambientais podem ser identificados sem erro (SHOKRALLA et al., 2012).

No banco de dados do servidor RDP, mais de 82,5 mil sequências foram anotadas no domínio Bacteria, onde, em média, 47,0% das sequências não foram classificadas em um filo específico, enquanto as outras se distribuíram pelos filios Actinobacteria (21,6% seca; 21,4% chuva), Proteobacteria (17,0% seca; 16,2% chuva), Firmicutes (9,5% seca; 11,1% chuva) e vários outros menos abundantes (Figura 13). Apesar dos filios de maior abundância terem apresentado proporções semelhantes entre as estações do ano, outros mostraram mudanças quanto à sazonalidade, como Acidobacteria (1,4% seca; 2,2% chuva), Bacteroidetes (1,2% seca; 0,6% chuva) e Verrucomicrobia (1,1% seca; 0,7% chuva) (Figura 13). Aguirre-Garrido et al. (2012) encontraram uma maior abundância de Proteobacteria na estação da chuva em relação à seca e menor abundância de Actinobacteria na seca quando avaliaram amostras de rizosfera de cactáceas do semiárido mexicano.

O fato de não ter sido detectada a diferença nas abundâncias relativas dos filios Proteobacteria e Actinobacteria pode ser devido à inversão do padrão de chuva observado no período do estudo, o qual mostra que um período de chuva bem significativo e de solo encharcado não foi obtido. Mesmo observando algumas pequenas variações, não foram encontradas diferenças significativas entre o período chuvoso e de seca a nível de filo. Na Figura 13 os filios com grupos de espécies raras (< 1,0%) foram atribuídos a “Outras Bactérias”.

Para estudos de estrutura das comunidades bacterianas por meio do gene 16S rRNA, Aguirre-garrido et al. (2012) também utilizaram técnicas moleculares independentes de cultivo e obtiveram um resultado semelhante ao desse estudo, com uma maior abundância do filo Actinobacteria, seguido por Proteobacteria e Acidobacteria.

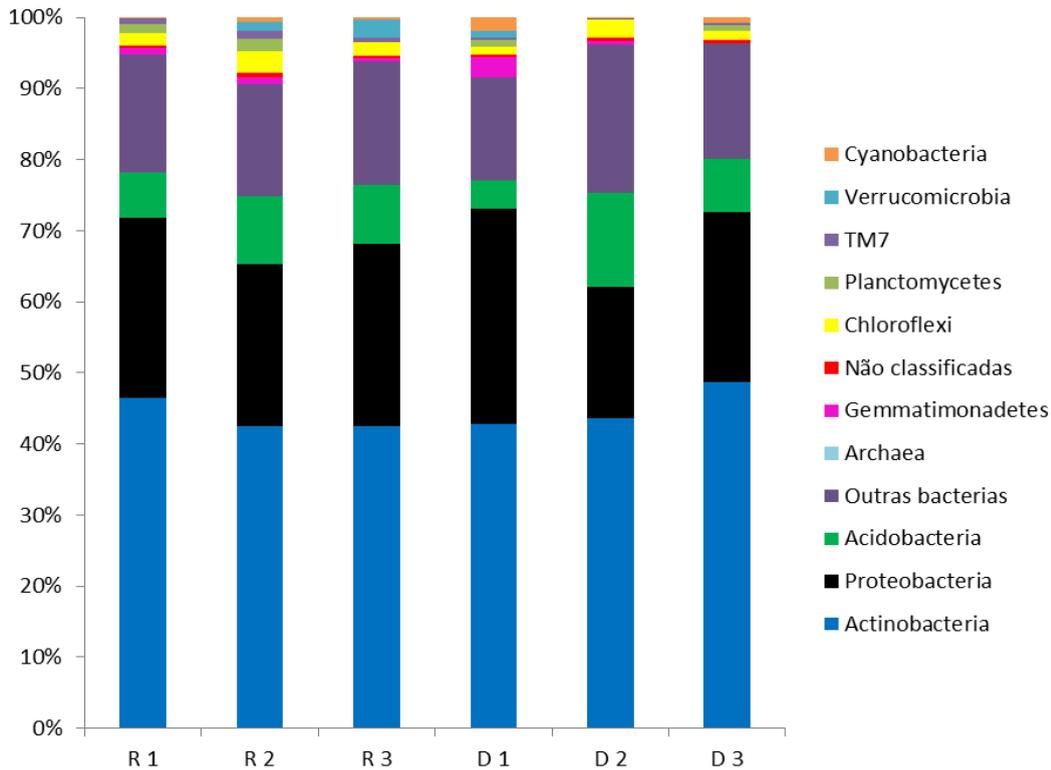


Figura 13 - Composição da comunidade microbiana da rizosfera de mandacaru ao nível de filo entre os dois grupos (seca e chuva) com seqüências 16S rRNA anotadas no RDP

5.3.2 Anotação do gene 16S rRNA no QIIME

As seqüências também foram analisadas utilizando-se o programa QIIME, onde foram empregadas linhas de comando específicas conforme as análises desejadas. Assim, o agrupamento utilizando a matriz de UTOs foi realizado para um nível de distância de 3,0%, empregando-se para tanto o comando *picy_UTOs.py*. Os comando *align_seqs.py* foi empregado para o alinhamento pelo método PYNAST. A classificação taxonômica foi realizada pelo comando *assing_taxonomy.py*, utilizando o método *Blast* e o banco de dados do *Greengenes* (GREENGENES, 2012). Após anotação das seqüências no servidor QIIME, foi feita uma curva de rarefação, ainda neste servidor, com o objetivo de se verificar a variação na riqueza de espécies e na diversidade microbiana entre as amostras de chuva e de seca (Figura 14).

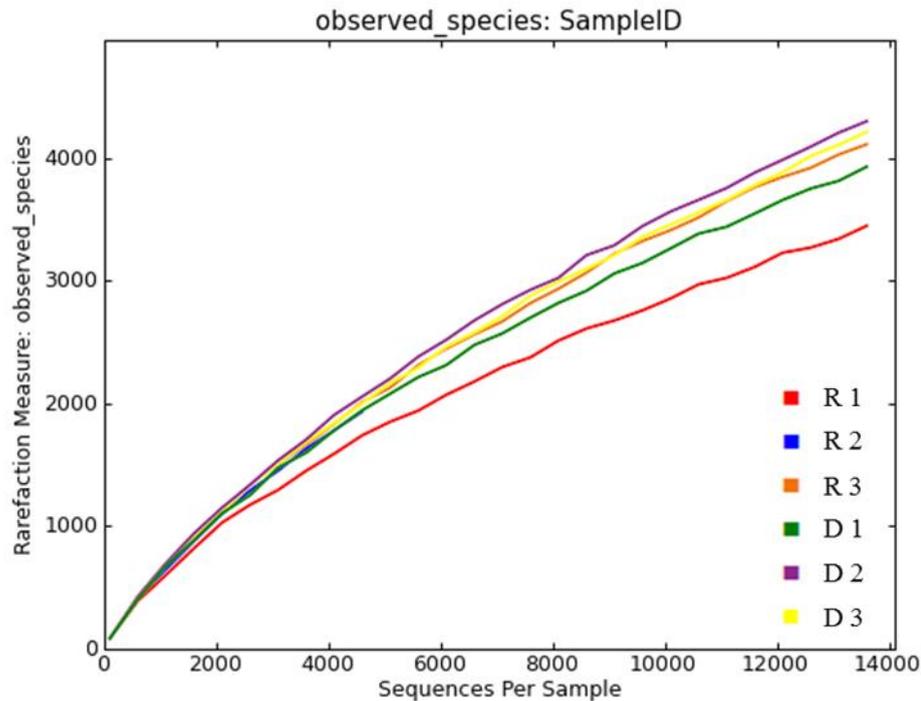


Figura 14 - Curva de rarefação das amostras de 16S rRNA. Dados extraídos do Qiime

Na Figura 14 podemos observar que na amostra D2, foi encontrado maior número na contagem de espécies, isto é, maior riqueza, seguido pela amostra D3, R3, D1, R1 e R2 respectivamente. Todas as amostras apresentaram curvas de rarefação íngremes à direita, o que indica que a amostragem e o sequenciamento foram responsáveis por uma cobertura parcial das espécies que compõem esse ambiente. O gráfico das curvas de rarefação incluiu as seis amostras de 16S rRNA comparando assim, a qualidade entre os sequenciamentos de cada amostra. Todas as amostras apresentaram boa cobertura das espécies que compõem a rizosfera de mandacaru.

A única amostra que poderia ter uma cobertura melhor, pois mostrou riqueza de espécies e diversidade mais baixas em relação às outras, foi a amostra R2. Mas no geral, as curvas revelam que uma boa parte das OTUs das amostras foi sequenciada.

O fato da amostra R1 ter apresentado a maior diversidade e menor riqueza, sugere a presença de menos espécies raras, possuindo maior regularidade na abundância das espécies que contém. Da mesma forma, a amostra D2 que têm a maior riqueza, apresentou um baixo valor de diversidade, quando comparado às demais, o que reitera o fato de que as espécies adicionais que promovem uma maior riqueza na rizosfera de mandacaru na Caatinga, são espécies raras e com pouca abundância e regularidade.

Para avaliar a similaridade entre os dois grupos de amostras também foram

realizadas os métodos multivariados de Análise de Coordenadas Principais (*Principal Coordinates Analysis - PCoA*). Comparação realizada para testar as variações na estrutura desses grupos entre as diferentes amostras sequenciadas (Figura 15).

Os resultados demonstraram haver uma separação da diversidade entre a rizosfera na chuva e na seca e uma maior dispersão entre as 3 plantas na seca, explicando um total de 73,8% da variabilidade total existente. No gráfico de PC1 vs PC2 e PC vs PC2, os resultados demonstram haver um contraste na separação da diversidade entre as amostras de seca e chuva, explicando um total de 73,83% e 35,72% da variabilidade total existente.

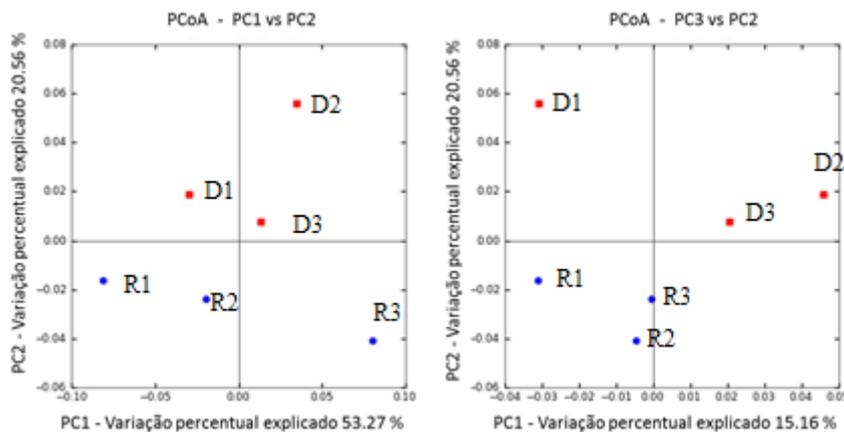


Figura 15 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) baseada na matriz de distância UniFrac, comparando as amostras com base na medida de distância filogenética das UTOs no servidor do QIIME. Os pontos vermelhos (quadrados) do gráfico representam as três plantas na seca (D) e, os três pontos azuis (redondos), representam as plantas na chuva (R)

A análise das sequências geradas permitiu a classificação das bactérias com base na matriz de UTOs formada pelo software QIIME, mostrando um índice de cobertura em torno de 88% das sequências totais geradas.

