



ENDÓFITOS BACTERIANOS ASSOCIADOS A DIFERENTES EXEMPLARES GENOTÍPICOS DE *Cereus Peruvianus* MILL. (CACATACEAE)

Jesieli Beraldo-Borrazzo¹, Rodrigo Pawloski Schoffen¹, Jakeline Luiz Corrêa², Julio Cesar Polonio¹, Claudete Aparecida Mangolim¹, Maria De Fatima Pires Da Silva Machado¹

¹ Pesquisadora pós-doc.; Pesquisador, Doutor; Co-orientador, Doutor; Professora, Doutora; Orientadora, Doutora, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular. Universidade Estadual de Maringá – UEM, Campus Maringá-PR. jesieliberaldo@gmail.com. mangolimca@gmail.com. mfpismachado@uem.br

² Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Universidade Estadual de Maringá – UEM, Campus Maringá-P. jakelineluizcorrea@gmail.com

RESUMO

As interações entre plantas e microrganismos endofíticos são influenciadas pelo genótipo vegetal, podendo impactar a composição do microbioma associado. O presente estudo teve como objetivo isolar, identificar e comparar bactérias endofíticas associadas a plantas de *Cereus peruvianus* cultivadas *in vivo* e a somaclones regenerados *in vitro*. A identificação molecular bacteriana foi realizada por sequenciamento do gene 16S rRNA e por espectrometria de massas MALDI-TOF-MS. Foram isoladas 30 linhagens bacterianas, sendo 15 de *C. peruvianus* cultivadas *in vivo* (CS) e 15 de *C. peruvianus* regenerados *in vitro* (CR). A análise filogenética revelou oito clados, representando os gêneros *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Moraxella*, *Microbacterium* e *Kocuria*. O gênero *Micrococcus* predominou nos isolados de plantas cultivadas *in vivo* (60%), enquanto *Pseudomonas* foi mais frequente nos somaclones (47%). A análise de MALDI-TOF-MS confirmou a identificação em nível de espécie para 80% dos isolados. Os resultados indicam que a regeneração *in vitro* de *C. peruvianus* pode influenciar significativamente a composição da microbiota endofítica, provavelmente em razão das alterações genéticas e metabólicas induzidas pelo processo *in vitro*. A variabilidade observada reforça o papel do genótipo do hospedeiro no recrutamento microbiano, com implicações relevantes para a bioprospecção de microrganismos com potencial biotecnológico.

PALAVRAS-CHAVE: Endofíticos; Cactáceas; 16S rRNA; MALDI-TOF-MS.

1 INTRODUÇÃO

As plantas são nichos ecológicos únicos para a descoberta de espécies microbianas ainda não descritas e com potencial biotecnológico para o isolamento de biomoléculas, devido a relação mútua desenvolvida pela coevolução entre plantas e microrganismos endofíticos (Hamonts et al., 2018). Estima-se que menos de 1% das espécies bacterianas e menos de 5% das espécies fúngicas existentes são conhecidas por sua diversidade e capacidade de produzir compostos bioativos (Arora et al., 2019). Fungos e bactérias endofíticas habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar sintomas de patogenicidade na planta hospedeira, realizando processos específicos e produzindo substâncias que garantem sua sobrevivência (Le Cocq et al., 2016).

As interações bióticas intrínsecas, como a influência do genótipo do hospedeiro no microbioma, determinam preferências específicas de microrganismos endofíticos por espécies de plantas (Mácia-Vicente et al., 2018). Existem poucos estudos sobre a diversidade de bactérias endofíticas associadas às espécies da família Cactaceae: 23 gêneros de bactérias 34 endofíticas foram identificados em apenas 10 espécies de cactos (Puente et al., 2009; Lopez et al., 2011; Costa; Melo, 2012; Kavumara et al., 2013; Lyra et al., 2013; Lima et al., 2015; Silva et al., 2015; Fonseca-Garcia et al., 2016; Eke et al., 2019). Os cactos são plantas com características e adaptações únicas, resistentes às variações ambientais extremas e podem produzir compostos químicos bioativos valiosos. Cactos do gênero *Cereus* são plantas colunares, com diferentes espécies distribuídas nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. No Nordeste do Brasil, as plantas de *C.*



jamacaru são utilizadas como recurso alimentar pela população de regiões áridas durante os períodos de seca, enquanto na região sul, as plantas da espécie *C. peruvianus* Mill., sinônimo de *C. hildmannianus* Schum. (Santos et al., 2021), são uma fonte de compostos bioativos usados nas indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia (Tanaka et al., 2010). O desenvolvimento *in vitro* de plantas regeneradas de *C. peruvianus* com o propósito de produzir mudas em larga escala para obtenção dos compostos de interesse econômico e industrial, gerou exemplares denominados somaclones, com variabilidade genética distinta das plantas cultivadas *in vivo*. Os tecidos de calos usados para regenerar plantas de *C. peruvianus in vitro*, induziu variabilidade genética nas plantas regeneradas, bem como gerou perfil químico diferenciado (Mangolin et al., 1997; Mangolin et al., 2002; Resende et al., 2007; Sala et al., 2011).