Para a comparação das amostras sequenciadas, foi realizada uma análise de clustering (Figura 16). Porém, pode-se observar que não ocorreu uma separação das amostras entre os dois diferentes períodos avaliados, ou seja, não teve uma diferença significativa entre as amostras. O fato de não acontecer uma separação significativa entre estas, pode estar relacionado a um ano atípico na região estudada, onde a precipitação pluviométrica da região no período do estudo não foi como esperado.

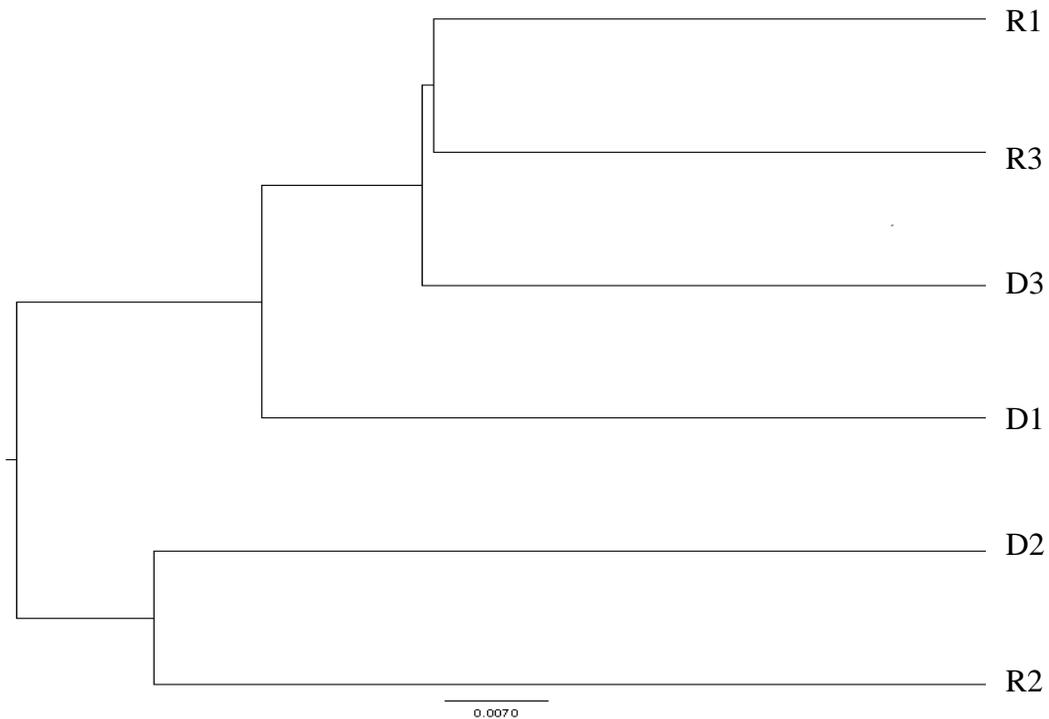


Figura 16 – Análise de avaliação taxonômica de 16S rRNA extraídos do servidor QIIME, onde amostras da chuva são representadas pela letra R e amostras da seca pela letra D. Os números equivalem a cada planta amostrada e o banco de dados de referência foi o Greengenes

Os resultados mostraram que em média os filos mais abundantes quando anotados no software QIIME foram: Actinobacteria (29,1% na seca e 31,0% na chuva), Proteobacteria (22,8% na seca e 20,9% na chuva), Acidobacteria (13,1% na seca e 13,9% na chuva), Firmicutes (6,6% na seca e 7,3% na chuva), Verrucomicrobia (4,5% na seca e 3,9% na chuva), Bacteroidetes (2,8% na seca e 3,0% na chuva), Chloroflexi (2,1% e 1,8% na chuva), Gemmatimonadetes (1,6% na seca e 1,3% na chuva), Cyanobacteria (1,5% na seca e 2,0% na chuva) e Planctomycetes (1,1% na seca e 0,9% na chuva). Estes resultados foram diferentes das frequências observadas quando as sequências foram anotadas utilizando o banco de dados RDP (Figura 13). No entanto, mesmo os filos aqui representados em frequências mais elevadas tiveram os mesmos filos predominantes (mais abundantes), com exceção dos grupos raros que apresentaram variações na ordem do número de frequência. No geral, foi encontrado um número maior de sequências quando anotados no QIIME.

O filo Actinobacteria foi o mais abundante em todas as amostras em ambas as estações analisadas, já que, as Actinobacterias são um grupo distinto de bactérias que estão amplamente distribuídas na natureza (ZUCCHI et al., 2011). Atualmente, Actinobacteria

composto por oito grupos com 48 gêneros (HOLT et al., 1994). Especial atenção tem sido dada a este grupo de bactérias em aplicações biotecnológicas, que são um resultado natural de sua grande diversidade metabólica (PIRET; DEMAIN, 1988). Solos do semiárido brasileiro tem um potencial enorme de biodiversidade. Alguns destes solos têm sido descritos como habitats com uma elevada atividade biológica, mas não têm sido amplamente exploradas para a procura e descoberta de novas espécies de actinobactérias (SILVA et al., 2013).

O grupo das Actinobacteria foi o mais abundante em todas as amostras, sendo um grupo frequentemente associado ao metabolismo do solo, ou seja, associado à decomposição de materiais orgânicos e desempenhando assim, um papel crucial no meio ambiente (ACOSTA-MARTÍNEZ et al., 2008). Fierer et al. (2007) relataram a abundância de Proteobacteria correlacionados com as taxas de carbono mineralizado em regiões quentes. Da mesma forma, outros estudos sugerem que as proteobactérias englobam uma enorme diversidade ao nível morfológica, fisiológica e metabólica, os quais desempenham um papel significativo nos ciclos do carbono, nitrogênio e enxofre do solo (KERSTERS et al., 2006; ACOSTA-MARTÍNEZ et al., 2010).

Acosta-Martínez et al. (2010), também encontraram Actinobacteria e Proteobacteria como filos mais abundantes em solos de desertos, onde esses grupos são associados ao valor baixo de pH do solo e a altas temperaturas. Além disso, são encontrados na natureza, grupos de Proteobacterias desempenhando papel ativo no ciclo do nitrogênio, principalmente as β -proteobacteria e γ -proteobacteria amônio-oxidantes, sendo representadas as *Nitrosomonas*, *Nitrospira* e *Nitrosococcus* (PURKHOLD et al., 2003). As Proteobacterias se destacam por estarem envolvidas no processo de fixação biológica de nitrogênio (VAL-MORAES, 2008). Portanto, as Proteobacterias também desempenham um papel importante no meio ambiente.

5.4 Sequenciamento metagenômico

Um resumo do *output* dos sequenciamentos das seis amostras utilizando o Ion Torrent (PGM), bem como a leitura após passar pelos filtros de controle de qualidade utilizados no servidor MG-RAST (<http://metagenomics.anl.gov>) estão indicados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultado das amostras sequenciadas (DNA total) anotadas pelo MG-RAST

Parâmetro	Primeira Coleta (09/11/2011)			Segunda Coleta (03/05/2012)		
	R1	R2	R3	D1	D2	D3
Pré-Controle de Qualidade						
Número de pb	50.636.933	176.769.232	225.453.657	125.824.492	257.135.719	257.469.392
Número de sequências	584.923	1.708.373	2.348.555	1.532.644	2.382.249	2.282.295
Comprim. Médio (pb)	86±38	103±23	95±27	82±37	107±20	112±29
Conteúdo CG (%)	65±9	65±9	66±9	66±9	64±8	66±7
Pós-Controle de Qualidade						
Número de pb	29.850.752	152.267.740	178.433.923	63.134.960	221.195.901	212.916.075
Número de sequências	326.721	1.457.083	1.787.283	710.03	2.039.379	1.871.114
Comprim. Médio (pb)	91±21	104±16	99±15	88±21	108±15	113±20
Conteúdo CG (%)	65±8	65±8	65±8	65±8	64±8	66±7
Predição de proteínas	238.932	1.302.247	1.568.250	497.23	1.834.242	1.645.117
Proteínas identificadas	133.864	743.665	891.217	281.704	1.041.439	799.965
Categorias funcionais	96.355	527.952	631.208	202.333	732.624	584.228

Também foi feita uma curva de rarefação após a anotação das sequências no servidor MG-RAST com o objetivo de se verificar a variação na riqueza de espécies e na diversidade microbiana entre as amostras avaliadas (Figura 17).

Tanto a contagem de espécies, quanto o índice de diversidade calculado em cada amostra, tiveram valores distintos, mas aproximados. Na amostra D2 e D1, foi encontrado o maior número na contagem de espécies, isto é, maior riqueza, seguido respectivamente pelas amostras R2, D3, R3 e R1.

Todas as amostras de rizosfera mostraram curvas de rarefação pouco íngremes à esquerda e quase planas à direita, indicando que a amostragem e o sequenciamento foram responsáveis por uma boa cobertura das espécies que compõem esse ambiente.