O estudo atual levanta a hipótese de que há uma comunidade endofítica diferenciada em plantas de *C. peruvianus* cultivadas *in vivo* e nos somaclones regenerados *in vitro*, devido às diferenças genótípicas relatadas. Assim, o objetivo no presente estudo foi isolar bactérias endofíticas associadas à planta *C. peruvianus* cultivada *in vivo* e ao somaclone regenerado *in vitro* e identificar geneticamente por meio de sequenciamento do gene 16S RNAr.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Cladódios de *C. peruvianus* foram coletados em novembro de 2018 no campus da Universidade Estadual de Maringá (UEM) (23° 24' 12,0'' S, 51° 56' 22.5'' W). Foram realizadas coletas de duas amostras de *C. peruvianus*: uma amostra de cladódio da planta cultivada de *in vivo*, crescidas a partir de sementes, e a outra, de cladódio da planta regenerada *in vitro* (somaclone), estabelecidas no campo experimental (Jardim Didático Experimental da UEM). De acordo com dados da Estação Climatológica Principal da UEM, as médias das condições climatológicas do mês em que as amostras foram coletadas, foi de 218,6 horas de insolação, a temperatura foi de 25,6 0C, com umidade relativa de 67% e 197,9 mm de quantidade de chuva.

2.2 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Os cladódios de *C. peruvianus* foram submetidos imediatamente ao processo de desinfecção superficial. Previamente, foi realizada uma lavagem com água destilada e 0,1% de Tween 80 para limpeza superficial. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, foram empregadas as soluções: álcool 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 3% por 3 min, álcool 70% por 30 segundos, seguidas por duas lavagens com água destilada autoclavada. Como controle da desinfecção, uma alíquota de 100 µL da água da última lavagem foi semeada em placas de Petri contendo meio TSA (Ágar Triptona de Soja; pH 7,3 ± 0,2).

Em seguida, fragmentos de aproximadamente 5 mm dos cladódios foram macerados em meio TSB (Caldo Triptona de Soja, pH 7,3 ± 0,2), sendo posteriormente submetidos a agitação com 150 rpm durante 12 h. Logo após, foram realizadas diluições seriadas de 1:10 (suspensões 10⁻¹ e 10⁻²) na suspensão resultante, e estas foram semeadas em placas de Petri contendo meio TSA acrescidos de 50 µg·mL⁻¹ do fungicida Benlate, para evitar o crescimento de fungos. Todas as placas foram incubadas durante 72 h à 28 °C.

A concentração de endófitos por grama de tecido vegetal fresco foi calculada pelo número de colônias observadas em cada diluição. A coloração de Gram foi empregada para



todas as bactérias isoladas. A preservação dos isolados foi realizada em meio TSB com 25% (v/v) de glicerol e mantidos em -20 °C e -80 °C.

2.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

A extração de DNA bacteriano foi realizada de acordo com Nogueira et al. (2004), modificado de acordo com Rhoden et al. (2015). As bactérias endofíticas isoladas foram cultivadas em 500 µL de caldo de TSB durante 24 horas em 28 °C. Em seguida, foi adicionado 400 µL de solução de fenol saturado, agitando a mistura em vortex e submetendo à centrifugação com 16.000 x g durante 5 min. Em seguida, o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo microtubo e a etapa fenólica foi repetida. Após centrifugação, o sobrenadante foi novamente transferido para um novo microtubo e foram adicionados 400 µL de clorofórmio. O microtubo foi agitado em vortex e centrifugado durante 5 min com 16.000 x g. A fase aquosa foi coletada, e 1 mL de etanol gelado foi adicionado. Para completar o processo de extração do DNA, o microtubo foi centrifugado durante 3 min com 16.000 x g, o etanol foi descartado e o microtubo foi deixado em 37 °C durante 30 min para evaporar os resíduos de etanol. Em seguida, o material extraído foi eluído em 15 µL de água Milli-Q autoclavada.