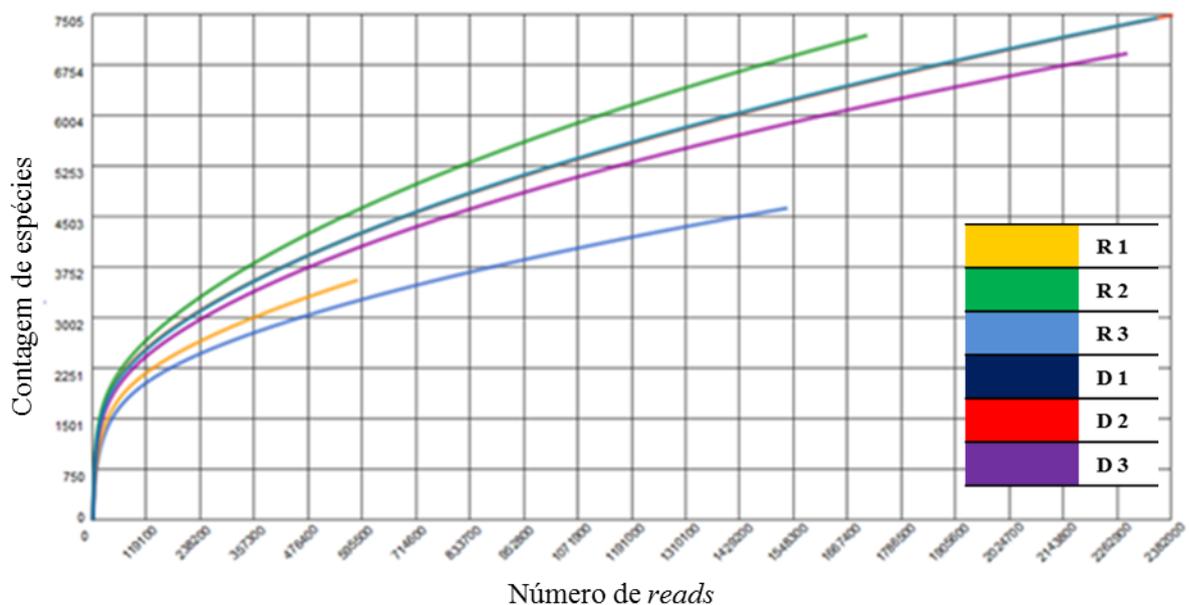


Figura 17 - Curvas de rarefação extraídas do servidor MG-RAST, mostrando a disposição dos reads do sequenciamento metagenômico entre as 6 amostras analisadas

Comparando as curvas de rarefação entre 16S realizada no QIIME e DNA total realizada no MG-RAST, podemos observar que parecem ser semelhantes, porém as amostras tiveram uma diferença na riqueza e abundância de espécies entre as duas análises. Um dos fatores que influencia essa diferença é que a anotação e bancos de dados de referencia são diferentes. Outro fator é que as amostras da Figura 14 são de sequenciamentos parciais do gene 16S rRNA, enquanto que na Figura 17, é de DNA total.

Métodos de diversidade e ordenação, como as curvas de rarefação são da família de análises paramétricas de índices e podem apresentar um resumo da riqueza e abundância das espécies em cada amostra (LIU et al., 2007). Isto torna as considerações menos dependentes do tamanho da amostra em comparação com muitos índices de diversidade simples utilizados para ecologia microbiana (YOUSSEF; ELSHAHED, 2009). Além disso, a utilização de vários métodos de ordenação e a sua comparação garantem uma avaliação mais precisa e completa da diversidade.

Em um nível taxonômico mais alto, a comunidade da rizosfera de mandacaru apresenta uma estrutura de comunidade notavelmente estável, pois não apresenta variações significativas entre as amostras e nem entre períodos amostrados. Essa estabilidade também já foi descrita para comunidades microbianas de diferentes solos (JANSSEN, 2006).

Esta observação pode fornecer informações úteis sobre as estimativas da contribuição de várias linhagens de bactérias ao ecossistema. De acordo com a teoria ecológica e evolutiva, amostras com mais diversidade tem maior contribuição para funções que as amostras menos diversas (GIOVANNONI, 2004; BELL et al., 2005)

Geralmente os grupos taxonômicos das comunidades microbianas de solos pertencem a nove grandes filos de bactérias: Proteobacteria (principalmente a α -, β - e δ subdivisões), Actinobactérias, Acidobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia e Gemmatimonadetes. Isso de uma estimativa de 104 filos candidatos reconhecidos até o ano de 2008 no banco de dados Greengenes (DESANTIS et al., 2006). Essas estabilidades de filo e de estrutura da comunidade é observada, considerando-se as grandes variações de temperatura, pH, propriedades do solo, regimes de nutrientes e/ou de água.

5.4.1 Análise da estrutura da comunidade microbiana (DNA total)

A estrutura da comunidade bacteriana do metagenoma pode ser observada no gráfico da Figura 18, realizado com dados extraídos do Krona Graph na plataforma MG-RAST, utilizando banco de dados M5NR.

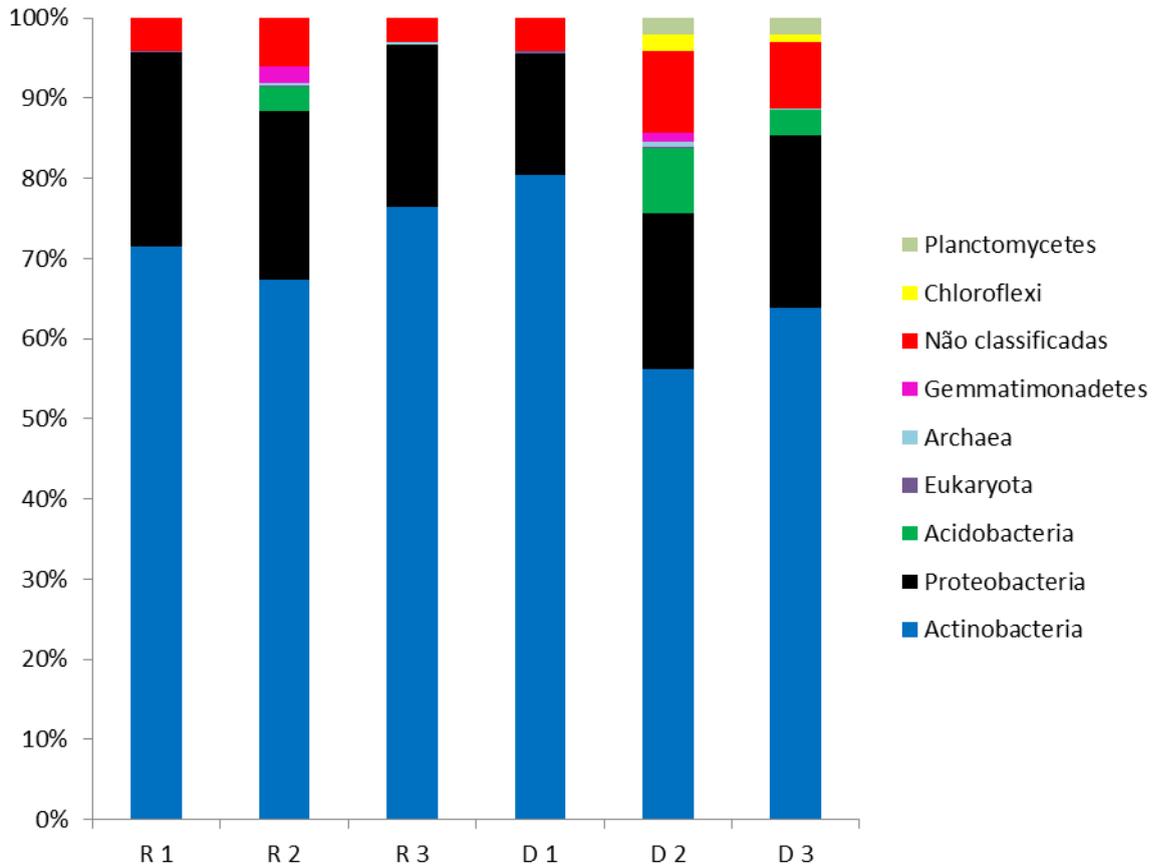


Figura 18 - Estrutura da comunidade bacteriana baseada no sequenciamento metagenômico. Frequências relativas das sequências de filos entre as 6 amostras de DNA total. Dados extraídos do Krona Graph na plataforma MG- RAST, utilizando anotação no banco de dados do M5NR

A Figura 18 mostra a estrutura da comunidade bacteriana baseada no sequenciamento de DNA total das seis amostras da Caatinga. A frequência relativa entre os filos é bem semelhante entre as amostras com destaque para Actinobacteria e Proteobacteria que são os filos mais abundantes em todas estas, e outros filos com menor frequência. Isto pode ser confirmado pelos valores obtidos pela análise de similaridade (ANOSIM), onde foi observado que as amostras são bem semelhantes entre si, não havendo diferença significativa entre elas ($R = -0,037$; $p = 0,20$). Pelo teste de SIMPER, que analisa a porcentagem de dissimilaridade entre as amostras e pesa a contribuição de cada grupo nesta diferença, a diferença total entre as amostras (chuva e seca) para os filos mais abundantes analisados foi de apenas 4,4%. Sendo que o filo Actinobacteria contribui com 50,4% para essa diferença, sendo mais abundante na seca. Em seguida, o filo Proteobacteria contribui com 14,2% dessa diferença, sendo mais abundante na chuva. Estes resultados vão de encontro com resultados obtidos por um estudo semelhante, baseado em dois períodos ambientais (chuva e seca) numa reserva do México, que apresentou

alterações nas comunidades rizosféricas de cactáceas (TORRES-CORTÉS et al., 2012). Esses mesmos autores relataram Acidobacteria como grupo mais abundante em ambas estações climáticas com uma contribuição de 32,4%, seguido de Actinobacteria contribuindo com 16,5% e Proteobacteria que contribuiu com 12,5%, ambas também semelhante nas duas estações climáticas.

Muitos estudos que tem abordado o sequenciamento de amostras de rizosfera e solos de ambientes em diferentes estações também apresentaram que alterações na precipitação influenciam a composição da comunidade microbiana da rizosfera entre a chuva e a seca (KAVAMURA et al., 2013b; DIALLO et al., 2011; CASTRO et al., 2010). Alguns autores relatam que o filo Acidobacteria chega em média a 33,0% da abundância das amostras sequenciadas em amostras do semiárido (BACHAR et al., 2010) e bem frequente em amostras de solos (JANSSEN, 2006). Porém, no presente trabalho encontramos valores bem menores para o filo Acidobacteria (média 1,9%).

Estudos no deserto ao sul da Tunísia, realizados por meio da análise de bibliotecas de clones, encontraram representantes do domínio Bacteria com predominância dos filios Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria (CHANAL et al., 2006). Utilizando-se da mesma técnica, Bachar et al. (2010) avaliaram a diversidade bacteriana de solos obtidos de clima árido, semiárido, observando que o filo Acidobacteria foi significativamente mais abundante no solo obtido de clima semiárido, já a proporção dos filios Cyanobacteria, Thermomicrobia e Verrucomicrobia aumentou com a aridez. Uma alta abundância dos filios Actinobacteria e Chloroflexi e baixos níveis de Acidobacteria e Proteobacteria também foram encontrados por Neilson et al. (2012), utilizando a técnica de pirosequenciamento em solos áridos do deserto do Atacama.

Nas análises no software do STAMP, apesar de não ter diferença estatística foi encontrado no período da seca a presença de um grande número de sequências pertencente ao filo Actinobacteria. As Actinobacterias são Gram-positivas e possuem um alto teor de G+C, possui um grande número de gêneros produtores de esporos, estrutura a qual explica a presença de muitos grupos em ambientes secos, já que esta favorece a resistência ao calor e à dessecação (WAWRIK et al., 2007, TRAAG et al., 2010).