A amplificação do gene 16S RNAr foi realizada de acordo com Araújo et al. (2009), modificado. A reação de PCR foi realizada com 5 µL de tampão (200 mM Tris-HCl, pH 8,4 - 500 mM de KCl, concentrada 1x), 5 µL de dNTP (2,5 mM), 3 µL de cada primer (Invitrogen 10 pMol) (R1378: 5'-GGTGTGTACAAGGCCCGGAACG-3' e PO27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'); 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5 U/mL); 3,75 µL de MgCl₂ (50 mM); 27,85 µL de água milli-Q autoclavada e 2 µL da amostra do DNA previamente extraído (10-20 ng·mL⁻¹). As condições de PCR foram: desnaturação inicial em 94 °C durante 4 min, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 s, anelamento em 63 °C durante 1 min, extensão em 72 °C durante 1 min e extensão final em 72 °C durante 7 min. A PCR foi realizada em termociclador modelo Speed cycler2 analytik (AG) jena.

A purificação dos produtos de amplificação foi realizada com a combinação das enzimas *Shrimp Alkaline Phosphate* (SAP) e a *Exonuclease I* (EXO), adicionadas na seguinte proporção: 8 µL do produto da PCR; 0,5 µL de Exonuclease I (10 U/µL), 1 µL de *Shrimp Alkaline Phosphatase* (1 U/µL). A reação foi incubada em termociclador por 1 hora à 37 °C, seguida por 15 min à 80 °C, e posteriormente conservada em 4 °C. As amostras foram sequenciadas a partir dos produtos de PCR pela empresa Ludwig Biotecnologia LTDA utilizando o equipamento ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As 37 sequências obtidas foram avaliadas quanto à sua qualidade utilizando o software BioEdit v7.2.5. As mesmas foram então, submetidas para análise de quimerismo utilizando o DECIPHER Find Chimeras web tool (WRIGHT et al., 2012; <http://decipher.cee.wisc.edu/FindChimeras.html>).

Para a identificação dos isolados endofíticos, as sequências nucleotídicas encontradas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information Website*) utilizando a ferramenta BLASTn aplicando-se o filtro 'sequences from type materials' para maior robustez dos dados. A identificação foi determinada baseando-se no melhor valor obtido quanto à similaridade. Para a análise filogenética, as sequências do banco de dados que apresentaram alta similaridade com as sequências obtidas, foram resgatadas e alinhadas utilizando o ClustalW no software MEGA (versão 6.05) juntamente com as sequências dos isolados. A árvore filogenética foi construída com agrupamento pelo método *neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987), usando p-distance para nucleotídeos com a opção "the pairwise gap deletion" e bootstrap com 10.000 repetições.



2.4 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS POR MALDI-TOF-MS

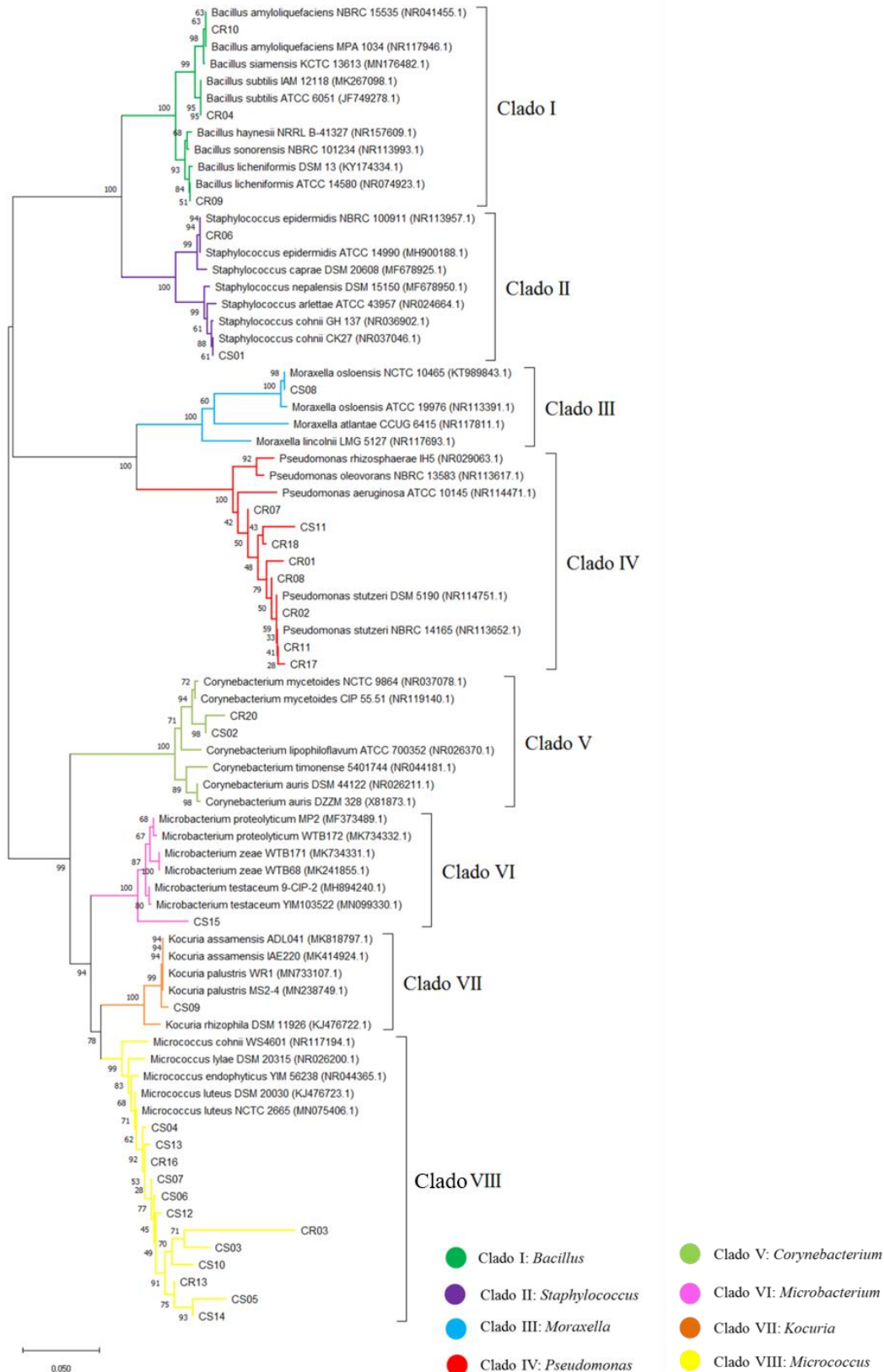
Colônias únicas foram usadas para análise de espectro de massas em um MALDI Biotyper Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A identificação das bactérias foi realizada conforme descrito por Barbuddhe et al. (2008), com modificações. Para a extração foi feita a suspensão de 1 colônia em 300 μL de água destilada estéril. Em seguida, as bactérias foram inativadas com a adição de 900 μL de etanol absoluto (Sigma-Aldrich), e centrifugadas a 10.000 x g durante 2 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco à temperatura ambiente. As proteínas foram extraídas adicionando-se ao sedimento 50 μL de ácido fórmico a 70% (Sigma-Aldrich) e, após homogeneização, foi adicionado 50 μL de acetonitrila pura (Sigma-Aldrich). Após nova centrifugação com 13.400 rpm durante 2 min, aplicou-se 1 μL do sobrenadante em placas-alvo de aço polido deixando-as secar em temperatura ambiente. Na sequência, cada amostra foi coberta com 1 μL da solução matriz composta por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (VITEK[®] MS). Os espectros obtidos foram analisados com auxílio do software Myla.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O isolamento pelo método de maceração resultou em $6,920 \times 10^4$ UFC $\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido vegetal do somaclone de *C. peruvianus* regenerado *in vitro* e $1,466 \times 10^4$ UFC $\cdot\text{g}^{-1}$ de tecido para a planta de *C. peruvianus* cultivada *in vivo*, das quais, 30 linhagens de bactérias endofíticas foram selecionadas com base nas diferenças morfológicas e mantidas em culturas axênicas. As linhagens isoladas da planta cultivada *in vivo* foram denominadas CS, enquanto as isoladas da planta regenerada (somaclone) foram denominadas de CR, sendo 15 linhagens isoladas de CS e 15 linhagens isoladas de CR. Todas as linhagens também foram analisadas de acordo com a forma e coloração de Gram.

A análise filogenética possibilitou a separação das bactérias endofíticas em oito clados principais (Figura 1). As linhagens CR10, CR04 e CR09 foram agrupadas no clado I pertencentes ao gênero *Bacillus*. De acordo com as análises no BLASTn, a linhagem CR10 apresentou 100% de identidade com a espécie *B. amyloliquefaciens* (NR_117946.1), e foi agrupada no clado com as mesmas espécies com 98% de Bootstrap (BP). As análises no BLASTn da linhagem CR04 apontou 99,82% de identidade com a espécie *B. subtilis* (MN326675.1), a qual foi agrupada no clado com as mesmas espécies com 95% de BP. A linhagem CR09 apresentou 99,82% de identidade com a espécie *B. licheniformis* (CP034569.1) e foi agrupada no clado com as mesmas espécies com 84% de BP.

Figura 1: Grupos filogenéticos das análises de porcentagem de identidade do BLAST de bactérias endofíticas isoladas de somaclone de *Cereus peruvianus* regenerado *in vitro* (CR) e da planta cultivada *in vivo* (CS).



Fonte: Autor.