Como não foi observada diferença significativa para os filios, foram feitas análises para outros níveis taxonômicos. Comparando as classes pelo teste de ANOSIM também não foi observada diferença estatística significativa entre os períodos ($r = -0,07$; $p = 0,70$). O teste de SIMPER indicou uma diferença de 7,4%, sendo que as classes Planctomycetes e Actinobacteria contribuem com 37,4% e 31,9% desta diferença.

Ao comparar a estrutura da comunidade dos períodos de seca (D) e de chuva (R), foram identificados alguns táxons que apresentaram diferença significativa ($p < 0.1$), bem como alguns grupos que diferem entre os dois períodos, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 - Táxons mais representativos durante os períodos estudados: chuva (R) e seca (D) após análise no STAMP, para um valor de $p < 0,1$

Domínio	Filo	Taxon	Valor de p	Período de dominância	
Bacteria	Actinobacteria	Família Nocardiaceae	p=0,046	R	
		Gênero <i>Nocardioides</i>	p=0,013	R	
		Gênero <i>Terrabacter</i>	p=0,096	D	
	Cyanobacteria	Gênero <i>Arthrospira</i>	p=0,043	D	
		Firmicutes	Classe Negativicutes	p=0,070	R
	Ordem Selenomonadales		p=0,070	R	
	Família Veillonellaceae		p=0,070	R	
	Proteobacteria		Ordem Alteromonadales	p=0,060	R
			Ordem Rhodocyclales	p=0,004	D
	Família Acetobacteraceae		p=0,083	D	
	Família Rhodobiaceae		p=0,047	R	
	Família Rhodocyclaceae		p=0,014	D	
	Família Shewanellaceae		p=0,046	R	
	Gênero <i>Acidovorax</i>		p=0,075	R	
	Gênero <i>Azoarcus</i>	p=0,005	D		
	Gênero <i>Bibersteinia</i>	p=0,042	R		
Gênero <i>Shewanella</i>	p=0,046	R			
Eukaryota	Ascomycota	Família Arthrodermataceae	p=0,014	D	
		Família Pleosporaceae	p=0,080	D	
	Basidiomycota	Ordem Polyporales	p=0,014	D	
	Chytridiomycota	Classe Chytridiomycetes	p=0,014	D	
		Ordem Rhizophydiales	p=0,014	D	

Ainda dentro da plataforma do MG-RAST e utilizando o mesmo banco de dados do M5NR, foram geradas tabelas, exportadas e avaliadas no servidor do STAMP, para comparação da estrutura da comunidade bacteriana entre os dois grupos de amostras (seca e chuva) do sequenciamento metagenômico. Analisando a estrutura da comunidade bacteriana, não foi encontrada diferença estatística, porém, foram selecionados os dois grupos mais abundantes para uma análise detalhada (Figura 19).

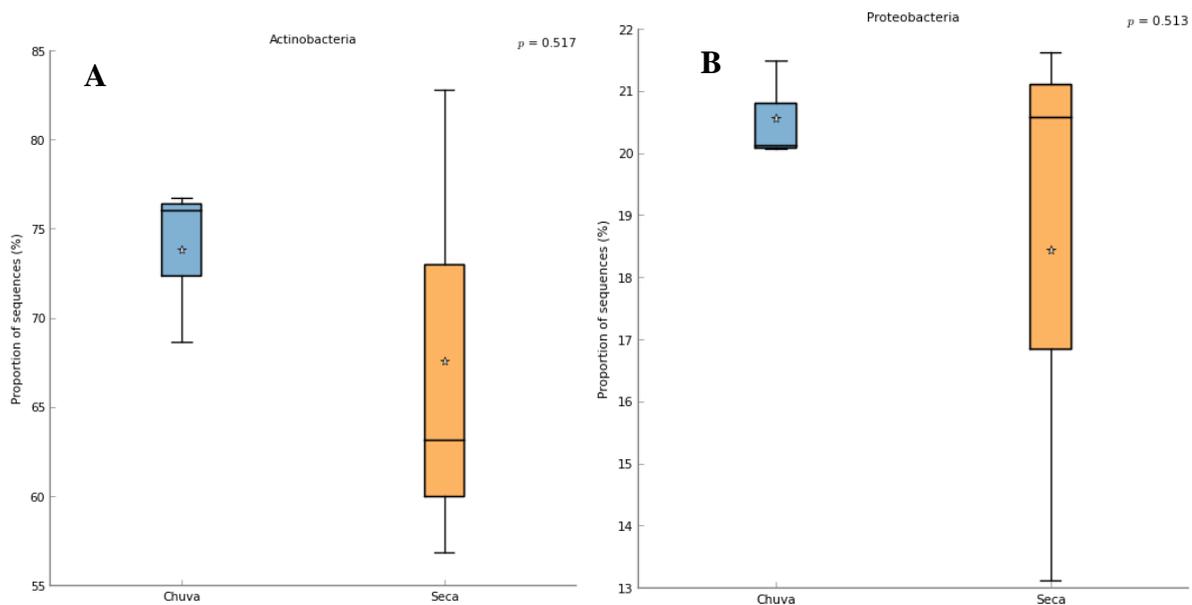


Figura 19 - Gráficos para comparação, onde **A**) Proporção de sequências obtidas para o filo Actinobacteria agrupado por período (chuva e seca). A cor azul representa as amostras do período chuvoso enquanto a cor laranja representa o período de seca. **B**) proporção de sequências obtidas para o filo Proteobacteria agrupado por período (chuva e seca). A cor azul representa as amostras do período chuvoso enquanto a cor laranja representa o período de seca. Dados analisados no software STAMP com dados obtidos no MGRAST

Na Figura 19 podemos observar um percentual de Actinobacteria maior no período da chuva, porém, essa diferença não é estatisticamente significativa a nível de filo. No entanto, foram selecionados os dois filamentos mais abundantes em todas as amostras (Actinobacteria e Proteobacteria) e nota-se uma disposição peculiar de cada um quando comparamos os períodos chuva e seca. Na seca, Actinobacteria apresentou uma diversidade muito maior que na chuva. Enquanto que a Proteobacteria apresentou uma abundância maior na chuva. Isso pode ocorrer devido à disponibilidade de nutrientes, umidade, temperatura favorável, matéria orgânica ser maior na chuva, onde os grupos microbianos mais abundantes se destacam por sua rápida resposta de crescimento com recursos disponíveis.

Em geral, linhagens apresentando maiores diferenças de classificação de diversidade também exibem a maior diferença na abundância relativa dos conjuntos de dados examinados, dentre os quais apresentaram uma correlação positiva entre abundância relativa e diversidade de Actinobacteria e Acidobacteria (YOUSSEF; ELSHAHED, 2009).

Nesse estudo, também não obtivemos uma diferença significativa para explicar a pequena variação encontrada na porção do filo Proteobacteria no período de seca. Ao contrário de Cruz-Martínez et al. (2009), que observaram uma maior proporção de

representantes do filo Proteobacteria durante o período chuvoso e redução do número de representantes do filo Actinobacteria neste mesmo período. Estas diferenças podem ser devido ao tipo de estratégia adotada por estes micro-organismos, onde grupos abundantes na seca devem possuir uma estratégia de crescimento lento, sendo considerados como estrategistas do tipo **K**; enquanto grupos favorecidos em amostras de chuva podem indicar uma estratégia do tipo **R**, com respostas rápidas à alta disponibilidade de recursos (FIERER et al., 2007).

Essa diferença também ocorre porque em condições extremas como na seca, se destacam grupos raros, que apesar de uma abundância menor são adaptados a essas condições adversas desfavoráveis para a vida da maioria dos organismos. Na Figura 20, onde selecionamos apenas Proteobacteria, a disposição do filo foi mais abundante na seca e também com uma diversidade maior no período da seca, porém, essas diferenças também não são significativas.

Podemos dizer que no período da seca encontramos uma maior diversidade por estar presente os organismos “extremófilos”, termo que define organismos com habilidade de ultrapassar condições que do ponto de vista humano são consideradas extremas, embora para outros organismos sejam condições ideais.

A maioria dos extremófilos são micro-organismos e já foram descritas várias definições de acordo com a fisiologia de cada grupo. Assim sendo, há aqueles que crescem em ambientes com pH elevado (alcalifílicos); para aqueles que crescem em altas concentrações salinas (halofílicos); os que dependem de poucos nutrientes para seu crescimento (oligotróficos); os que crescem entre materiais rochosos (endolíticos); são aqueles em que a temperatura ideal de crescimento é menor ou igual a 15°C (psicrofílicos) ou maior ou igual a 80°C (hipertermofílicos); com destaque para os que conseguem crescer em ambientes com baixa atividade de água, sendo considerados xerofílicos ou xerotolerantes (HORIKOSHI, 2007). Onde os xerotolerantes, toleram uma baixa disponibilidade de água enquanto os micro-organismos xerofílicos são aqueles que necessitam de baixa atividade de água para seu crescimento (GRANT, 2004).

Ainda no MG-RAST foi gerado o “Heatmap” (Figura 20) das sequências das amostras de seca e chuva foi feito a classificação filogenética onde foi utilizado para a classificação taxonômica o banco de dados M5NR e observado ao nível de filo.

Nesta análise podemos observar novamente os mesmos filios predominantes já mencionados na classificação taxonômica do gene 16S rRNA, onde tivemos os filios Actinobacteria e Proteobacteria em todas as amostras. Novamente não tivemos uma separação

pelo período amostrado (chuva e seca), porém, podemos perceber que as amostras R2 e R3 (chuva) ficaram separadas da D2 e D3 (seca), isso pode indicar que a amostra R1 e D1 que representa a mesma planta porém em períodos diferentes, foi quem não apresentou diferença alguma entre o período de chuva e seca e assim comprometendo a separação das amostras por período estudado.

Esse resultado é diferente quando comparamos com a análise de clustering baseado no sequenciamento parcial do gene 16S (Figura 15) e o “Heatmap” de funções que ilustra a distância de cada uma das amostras analisadas. No entanto, analisando o 16S utilizamos bancos de dados diferentes (Greengenes e Subsystems), enquanto que no sequenciamento *shotgun* foi utilizado o banco de dados M5NR.