As linhagens CR06 e CS01 foram agrupadas no clado II dos *Staphylococcus*, no qual, a linhagem CR06 apresentou 100% de identidade com a espécie *S. epidermidis* (MH900188.1), de acordo com as análises no BLASTn. Na análise filogenética, agrupou-se no clado com as mesmas espécies com 94% de BP. A linhagem CS01, apresentou 99.83%



de identidade com a espécie *S. cohnii* (NR_037046.1), formando um clado com 88% de BP com exemplares da mesma espécie.

A linhagem CS08 foi agrupada no clado III para o gênero *Moraxella*. De acordo com as análises no BLASTn, a linhagem CS08 apresentou 100% de identidade com a espécie *M. osloensis* (KT989843.1), com 100% de BP na análise filogenética com o clado para a mesma espécie. As linhagens CR07, CS11, CR18, CR08, CR01, CR02, CR11, CR17, foram agrupadas no clado IV pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, apresentando respectivamente, 99,78%, 99,50%; 96,13%; 99,80%; 98,17%; 100%; 99,83 e 98,85% de identidade com a espécie *P. stutzeri* (MH201145.1). Contudo, na análise filogenética, essas linhagens agruparam-se no clado das *Pseudomonas* com 100% BP, mas não foram agrupadas com nenhuma das espécies tipo, sendo confirmada a identificação taxonômica apenas em nível de gênero como *Pseudomonas* sp.

As linhagens CR20 e CS02 foram agrupadas no clado V das *Corynebacterium*. Estas linhagens apresentaram 97,32% e 97,66% de identidade com a espécie *C. mycetoides* (MF321841.1), respectivamente, sendo agrupadas no clado com a mesma espécie, com 94% de BP na análise filogenética. A linhagem CS15 apresentou 95,19% de identidade com a espécie *Microbacterium testaceum* (NR026163.1). No entanto, na análise filogenética esta linhagem foi agrupada no clado VI do gênero *Microbacterium* com 100% de BP, mas não apresentou agrupamento de forma que seja possível confirmar a identificação desta linhagem em nível de espécie, sendo identificada como *Microbacterium* sp. A linhagem CS09 foi agrupada com 100% de BP no clado VII para o gênero *Kocuria*, apresentando 98,09% de identidade com a espécie *Kocuria palustris* (NR_026451.1).

As linhagens CS04, CS13, CR16, CS07, CS06, CS12, CR03, CS03, CS10, CR13, CS05 e CS14 foram agrupadas com 99% de BP no clado VIII para o gênero *Micrococcus*, apresentando 97,66%; 98,88%; 98,07%; 96,76%; 96,35%; 96,52%; 87%; 88,32%; 94,60%; 95,39%; 97,19% e 98,07% de identidade com a espécie *M. luteus* (MN075406.1), respectivamente. Na análise filogenética, pode-se observar alta proximidade evolutiva entre essas espécies, contudo, a topologia do agrupamento permitiu apenas a identificação em nível de gênero.

Os genes usados para o estudo de filogenia de espécies têm um papel importante na caracterização molecular, principalmente quando se trata de espécies e gêneros relacionados. Atualmente o acesso para a identificação taxonômica e de variabilidade genética em bactérias é realizada empregando-se análise dos genes codificadores de 16S RNA ribossômico, por se apresentarem mais conservados em procariotos (Manaka et al., 2017). Entretanto, a variabilidade intragenômica no 16S rDNA é um fator limitante para a taxonomia e caracterização molecular da diversidade de bactérias à nível de espécie. Principalmente sobre sua ocorrência em ambientes naturais, onde a transferência horizontal gênica garante a adaptabilidade destes microrganismos em diferentes contextos ecológicos, mas levam a formação de conjuntos gênicos heterogêneos de 16S rDNA (Silva et al., 2019).

Para determinar a posição taxonômica de novos isolados, é crescente o uso de tecnologias inovadoras na identificação de isolados bacterianos como fonte alternativa e agregadora à caracterização genotípica. A utilização da espectrometria de massas é atualmente um dos métodos mais sensíveis e precisos, com ampla aplicação nas diversas áreas da ciência. Recentemente, o MALDI-TOF-MS Biotyper foi desenvolvido para analisar espectros de massas de proteínas bacterianas de extratos celulares inteiros, obtendo uma impressão digital molecular a partir do perfil de proteínas, capaz de discriminar microrganismos em gêneros, espécies e até sub-espécies (Angeletti, 2017).