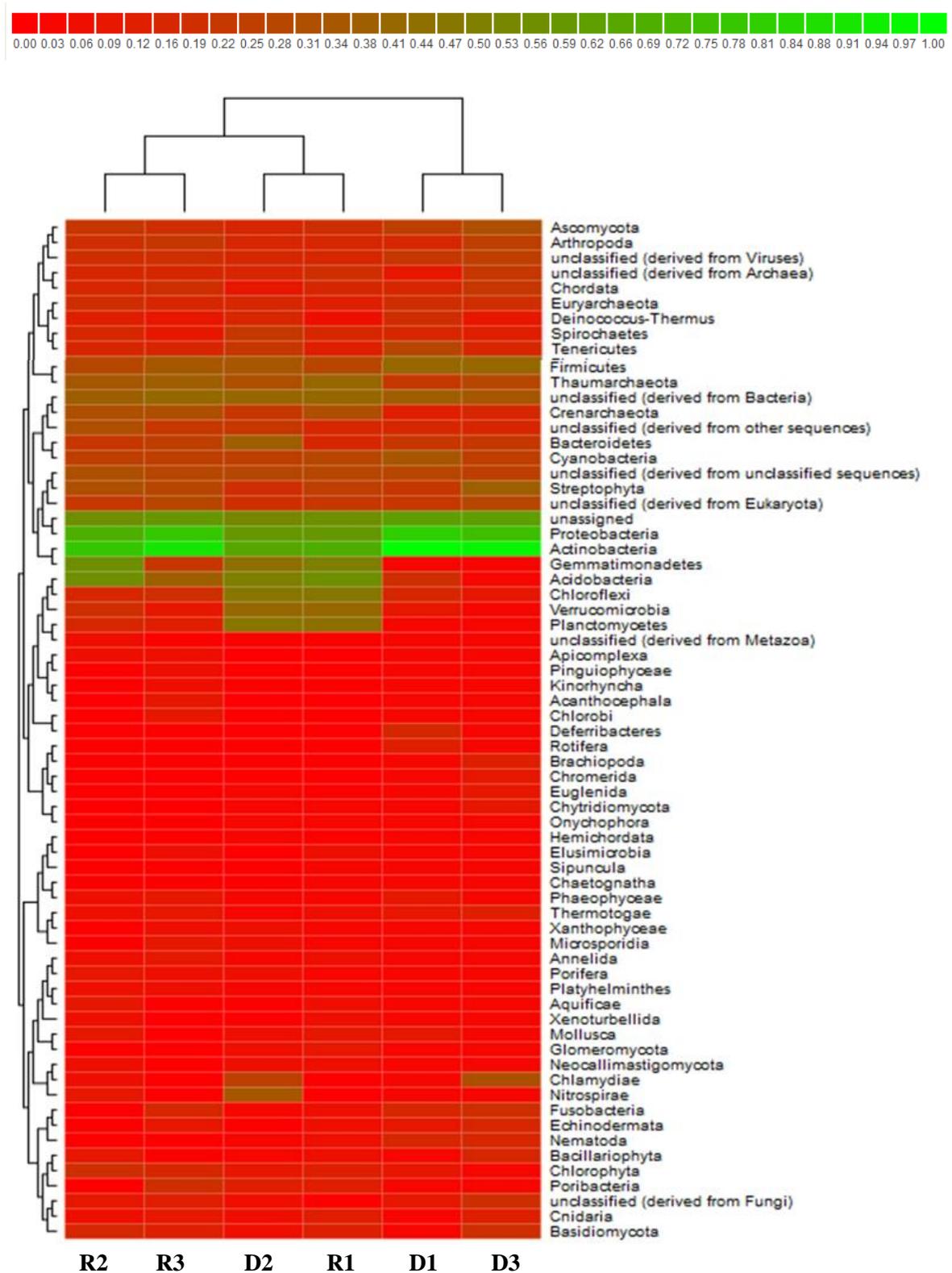


Figura 20 - Análise de agrupamento “Heatmap” da classificação filogenética baseada nos dados de abundância total de UTOs gerado no servidor do MG-RAST utilizando como referência o banco de dados do M5NR, apresentando os filos associadas às amostras a direita e em cima o agrupamento das mesmas. R) amostras no período de chuva e D) amostras no período de seca

5.4.2 Análise funcional

Analisando-se a parte funcional, foi observada diferença estatisticamente significativa e aumentando-se a resolução para genes, foram encontradas diferenças significativas para alguns genes como Isoleucyl-tRNA synthetase, Allophanate hydrolase subunit 2 e Adenine specific DNA methylase Mod e Acyl-CoA thioesterase que foram abundantes no período da chuva. As funções significativamente ($p < 0,05$) mais abundantes na seca foram Glucose dehydrogenase ($p < 0,01$), Predicted Fe-S-cluster redox enzyme, Glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase e Phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase (Figura 21).

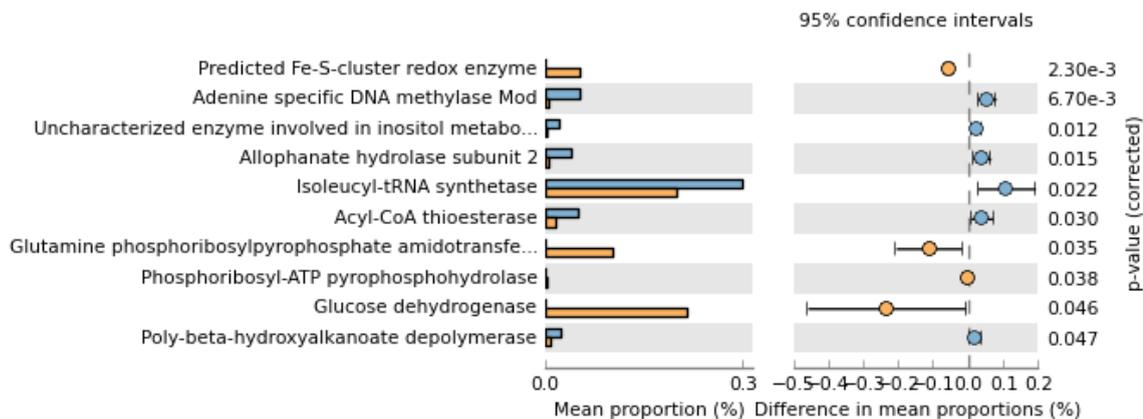


Figura 21 - Comparação de sequências obtidas do MG-RAST utilizando o banco de dados Subsystems e analisados no software Stamp ao nível funcional. A cor azul representa as amostras do período chuvoso enquanto a cor laranja representa o período de seca

O agrupamento Fe-S (ferro-enxofre) da enzima redox está presente em quase todos organismos vivos cuja montagem biossintética é dependente do complexo máquina de proteína (Fe-S) e foram mais abundantes no período da seca. Estes grupos estão envolvidos em importantes processos biológicos já caracterizados para Proteobacteria, como fixação de azoto e assimilação de enxofre, e também associados ao filo Firmicutes, o qual apresenta várias bactérias patogênicas (RIBOLD et al, 2013).

A adenina DNA metiltransferase (ethylase Dam CCRM) pertence às Gammaproteobacteria e o gene regula o ciclo metiltransferase methylase de Alphaproteobacteria, ao catalisar uma reação de metilação de grupos de adenosina usando S-adenosil- metionina como doador de metila em alvos de DNA semelhantes (exemplo: GATC e GANTC). Também foi atribuída à Dam CCRM a possível influência na interação patógeno-

hospedeiro e especialmente interessante é a evidencia de que a metilação Dam regula os genes de virulência em *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Yersinia* ao nível pós-transcricional (MARINUS; CASADESUS, 2009).

Accharomyces cerevisiae pode utilizar ureia como uma única fonte de azoto, este composto é degradado em CO₂ e NH₃ por um complexo multienzimático. Whitney et al. (1973) descreveu que o composto intermediário, alofanato (Allophanate hydrolase) é o indutor de ambos carboxilase ureia e alofanato hidrolase, um dos complexos enzimáticos que podem ser utilizados na degradação de ureia em estirpes selvagens. O sítio catalítico isoleucina é o local de reconhecimento do tRNA-isoleucina sintetase, este auxilia e aumenta a velocidade de ligação da enzima isoleucil-AMP ao sítio do tRNA em seis vezes, isso detectado em *Escherichia coli* mostrando o efeito de substratos sobre a interação da enzima (YARUS, 1969).

A glucose deydrogenase é uma enzima que pertence à família de oxidoredutases, especificamente aqueles que atuam sobre o grupo CH-OH. O nome sistemático da classe de enzimas é a D-glicose: aceitador 1- oxidoredutase. Outros nomes comuns incluem o uso de glucose desidrogenase (*Aspergillus*), glucose desidrogenase (descarboxilação), e D-glucose: (aceitador) 1-oxidoredutase. Esta enzima participa da via das pentoses fosfato e ela emprega um cofator, FAD.

Foram identificados genes representativos para determinados períodos, sendo alguns genes como Adenina DNA methylase encontrado com mais abundância na chuva, pode apresentar função de defesa, pois regula genes de virulência em alguns micro-organismos. E outros aceleram a degradação de alguns compostos como uréia, que é o caso da enzima allophanate hydrolase também mais abundante na chuva.

As sequências de DNA geradas pelo Ion Torrent que passaram pelo servidor de análises metagenômicas MG-RAST foram anotadas com base na classificação hierárquica Subsystems, que também permitiu a classificação funcional das amostras e também permitiu gerar o “Heatmap” (Figura 22). Nesse gráfico, podemos observar as funções anotadas e compara-las entre as seis amostras.

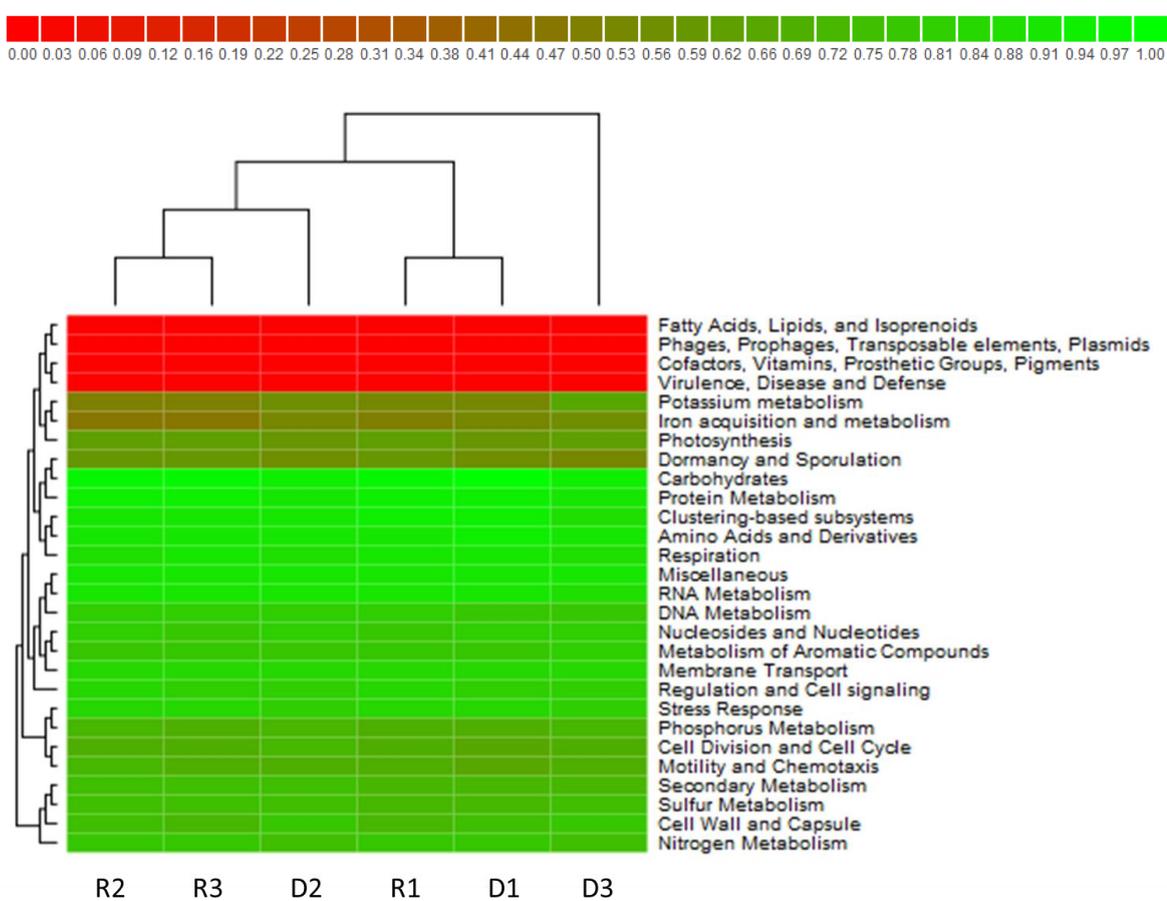


Figura 22 - Análise de agrupamento “Heatmap” da classificação funcional baseada nos dados de abundância total de UTOs gerado no servidor do MG-RAST utilizando como referência o banco de dados do Subsystems, apresentando as funções associada às amostras a direita e em cima o agrupamento das mesmas. R) amostras no período de chuva e D) amostras no período de seca