Assim, para identificar a nível de espécie os isolados que não foram agrupados com nenhuma espécie tipo na análise filogenética do sequenciamento do gene 16 rRNA, foi



então realizada a identificação dos isolados bacterianos por MALDI-TOF-MS. A identificação dos isolados bacterianos com maior identidade ao perfil de proteínas analisados através de seus espectros de massas, foi obtido em nível de espécie para 80% dos isolados, em nível de gênero para 14% dos isolados, e apenas 10% dos isolados não puderam ser identificados, devido sua baixa pontuação no score (Tabela 1). Valores de score obtidos na análise de MALD-TOF-MS > 2,0 indicam alta identificação para espécie, valores > 1,7 indicam alta identificação para gênero, e valores < 1,7 representa baixa similaridade significativa, não podendo ser confirmada a identidade do isolado (Avanzi et al., 2017)

Tabela 1. Identificação dos Isolados Bacterianos por MALDI-TOF-MS Biotyper de somaclone de *Cereus peruvianus* regenerado *in vitro* (CR) e de planta cultivada *in vivo* (CS).

Isolado	Bactéria com maior Identidade para o perfil de proteínas	Score
Controle	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	2,098
CS01	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1,70
CS02	N. ID.	1,350
CS03	<i>Micrococcus luteus</i>	2,496
CS04	<i>Micrococcus luteus</i>	2,425
CS05	<i>Micrococcus luteus</i>	2,477
CS06	<i>Micrococcus luteus</i>	2,341
CS07	<i>Micrococcus luteus</i>	2,360
CS08	<i>Moraxella osloensis</i>	2,153
CS09	<i>Kocuria palustris</i>	2,163
CS10	<i>Micrococcus luteus</i>	2,327
CS11	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2,052
CS12	<i>Micrococcus luteus</i>	2,480
CS13	<i>Micrococcus luteus</i>	2,254
CS14	<i>Micrococcus luteus</i>	2,301
CS15	N. ID.	1,451
CR01	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2,023
CR02	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2,178
CR03	<i>Micrococcus luteus</i>	2,434
CR04	<i>Bacillus subtilis</i>	2,050
CR06	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,032
CR07	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2,093
CR08	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1,980
CR09	<i>Bacillus licheniformis</i>	2,083



CR10	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1,730
CR11	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1,757
CR13	<i>Micrococcus luteus</i>	2,384
CR16	<i>Micrococcus luteus</i>	2,396
CR17	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2,061
CR18	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2,033
CR20	N. ID.	1,412

N. ID.= Não Identificado.

O estudo das bactérias endofíticas associadas a diferentes exemplares genotípicos de *C. peruvianus*, revelou com base no sequenciamento do gene 16S rDNA e na análise dos espectros de massas de proteínas bacterianas por MALDI-TOF-MS, que as bactérias isoladas foram predominantemente membros do gênero *Micrococcus*, representado por 60% dos isolados de *C. peruvianus* cultivado *in vivo*, seguido pelo gênero *Pseudomonas* com 47% de isolados de somaclone de *C. peruvianus* regenerado *in vitro*. Os gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* e *Kocuria* foram detectados com menores frequências. Os isolados dos gêneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* e *Micrococcus* foram detectados na planta de *C. peruvianus* cultivada *in vivo* e em somaclone regenerado *in vitro*, enquanto isolados dos gêneros *Kocuria*, *Moraxella* e *Microbacterium* (gênero este ainda não descrito em outras espécies da família Cactaceae), foram observados somente na planta cultivada *in vivo*, e os isolados de *Bacillus* foram detectados exclusivamente no somaclone regenerado *in vitro*. Portanto, a identidade entre a comunidade bacteriana endofítica da planta de *C. peruvianus* cultivada *in vivo* e da planta regenerada *in vitro* foi baixa, 27,7%.

De acordo com Puente et al. (2009), bactérias endofíticas isoladas do cacto *Pachycereus pringlei* foram identificadas a partir do sequenciamento do gene 16S rDNA apenas em nível de gênero, não sendo encontrada nenhuma semelhança molecular em nível de espécie para todos os isolados. Em *P. pringlei* os gêneros *Bacillus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* estão entre os que ocorreram com maior frequência. Lima et al. (2015), relataram o isolamento de bactérias endofíticas em *Melocactus zehntneri* e em *Cereus jamacaru*, o qual possui alta relação genética com *C. peruvianus*. Em *C. jamacaru*, foram identificados isolados do gênero *Pseudomonas* sp., também observado na planta de *C. peruvianus* cultivada *in vivo* e no somaclone regenerado *in vitro*, no presente estudo. O isolado da espécie de bactéria *B. amyloliquefaciens* (CR10) identificada no somaclone de *C. peruvianus* regenerado *in vitro*, também foi isolada no cacto *Euphorbia trigona* Mill, dentre 13 outros gêneros como *Lysinibacillus*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Lelliottia* e *Pseudomonas*, que foram os mais representativos (Eke et al., 2019).