Considerando a classificação funcional pelo “Heatmap” também não apresentou separação por período avaliado. No entanto foi identificado varias funções em comum entre as seis amostras sequenciadas. Das quais as mais abundantes são relacionadas a carboidratos, metabolismo de proteínas, subsistemas baseados em agrupamentos, aminoácidos e derivados, respiração, metabolismo de RNA e resposta ao stress.

Muitos desses fatores podem estar relacionados às atividades metabólicas associadas aos ciclos essenciais para a manutenção da vida nesse ambiente e também relacionados à defesa da planta, conseqüentemente, suportando a sobrevivência da planta hospedeira.

6 CONCLUSÃO

A avaliação da estrutura taxonômica da comunidade bacteriana pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA revelou que não há diferença estatística no nível de filo entre as comunidades microbianas da rizosfera de mandacaru na chuva e na seca. Porém, em níveis específicos de classificação (classe, ordem, família e gênero) foram observados alguns grupos raros e pequenas diferenças entre os períodos. Assim, podemos concluir que o efeito do padrão de precipitação na caatinga altera a frequência de grupos taxonômicos específicos.

O sequenciamento de DNA total permitiu a identificação de funções que são relacionadas à resistência a doenças e são mais abundantes na estação seca, enquanto funções relacionadas ao metabolismo do nitrogênio são mais abundantes durante o período chuvoso. Estes resultados indicam que o microbioma da rizosfera pode auxiliar a planta hospedeira conferindo proteção contra doenças na seca e participa mais ativamente do ciclo do nitrogênio no período de chuva.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-MARTINEZ, V.; ROWLAND, D.; SORENSEN, R.B.; YEATER, K.M. Microbial community structure and functionality under peanut-based cropping systems in a sandy soil. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 44, p. 681-692, 2008. DOI: 10.1007/s00374-007-0251-5.
- ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; DOWD, S.E.; SUN, Y.; WESTER, D.; ALLEN, V.G. Pyrosequencing analysis for characterization of soil bacterial populations as affected by an integrated livestock-cotton production system. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam cidade, v. 45, p. 13-25, 2010.
- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 3, p. 52 – 63, 2008. DOI: org/10.1590/S0102-695X2007000100021.
- AGUIRRE-GARRIDO, J.F.; MONTIEL-LUGO, D.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.C.; TORREZ-CORTÉS, G.; MILLÁN, V.; TORO, N.; MARTÍNÉZ-ABACA, F.; RAMÍREZ-SAAD, H. C. Bacterial community structure in the rhizosphere of three cactus species from semi-arid highlands in central Mexico. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 101, n. 4, p. 891-904, 2012.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHNEIDER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, New York, v. 59, p. 143-169, 1995.
- ANDERSON, E.F. **The cactus family**. Oregon: Timber Press, 776p., 2001.
- ASSAD, E.D.; PINTO, H. S.; JUNIOR, J. Z.; ÁVILA, A. M. H. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1057-1064, nov. 2004.
- ASSOCIAÇÃO CAATINGA. **Sistema FIEC, ano 12, ed. 584. FIEC on line**. Disponível em: <<http://www.fiec.org.br>>. Acesso em: 12 dez. 2013.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Ecologia microbiana**. 4. ed. Palo Alto: Benjamin Cummings, 695p., 1998.
- BACHAR, A.; AL-ASHHAB, A.; SOARES, M.I.M.; SKLARZ, M.Y.; ANGEL, R.; UNGAR, E.D.; GILLOR, O. Soil microbial abundance na diversity along a low precipitation gradient. **Microbial Ecology**, New York, v. 60, p. 453-461, 2010.
- BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, 2006.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; XAVIER, D.F.; BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Efeito na calagem no número de actinomicetos e na percentage de bactérias resistentes na rizosfera de milho, trigo e feijão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 250-263, 1982.

BARBOSA, H.P. **Tabela de composição de alimentos do estado da Paraíba**: Setor agropecuário. João Pessoa: UTPB; FAPEP, 1998. 165p.

BARRAQUIO, W.L. **In the quest for nitrogen fixation in Rice**, Los Banos: IRRI, 255p., 2000.

BELL, M.L.; DOMINICI, F.; SAMET, J.M. A meta-analysis of time-series studies of ozone and mortality with comparison to the national morbidity, mortality, and air pollution study. **Epidemiology**, Philadelphia, v. 16, n. 4, p. 436-445, 2005.

BLANKENBERG, D.; GORDON, A.; VON KUSTER, G.; CORAOR, N.; TAYLOR, J.; NEKRUTENKO, A.; GALAXY TEAM. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 14, p. 1783-1785, 2010.

BLOEMBERG, G.V.; LUGTEMBERG, B.J.J. Molecular basis of plant-growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 343-350, 2001.

BORNEMAN, J.; SKROCH, P.W.; O'SULLIVAN, K.M.; PALUS, J.A.; RUMJANEK, N.G.; JANSEN, J.L.; NIENHUIS, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, p. 1935-1945, 1996.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Programa de ação nacional de combate à desertificação e mitigações dos efeitos da seca Pan-Brasil**. Brasília, 220p., 2004.

BRASIL JÚNIOR, C.; MARTINES, A.M.; BRIGATO, U.A.; ANDRADE, G. Dinâmica populacional das comunidades microbianas na rizosfera de milho e sorgo inoculadas com *Bacillus thuringiensis*. In: FERTIBIO, 3. 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: CPGA-CS; UFRRJ, 2002. 1 CD-ROM.

BROWN, G.G. Papel das interações biológicas no funcionamento edáfico: entre a fauna e os microrganismos do solo. In: FERTIBIO, 3., 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: CPGA-CS; UFRRJ, 2002. 1 CD-ROM.

BURD, G.I.; DIXON, D.G.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, n. 3, p. 237-245, 2000.

CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P. **Recursos microbiológicos para biotecnologia**. 2012. Disponível em: <<http://pt.slideshare.net/amjc/recursos-biologicos-15161461>>. Acesso em: 14 mai. 2013.

CANNAVAN, F.S. **Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra antrópica da Amazônia Central e Oriental**, 2007. 141p. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CAPOROSO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; COSTELLO, E.K.; FIERER, N.; PENA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; KELLEY, S.T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; McDONALD, D.; MUEGGE, B.D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TUMBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, London, v. 7, n. 5, p. 335–336, May 2010. DOI:10.1038/nmeth.f.303.

CASSÁN, F.; MAIALE, S.; MASCIARELLI, O.; VIDAL, A.; LUNA, V. RUIZ, O. Cadaverine production by *Azospirillum brasiliense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, Mountroge, v. 45, p. 12-19, 2009.

CASTRO, H.F.; CLASSEN, A.T.; AUSTIN, E.E.; NORBY, R.J.; SCHADT, C.W. Soil Microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 4, p. 999-1007, 2010.

CAVALCANTE, N.B.; RESENDE, G.M. Efeitos de Diferentes Substratos no Desenvolvimento de Mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.), Facheiro (*Pilocereus pachycladus* Ritter), Xiquexique (*Pilocereus gounellei* (A. Webber ex K. Schum.) Bly. ex Rowl.) e Coroa-de frade (*Melocactus bahiensis* Britton & Rose). **Revista Caatinga**, Mossoró, Brasil, v. 20, n1, p. 28-35, jan./mar. 2007.

CHANAL, A.; CHAPON, V.; BENZERARA, K.; CHRISTEN, R.; ACHOUAK, W.; BARRAS, F.; HEULIN, T. The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 514-525, 2006.

CHAO, A.; BUNGE, J. Estimating the number of species in a stochastic abundance model. **Biometrics**, Malden, v. 58, n. 3, p. 531-539, 2008.

COLARES, G.B. **Diversidade e estrutura de comunidades microbianas associadas à rizosfera de *Rhizophora mangle* do manguezal do rio Pacoti, zona Leste da costa cearense**. 2010. 59p Dissertação (Mestrado em Ciências tropicais) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; BANDELA, A.M.; CARDENAS, E.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing my RDP space and quality controlled public data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p. 169-172, 2007.

CRUZ-MARTINÉZ, K.; SUTTLE, K.B.; BRODIE, E.L.; POWER, M.E.; GARY, L.A.; BANFIELD, J.F. Despite strong seasonal responses, soil microbial consortia are more resilient to long-term changes in rainfall than overlying grassland. **Journal of Microbial Ecology**, London, v. 3, p. 738-744, 2009.

DANTAS, P.C.; CORREIA-OLIVEIRA, M.E.; PODEROSO, J.C.M.; GONÇALVES, F.B.; FERREIRA, A.F.; RIBEIRO, G.T.; ARAÚJO, E.D. Preferências da população da região metropolitana da grande Aracaju (SE), sobre o consumo de produtos apícolas. **Scientia Plena**, Aracaju, v. 5, n. 12, p. 1-7, 2009.

DEANGELIS, K.M.; BRODIE, E.L.; DESANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; LINDOW, S.E. Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. **The Isme Journal**, London, v. 3, p. 168, 2009. DOI:10.1038/ismej.2008.103pmid:19005498.

DeSANTIS, T.Z.; HUGENHOLTZ, P.; KELLER, K.; BRODIE, E.L.; LARSEN, N.; PICENO, Y.M.; PHAN, R.; ANDERSEN, G.L. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 394-399, 2006. Doi: 10.1093/nar/gkl244.