As espécies *Pseudomonas putida*, *Azotobacter vinelandii*, *Enterobacter sakazakii* e *B. megaterium*, estão entre as bactérias endofíticas identificadas no cacto *Mammillaria fraileana* (Lopez et al., 2011). Costa e Melo (2012) avaliaram a diversidade de bactérias endofíticas associadas *Opuntia ficus-indica* Mill, isoladas de tecido da parte aérea e raiz, nos quais, os gêneros predominantes encontrados foram *Bacillus* e *Enterobacter*. Segundo Kavamura et al. (2013), bactérias endofíticas isoladas de três espécies de cactos encontrados na Caatinga brasileira *C. jamacaru*, *Melocactus* sp. e *Pilosocereus gounellei*, apresentaram maior frequência de isolados da família *Bacillaceae* (73%), seguido da família *Paenibacillaceae* e *Enterobacteriaceae*. Estudos recentes realizados por Fonseca-Garcia et al. (2016), analisaram a composição de bactérias endofíticas presente em seis



compartimentos de *Myrtillocactus geometrizans* e *Opuntia robusta*, e foram identificados 76 isolados pertencentes aos filos bacterianos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* e *Bacteroidetes*.

A divergência genética entre plantas cultivadas *in vivo* e ao somaclone de *C. peruvianus* também pode explicar a comunidade diferencial de bactérias endofíticas identificada na planta obtida a partir da semente e na planta regenerada *in vitro*. A influência exercida pelo genótipo da planta hospedeira no recrutamento de comunidades microbianas específicas foi demonstrada em estudos com várias espécies de plantas (Bettenfeld et al., 2019). Divergência genética ao nível das enzimas (Mangolin et al., 1997; Sala et al., 2011), DNA (Eloi et al., 2017) e polissacarídeos da parede celular (Corrêa et al., 2020) foram relatados entre somaclones e plantas obtidas a partir de sementes de *C. peruvianus*. Desta forma, as variações somaclonais descritas nas plantas regeneradas *in vitro* podem levar a alterações na comunidade de bactérias endofíticas.

Deve-se considerar acerca do isolamento da comunidade endofítica de uma amostra vegetal de interesse, que ocorre naturalmente a predominância de determinados gêneros (espécies dominantes), e baixa frequência de outros gêneros (espécies secundárias) (Pamphile; Azevedo, 2002). Há também, uma estrita relação entre a presença de espécies de microrganismos endofíticos específicas a órgãos ou tecidos da planta, pois segundo Manjunatha et al. (2019), a ocorrência de determinadas espécies difere conforme o tecido e/ou órgão vegetal alvo do isolamento em plantas de soja, trigo e milho, respectivamente.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise do sequenciamento do gene 16S rRNA e a identificação por espectrometria de massas por MALDI-TOF-MS de proteínas das bactérias endofíticas associadas a plantas de *C. peruvianus* cultivada *in vivo* e ao somaclone regenerado *in vitro*, mostrou uma variação da distribuição taxonômica dos microrganismos com uma predominância de proteobactérias na planta regenerada *in vitro* e de actinobactérias na planta cultivada *in vivo*. Devido ao padrão de colonização do microbioma endofítico ser resultante da comunicação química e genética com sua planta hospedeira, esta variação taxonômica encontrada entre as comunidades endofíticas, pode ser atribuída as diferenças genotípicas e as condições de cultivo de *C. peruvianus* regenerado *in vitro* e cultivado *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ANGELETTI, Silvia. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of microbiological methods**, v. 138, p. 20-29, 2017.

ARAÚJO, Wellington Luiz et al. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1408-1422, 2009.

ARORA, Palak et al. Endophytes: A hidden treasure of novel antimicrobial metabolites. In: **Antibacterial Drug Discovery to Combat MDR: Natural Compounds, Nanotechnology and Novel Synthetic Sources**. Singapore: Springer Singapore, 2019. p.165-192.

AVANZI, Ingrid Regina et al. Rapid bacteria identification from environmental mining samples using MALDI-TOF MS analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 4, p. 3717-3726, 2017.