DIALLO, M.D.; WILLEMS, A.; VLOEMANS, N.; COUSIN, S.; VANDEKERCKHOVE, T.T.; LAJUDIE, P.; NEYRA, M.; VYVERMAN, W.; GILLIS, M.; VAN der GUCHT, K. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N₂-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *Raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. **Environmental Microbiology**, Heidelberg, v. 11, p. 1466-1476, 2011.

EARTHWEEK. **Near-record drought parches Brazilian Amazon**. 2012. Disponível em: <<http://earthweek.com/2012/ew120525/ew120>>. Acesso em: 13 set. 2012.

ELEND, C.; SCHMEISSER, C.; LEGGEWI, C.; BABIAK, P.; CARBALLEIRA, J.D.; STEELE, H.L.; REYMOND, J.L.; JAEGER, K.E.; STREIT, W.R. Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC v. 72, n. 5, p. 3637-3645, 2006.

FIERER, N.; BRADFORD, M.A.; JACKSON, R.B. Toward an ecological classification of soil bacteria. **Ecology**, Washington, DC v. 88, p. 1354-1364. 2007.

FIRE EARTH 2013. **Drought devastates NE Brazil**. 2013. Disponível em: <<http://feww.wordpress.com/2013/01/06/drought-desvatates-ne-brazil>>. Acesso em: 23 jul. 2013.

GAIAD, S. **Alterações na rizosfera e seus reflexos na biomassa, na composição química e na fotossíntese de erva-mate decorrentes do uso de diferentes fontes de nitrogênio**. 2011. 132p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal- Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2011).

GIOVANONNI, J.J. Genetic regulation of fruit development and ripening. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 170-180, June 2004.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.; QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A. To sell the science. In: QUEIROZ, L.P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A.M. (Ed.). **Towards greater knowledge of the Brazilian semi-arid biodiversity**. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia, p. 11-15, 2006.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 109-117, 1995.

GORELICK, R. Evolution of cacti is largely driven by genetic drift, not selection. **Bradleya**, Hornchurch, v. 27, p. 37-48, 2009.

GRANT, W.D. Life at low water activity. **Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences**, London, v. 359, p. 1249-1267, 2004.

GREENGENES. **16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB**. 2012. Disponível em: <http://greengenes.lbl.gov/download/sequence_data/fasta_data_files/>. Acesso em: 21 nov. 2012.

GREGORY, P.J.; HINSINGER, P. New approaches to studying chemical and physical changes in the rhizosphere: an overview. **Plant and Soil**, The Hague, v. 211, p. 1-9, 1999.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 5, n. 10, p. 245-249, 1998.

HARDOIM, P.R.; OVERBEEK, L.S.; ELSAS, J.D. van. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, New York, v. 16, p. 463-471, 2008.

HAWKES, C.V.; DEANGELIS, K.M.; FIRESTONE, M.K. Root interactions with soil microbial communities and processes. In: CARDON, Z.; WHITBECK, J. (Ed.). **The rhizosphere**. New York **Trends in Microbiology**: Elsevier, p. 1-3, 2007.

HERMAN, R.O.; SOARES-FILHO, B.S.; COSTA, W.L.S. Dinâmica EGO, uma plataforma para modelagem de sistemas ambientais. In: SISTEMA BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 13., 2006, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2006. p. 3089-3096

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STANLEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 530 -542, 1994.

HORIKOSHI, K. Foreword. In: GERDAY, C.; GLANSDORFF, N. (Ed.). **Physiology and biochemistry of extremophiles**. Washington: ASM Press, p. 11-13, 2007.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G.W. Microbiology: metagenomics. **Nature**, London, v. 455, p. 481-483, Sept. 2008.

IBRAHIM, A.S.S.; EL-SHAYEB, N.M.A.; MABROUK, S.S. Isolation and identification of alkaline protease producing alkaliphilic bacteria from an Egyptian Soda Lake. **Journal of Applied Sciences Research**, Cairo, v. 3, n. 11, p. 1363-1368, 2007.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **2007**: impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of working group II to the Fourth assessment report of the intergovernmental Panel on Climate Change. New York, p. 338-353, 2008.

JOHSON, N.J.; LEE, K.Y.; SCOW, K.M. DNA finger print reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. **Geoderma**, Amsterdam, v. 114, n. 3/4, p. 279-303, 2003.

KAVAMURA, V.N. **Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga**: promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico. 2012. 246 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

KAVAMURA, V.N.; TAKETANI, R.G.; LANÇONI, M.D.; ANDREOTI, F.D.; MENDES, R.; MELO, I.S. **Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome**. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n.9, p. 73, 2013a .

KAVAMURA, V.N.; SANTOS, S.N.; SILVA, J.L.; PARMA, M.M.; ÁVILA, L.A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T.D.; TAKETANI, R.G.; ANDREOTE, F.D.; MELO, I.S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, Jena, v. 168, p. 183-191, 2013b.

KERSTERS, K.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. Introduction to the proteobacteria. In: DWARKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes**. 3rd ed. New York: Springer, v. 5, p. 3-37, 2006.

KIM, M.; CUI, M.L.; CUBAS, P.; GILLIES, A.; LEE, K.; CHAPMAN, M.A.; ABBOTT, R.J.; COEN, E. Regulatory genes control a key morphological and ecological trait transferred between species. **Science**, Washington, v. 322, n. 5904, p. 1116-1119, 2008.

KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 169-188, 2004.

KUMAR, A.; PRAKASH, A.; JOHRI, B.N. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In: MAHESHWARI, D.K.K. (Ed.). **Bacteria in agrobiolgy**: crop system. Heidelberg: Springer-Verlag, chap. 2, p. 37-59, 2011.

KUSKE, C.R.; TICKNOR, L.O.; MILLER, M.E.; DUNBAR, J.M.; DAVIS, J.A.; BARNS, S.M.; BELNAO, J. Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and in the interspaces in an arid grassland. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1854-1863, 2002.

LATOUR, X.; PHILIPPOT, L.; CORBERAND, T.; LEMANCEAU, P. The establishment of an introduced community of fluorescent pseudomonads in the soil and in the rhizosphere is affected by the soil type. **FEMS Microbiology Ecology**, Hoboken, v. 30, p. 163–170, 1996.

LEE, D.G.; JEON, J.H.; JANG, M.K.; KIM, N.; LEE, J.H.; LEE, J.H.; KIM, S.J.; KIM, G.D.; LEE, S.H. Screening and characterization of a novel fibrinolytic metalloprotease from a metagenomic library. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v. 29, n. 3, p. 465-472, 2007. Doi: DOI 10.1007/s10529-006-9263-8.

LIMA, J.L.S. **Plantas forrageiras das caatingas: usos e potencialidades**. Petrolina: EMBRAPA, CPATSA, 44p., 1996.

LINS, C.V.; ARAÚJO, J.M. Isolamento de actinobacterias da rizosfera de plantas nativas da Caatinga. In: CONGRESSO NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19., 2011, Santos. **Anais...** Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, p.35-37, 2011.

LIU, C.; WHITTAKER, R.J.; MA, K.; MALCOLM, J.R. Unifying and distinguishing diversity ordering methods for comparing communities. **Population Ecology**, Tokyo v.49, p. 89–100, 2007.

LOBATO, F.A.O.; ANDRADE, E.M. de; MEIRELES, A.C.M.; SANTOS, J.C.N. dos; LOPES, J.F.B. Perdas de solo e nutrientes em áreas de Caatinga decorrente de diferentes alturas pluviométricas. **Revista Agro@ambiente** on line, Roraimav. 3, n. 2, p. 65-71, 2010. Disponível em: <<http://revista.ufr.br/index.php/agroambiente>> Acesso em: 14 set. 2012.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B.R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 86, p. 1-25, 2004.

MacELROY, R.D. Some comments on the evolution of extremophiles. **Biosystems**, Limerick, v. 6, p. 74-75, 1974.

MAIA, G.N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo, D&Z Computação Gráfica e Editora, 10p., 2004.

MANZONI, S.; SCHIMEL, J.P.; PORPORATO, A. Responses of soil microbial communities to water stress: results from a meta-analysis. **Ecology**, New York, v. 93, n. 4, p. 930-938, 2012.

MARINUS, G.M.; CASADESUS, J. Roles of DNA adenine methylation in host-pathogen interactions: mismatch repair, transcriptional regulation and more. **FEMS Microbiology Reviews**, Hoboken, v. 33, n. 3, p. 488-503, Jan. 2009.

MARSCNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C.H. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant and Soil**, The Hague, v. 261, n. 1/2, p. 199-208, 2004.

MENDES, R.; KRUIJT, M.; BRUIJN, I.; DEKKERS, E.; VOORT, M. VAN DER.; SCHNEIDER, J.H.M.; PICENO, Y.M.; DESANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; BAKKER, P.A.H.M.; REAAIJMAKERS, J.M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, Washington, v. 332, n. 6033, p. 1097-1100, May 2011. DOI: 10.1126/science.1203980.

MELO, I.S. **Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas**. Jaguariúna, 2001. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br>>. Acesso em: 04 nov. 2011.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626 p.

NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMINISTRATION (NASA) **Tropical ecosystems boost carbon as temperatures rise**. 2013. Global climate change. Disponível em: <<http://climate.nasa.gov/news/957>>. Acesso em: 25 ago 2013.

NEILSON, J.W.; QUADE, J.; ORTIZ, M.; NELSON, W.M.; LEGATZKI, U.M.; TIAN, F.; LACOMB, M.; BETANCOURT, J.L.; ASA, R.A.; SODERLUND, C.A.; MAIER, R.M. Life at the hyperarid margin: novel bacterial diversity in arid soils of the Atacama Desert, Chile. **Extremophiles**, Tokyo, v. 16, n. 3, p. 553-566, May 2012.

NIELSEN, K.M.; ELSAS, J.D. van. Efeitos estimuladores de compostos presentes na rizosfera de transformação natural de *Acinetobacter* SP. BD 413 com lisados celulares em solo. **Solo Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 345-357, 2001.

NISHIO, T.; DAO, V.H.; CHEN, Q.; CHIBOTARO, L.F.; KADOWAKI, K.; MOSHCHALOV, V. Scanning SQUID microscopy of vortex clusters in multiband superconductors. **Physical Review Letters**, Ridge, NY., v. 1, n. 81, p. 25 – 28, 2010.

NUNES, L.A.P.L.; ARAÚJO-FILHO, J.A.; HOLANDA; E.V.H.; QUEIROS, M.R.I. Impacto da queimada e de enleiramento de resíduos orgânicos em atributos biológicos de solo sob Caatinga no semi-árido nordestino. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 1, p. 131 – 140, 2010.

OLIVEIRA, C.A.; ALVES, V.M.C.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; SCOTTI, M.R.; CARNEIRO, N.P.; GUIMARÃES, C.T.; SCHAFFERT, R.E.; SÁ, N.M.H. Phosphatesolubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 41, p. 1782-1787, 2009.