- BARBUDDHE, Sukhadeo et al. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5402-5407, 2008.
- BETTENFELD, Pauline et al. Woody plant declines. What's wrong with the microbiome?. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 4, p. 381-394, 2020.
- COSTA, Francisco Eduardo; MELO, Itamar. Endophytic and rhizospheric bacteria from *Opuntia ficus-indica* mill and their ability to promote plant growth in cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 6, p. 1345-1353, 2012.
- ELOI, Inácio et al. Genetic structure of phenotypic variants and somaclones of the genus *Cereus* (Cactaceae) as revealed by AFLP markers. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 325-333, 2017.
- EKE, Pierre et al. Endophytic bacteria of desert cactus (*Euphorbia trigonas* Mill) confer drought tolerance and induce growth promotion in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Microbiological research**, v. 228, p. e126302, 2019.
- FERREIRA, Fabiana Borges Padilha et al. *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg essential oil induces antileishmanial activity and remodeling of the cytoplasm organelles. **Natural Product Research**, v. 35, n. 24, p. 6112-6116, 2021.
- FONSECA-GARCÍA, Citlali et al. The cacti microbiome: interplay between habitat-filtering and host-specificity. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 150, 2016.
- HAMONTS, Kelly et al. Field study reveals core plant microbiota and relative importance of their drivers. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 124-140, 2018.
- KAVAMURA, Vanessa et al. Water regime influences bulk soil and rhizosphere of *Cereus jamacaru* bacterial communities in the Brazilian Caatinga biome. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73606, 2013.
- LE COCQ, Kate et al. Exploitation of endophytes for sustainable agricultural intensification. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 3, p. 469-473, 2017.
- LIMA, José et al. Endophytic bacteria in cacti native to a Brazilian semi-arid region. **Plant and Soil**, v. 389, n. 1, p. 25-33, 2015.
- LOPEZ, Blanca et al. Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the southern Sonoran Desert. **Archives of microbiology**, v. 193, n. 7, p. 527-541, 2011.
- LYRA, Maria et al. Isolation and molecular characterization of endophytic bacteria associated with the culture of forage cactus (*Opuntia* spp.). **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 11-16, 2013.
- MACIÁ-VICENTE, Jose et al. Metabolomics-based chemotaxonomy of root endophytic fungi for natural products discovery. **Environmental microbiology**, v. 20, n. 3, p. 1253-1270, 2018.



MANAKA, Akihiro et al. Comparison of 16S ribosomal RNA gene sequence analysis and conventional culture in the environmental survey of a hospital. **Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences**, v. 3, n. 1, p. 8, 2017.

MANGOLIN, Claudete et al. Isozyme variability in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). **Biochemical genetics**, v. 35, n. 5, p. 189-204, 1997.

MANGOLIN, Claudete et al. RAPD markers to evaluate callus tissue of *Cereus peruvianus* Mill.(Cactaceae) maintained in different growth regulator combinations. **Biochemical Genetics**, v. 40, n. 9, p. 351-358, 2002.

MANJUNATHA, Benício et al. Diversity and tissue preference of osmotolerant bacterial endophytes associated with pearl millet genotypes having differential drought susceptibilities. **Microbial ecology**, v. 77, n. 3, p. 676-688, 2019.

NOGUEIRA, Carlos et al. Performance of commercial kits and laboratory protocols for bacterial genomic DNA extraction. **Rev Panam Infectol**, v. 6, n. 2, p. 35-38, 2004.

PUENTE, Esther et al. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, n. 3, p. 389-401, 2009.

PAMPHILE, João; AZEVEDO, João. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays*. L). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.391–396, 2002.

RESENDE, Adriana et al. Genetic diversity in F1 descendents of *Cereus peruvianus* Mill.(Cactaceae) somaclones regenerated in South Region of Brazil. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 7, n. 3, p. 193-199, 2007.

RHODEN, Sandro et al. Phylogenetic analysis of endophytic bacteria, isolates from leaves of medicinal plant *Trichilia elegans* A. Juss (Meliaceae). **Genetics and Molecular Research**, v.14, p.1515-1525, 2015.

SAITOU, Naruya; NEI, Masatoshi. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SALA, Juliana et al. Esterase polymorphism and the analysis of genetic diversity and structure in cactus populations descended from *Cereus peruvianus* plants regenerated in vitro. **Biochemical genetics**, v. 49, n. 3, p. 270-282, 2011.

SANTOS, Éverton et al. *Cereus hildmannianus* (K.) Schum.(Cactaceae): Ethnomedical uses, phytochemistry and biological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. e113339, 2021.

SILVA, Mara et al. Identification of diazotrophs isolated from palm cultivars (*Opuntia and Nopalea*) using the *reca* gene. **Bioscience Journal**, v.3, p.577-583, 2015.



SILVA, Cleiziane Bispo et al. First-tier detection of intragenomic 16S rRNA gene variation in culturable endophytic bacteria from cacao seeds. **PeerJ**, v. 7, p. e7452, 2019.

TANAKA, Leonardo et al. An arabinogalactan with anti-ulcer protective effects isolated from *Cereus peruvianus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 714-721, 2010.

WRIGHT, Erik et al. A search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 3, p. 717-725, 2012.