PACE, N.R. The molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Washington, v. 276, p. 734-740, 1997.

PARRY, M.L.; CANZIANI, O.F.; PALITIKOF, J.P.; LINDENM P.J. van der.; HANSON, C.E. JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 3, p. 1719 -1728, 2006.

PEIXOTO, R.S.; CHAER, G.M.; FRANCO, N.; REIS JR., F.B.; MENDES, I.C.; ROSADO, A.S. A decade of land use contributes to changes in the chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 98, n. 3, p. 403–413, 2010.

PELCZAR, M.J. Jr.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, v. 2, p. 22 – 40, 1997.

PEREIRA, I.M.; ANDRADE, L.A.; SAMPAIO, E.V.S.B.; BARBOSA, M.R. Use history effects on structure and flora of Caatinga. **Biotropica**, Lawrence, v. 35, n. 2, p. 154-165, 2003.

PEREIRA, J.R.; FARIA, C.M.B. Sorção de fósforo em alguns solos do semiárido do Nordeste brasileiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 7, p. 1179-1184, 1999.

- PIVETTA, M. Extremos do clima. **PESQUISA FAPESP**, São Paulo, n. 210, p. 18 – 22 ago. 2013.
- PETRETERE, V. G.; CUNHA, T. J. F. **Cultivo da videira: manejo e conservação do solo**. 2. ed. Embrapa semiárido. (Sistemas de Produção, 1). 2010. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em: 17 jun. 2012
- PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. **The rhizosphere: biodiversity and organic substances at the soil–plant interface**. New York: Marcel Dekker, 448p., 2001.
- PIRET, J.M.; DEMAIN, A.L. Actinomycetes in biotechnology: an overview. In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKI, M. (Ed.). **Actinomycetes in biotechnology**. New York: Academic Press, p. 461–482, 1988.
- PODILE, A.R.; KISHORE, A.K. Plant growth-promoting rhizobacteria. In: GNANAMANICKAM, S.S. (Ed.). **Plant-associated bacteria**. Amsterdam: Springer-Verlag, pt. 2, p. 195-230, 2007.
- POINTING, S.B.; BELNAP, J. Microbial colonization and controls in dryland systems. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 10, p. 551-562, 2012.
- PRADO, D.E. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I.R.; TABERELLI, M.; SILVA, J.M.C. **Ecologia e conservação da caatinga**. 3. ed. Sergipe: Editora Universitária, p. 733 - 739, 2008.
- PURKHOLD, U.; WAGNER, M.; TIMMERMANN, G.; POMMERENING-RÖSER, A.; KOOPS, H.P. 16S RNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. **ISME Journal**, England, v. 53, n. 5, p. 1485-1494, 2003.
- RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 26, n. 6, p. 576-590, 2008.
- RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 51, n. 3, p. 167-177, 2000.
- RASHE, F.; HÖDL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M.H.; ELSAS, J.D. van.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, Hoboken v. 56, p. 219-235, 2006.
- RIBOLD, G.P.; MATOS, P.; FRAZZON, J. Biogenesis of [Fe-S] cluster in Firmicutes: an unexploited field of investigation. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 104, p. 283-300, 2013. DOI 10.1007/s10482-013-9966-5.
- RONDON, M.R.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. The earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. **Trends in Biotechnology**, London, v. 17, n. 10, p. 403 - 409, 1999.

RONDON, M.R.; AUGUST, P.R.; BETTERMANN, A.D.; BRADY, S.F.; GROSSMAN, T.H.; LILES, M.R.; LOIACONO, K.A.; LYNCH, B.A.; MACNEIL, I.A.; MINOR, C.; TIONG, C.L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M.S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R.M. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 6, p. 2541–2547, 2000.

ROVIRA, A.D. Interactions between plant roots and soil microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 19, p. 241-266, 1995.

SÁ, I.B.; RICHÉ, G.R.; FOTIUS, G.A. As paisagens e o processo de degradação do semi-árido nordestino. In: SILVA, J.M.C.; FONSECA, M.T.; LINS, L.V. (Ed.). **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, pt. 1, p. 17-36, 2003.

SALATI, E. Impactos das mudanças climáticas globais em algumas regiões do Brasil através do estudo da variação do balanço hídrico. In: CENÁRIOS CLIMÁTICOS DO SEMI-ÁRIDO EM IMPLICAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DO NORDESTE WORKSHOP, Fortaleza, 2004. Disponível em: <www.fbds.org.br>. Acesso em: 11 dez. 2012.

SAMPAIO, E.; RODAL, M.D.J. Fitofisionomias da caatinga. In: BIODIVERSITAS **Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga**. Petrolina, 2000. Disponível em: <<http://www.biodiversitas.org/caatinga/relatorios/fitofisionomias.pdf>>. Acesso em: 16 out. 2012.

SAMPAIO, G.; NOBRE, C.; COSTA, M.H.; SATYAMURTY, P.; SOARES-FILHO, B.S.; CARDOSO, M. Regional climate change over eastern Amazonia caused by pasture and soybean cropland expansion. **Geophysical Research Letters**, Washington, DC, v. 34, n. 17, p. 1-7, 2007. DOI: 10.1029/2007GL030612.

SARAF, M.; RAJKUMAR, S.; SAHA, T. Perspectives of PGPR in agri-ecosystems. In: MAHESHWARI, D.K.K (Ed.). **Bacteria in agrobiolgy: crop systems**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. chap. 13, p. 361-385.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospect from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, p. 303-310, 2003.

SCHWARZENBACH, K.; ENKERLI, J., WIDMER, F. Objective criteria to assess representativity of soil fungal community profiles. **Journal of Microbiological Methods**, London, v. 68, n. 2, p. 358–366, 2007.

SHOKRALLA, S.; SPALL, J.L.; GIBSON, J.F.; HAJIBABEL, M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 21, p. 1794-1805, 2012.

SILVA, J.G.M.; SILVA, D.S.; FERREIRA, M.A.; LIMA, G.F.C.; MELO, A.A.S.; DINIZ, M.C.N.M. Xiquexique (*Pilocereus gounellei* (A. Weber Ex K. Schum.) BLY. EX ROWL.) em substituição à silagem de sorgo (*sorghumbicolor* L. Moench) na alimentação de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 1408-1417, 2005.

SILVA, M.S.; SALES, A.N.; MAGALHÃES-GUEDES, K.T.; DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. Brazilian Cerrado soil actinobacteria ecology. **BioMed Research International**, Washington, DC, v. 2013, p. 03 - 10, 2013.

SOGIN, M.L.; MORRISON, H.G.; HUBER, J.A.; WELCH, D.M.; HUSE, S.M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J.M.; HERNDL, G.J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 103, n. 32, p. 12115-12120, 2006.

STEVEN, B.; GALLEGOS-GRAVES, L.V.; STARKENBURG, S.R.; CHAIN, P.S.; KUSKE, C.R. Targeted and shotgun metagenomic approaches provide different descriptions of dryland soil microbial communities in a manipulated field study. **Environmental Microbiology Reports**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 248-256, 2012.

TAYLOR, N.P.; ZAPPI, D.C. **Cacti of Eastern Brazil**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2004. 551 p.

TIEDJE, J.M.; CHO, J.C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA, B.; AHO, J. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: REES, R.M.; BALL, B.C.; CAMPEBELL, C.D.; WATSON, C.A. (Org.). **Sustainable management of soil organic matter**. Wallingford: CAB International, 2001. p. 393-412.

TORREZ-CORTÉS, G.; MILLÁN, V.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.J.; AGUIRRE-GARRIDO, J.F.; RAMÍREZ-SAAD, H.C.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; IORO, N.; MARTÍNEZ-ABARCA, F. Bacterial community in the rhizosphere of the cactus species *Mammillaria carnea* during dry and rainy seasons assessed by deep sequencing. **Plant and Soil**, The Hague, v. 357, n. 1/2, p. 275 – 288, 2012.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam Cidade, v. 5, p. 240–245, 2002.

TRAAG, B.A.; DRIKS, A.; STRAGIER, P.; BITTER, W.; BROUSSARD, G.; HATFULL, G.; CHU, F.; ADAMS, K.N.; RAMAKRISHNAN, L.; LOSICK, R. Do mycobacteria produce endospores? **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 107, n. 2, p. 878-881, Jan. 2010.

TRIGUEIRO, E.R.C.; OLIVEIRA, V.P.V.; BEZERRA, C.L.F. Indicadores Biofísicos e a dinâmica da degradação / desertificação no bioma caatinga: estudo de caso no município de Tauá, Ceará. **Revista Eletrônica do Prodepa**, Fortaleza, v. 3, n. 1, p. 62-82, 2009.

VAL-MORAES, S.P. **Impacto do iodo de esgoto na comunidade bacteriana do solo: avaliação por microarranjo de DNA**. 2008. 171p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Estado de São Paulo, Jaboticabal, 2008.

VORONEY, R.P. The soil habitat. In: PAUL, E.A. **Soil microbiology and biochemistry**. 3rd ed. Oxford: Elsevier, 2007. p. 25-49.

WAWRIK, B.; KUTLIEV, D.; ABDIVASIEVNA, U. A.; KUKOR, J. J.; ZYLSTRA, G. J.; KERKHOFF, L. Biogeography of actinomycete communities and type II polyketide synthase

genes in soils collected in New Jersey and Central Asia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 2982-2989, 2007.

WHITELEY, A.S.; A.B.; JENKINS, S.; WAITE, I.; KRESOJE, N.; PAYNE, H.; MULLANF, B.; ALLCOCK, R.; O'DONNELL, A. Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. **Journal of Microbiological Methods**, London, v. 91, n. 27, p. 80 - 88, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.07.008>>. Acesso em: 22 ago.2013.

WHITNEY, P.A.; COOPER, T.G.; MAGASANIK, B. The induction of urea carboxylase and allophanate hydrolase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, Washington, DC, v. 248, n. 17, p. 6203-6209, Sept. 1973.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 88, p. 4576-4579, 1990.

WOLFE, B.E.; MUMMEY, D.L.; RILLIG, M.C.; KLIRONOMOS, J.N. Small-scale spatial heterogeneity of arbuscular mycorrhizal fungal abundance and community composition in a wetland plant community. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 17, n. 3, p. 175-183, 2007.

YARUS, M. Recognition of nucleotide sequences. **Annual Review of Biochemistry**, Califórnia, v. 38, p. 841-880, 1969.

YOUSSEF, H.N.; ELSHAHED, M.S. Diversity rankings among bacterial lineages in soil. **The ISME Journal**, Oklahoma, v. 3, p. 305-313, 2009.

ZUCCHI, T.D.; GUIDOLIN, A.S.; CÔNSOLI, F.L. Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae), **Microbiological Research**, London, v. 166, n. 1, p. 68-76, 2011.