

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL

SELEÇÃO DE *Pseudomonas* FLUORESCENTES PARA
CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO VERMELHA DA RAIZ
CAUSADA POR *Fusarium solani* EM SOJA (*Glycine max* L)

Glória Regina Botelho

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Biotecnologia Vegetal do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Doutor em Ciências

Rio de Janeiro – RJ
2001

Seleção de *Pseudomonas* Fluorescentes para controle biológico da
Podridão Vermelha da Raiz causada por *Fusarium solani* em soja
(*Glycine max* L)

Glória Regina Botelho

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação
em Biotecnologia Vegetal do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Doutor em Ciências

Rio de Janeiro – RJ
2001

FICHA CATALOGRÁFICA

BOTELHO, G.R.

SELEÇÃO DE *Pseudomonas* FLUORESCENTES PARA CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO VERMELHA DA RAIZ CAUSADA POR *Fusarium solani* EM SOJA (*Glycine max* L).

GLÓRIA REGINA BOTELHO. RIO DE JANEIRO, UFRJ, 2001.

107 p.:il., figuras

Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Palavras-Chave: 1. Soja 2. Rizosfera de soja. 3. Rizobactérias 4. *Pseudomonas* fluorescentes 5. Biocontrole 6. Tipagem bacteriana. I.

Botelho, G.R.

II. Título

Orientador (a)

Prof^a Dr^a Leda Cristina Santana Mendonça

“ Dedico esta tese a meus pais pelo imenso apoio em todos os momentos e a minha filha Victoria pelo incentivo de sua chegada em minha vida”

RESUMO

Pseudomonas do grupo fluorescente constituem grande parte da rizosfera de várias espécies vegetais e da comunidade microbiana de rizosfera em alguns solos supressivos a doenças fúngicas. Estes organismos produzem metabólitos secundários, como os antibióticos. Compostos como fenazinas, fluoroglucínóis, pirrolnitrinas, tropolonas e piocianinas têm sido isolados de culturas de *Pseudomonas* de solo, sendo, atualmente, considerados como o principal mecanismo de supressão a doenças de raízes. Foram isoladas cerca de 600 *Pseudomonas* de solo de Cerrado sob cultivo de soja, onde não foram observados os sintomas da doença Podridão Vermelha da Raiz, causada pelo fungo *Fusarium solani*. Após análises utilizando sondas para detecção de genes da produção de fenazinas, fluoruglucinol, pirrolnitrina e pioluteolina, verificou-se que 51% da coleção selecionada pela antibiose *in vitro* contra o *F. solani*, era formada por produtores de fenazinas. A Hibridização de DNA confirmou estes resultados obtidos por PCR (Polymerase Chain Reaction). Posteriormente, análises em HPLC (High Performance Liquid Chromatography), constataram que o ácido fenazina monocarboxílico (PCA – “Phenazine Carboxylic Acid”) era o composto produzido. O PCA é igualmente produzido pela estirpe 2-79 de *P. fluorescens* isolada anteriormente da rizosfera de trigo, cultivado em solos da região noroeste dos Estados Unidos da América que é capaz de inibir a “Podridão do Pé” causada pelo fungo *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Em nossas análises de antibiose *in vitro*, tanto as estirpes selecionadas como a estirpe 2-79 foram capazes de inibir o *F. solani*. A comparação genotípica das estirpes pelas técnicas de BOX e ERIC – PCR indicou que a maioria destas apresentaram perfil genotípico semelhante ao da estirpe 2-79 de *Pseudomonas fluorescens*, sugerindo pertencerem a mesma espécie. A avaliação fenotípica de algumas estirpes pelo sistema BIOLOG™ sugeriu a mesma observação. O sequenciamento genômico do fragmento responsável pela produção de fenazina de algumas estirpes revelou identidade de 99% com o gene da estirpe 2-79. Estes resultados sugerem que os genes da fenazina são bastante conservados entre as estirpes de *Pseudomonas* fluorescentes.

Os resultados obtidos indicam que as *Pseudomonas* fluorescentes fazem parte significativa da comunidade da rizosfera de soja e que o processo de plantio sucessivos do solo incrementa esta comunidade. Indicam, também, a presença expressiva de produtores de antibióticos, em especial, fenazinas, sugerindo sua função como Agentes do Controle Biológico.

ABSTRACT

Fluorescent *Pseudomonads* form the major part of rhizosphere of many plants and the microbial community of suppressive soils. Those organisms produce secondary metabolites, such as antibiotics. Compounds as phenazines, phloroglucinols, pirrolnitrins, tropolones and piocianines have been extracted from soil *Pseudomonas*. Nowadays, it is considered the most important mechanism to suppress plant disease.

Pseudomonas strains were isolated from soybean rhizosphere cultivated in Cerrado soils, where "Sudden Death Syndrome" symptoms caused by *Fusarium solani* were not observed. *Pseudomonads* were selected after antibiosis tests *in vitro* and PCR (Polymerize Chain Reaction) and analyzed utilizing phenazines, phloroglucinol, pirrolnitrins and pioluterions DNA probes. The results indicated that phenazines producers formed 51% of the *Pseudomonas* strains isolated in this study. The results were confirmed by DNA hybridization. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analyses confirmed that phenazine-1-carboxylic acid (PCA) was the compound produced by the *Pseudomonas* isolates. PCA is produced by *P. fluorescens* strain 2-79 isolated from wheat rhizosphere and it is able to inhibit "Take-all" symptoms caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. The isolates and strain 2-79 inhibited *F. solani* in new antibiosis *in vitro* tests.

Genetic fingerprinting obtained by BOX- and ERIC-PCR indicated that major part of the isolated strains is genetically similar to *P. fluorescens* strain 2-79. Phenetic fingerprinting of strains obtained by BIOLOG™ generated similar results. Sequencing of gene fragment responsible for phenazine production of some isolates indicated a 99% homology to 2-79 fragment. These results suggested that phenazine genes present in *Pseudomonas fluorescens* are very conserved.

The results indicated that fluorescent *Pseudomonads* are significant part of the soybean rhizosphere community. The cycling process improved this community. *P. fluorescens* isolates presented expressive production of antibiotic, specially, phenazines, suggesting their role as Biological Control Agents.

**TÍTULO: SELEÇÃO DE *Pseudomonas* FLUORESCENTES PARA
CONTROLE BIOLÓGICO DA PODRIDÃO VERMELHA DA RAIZ (PVR)
CAUSADA POR *Fusarium solani* EM SOJA (*Glycine max* L)**

1. INTRODUÇÃO

A soja é a principal fonte de óleos vegetais no mundo. Produz mais proteína que qualquer outra planta e pode, mesmo, substituir a proteína animal na alimentação humana, pois os aminoácidos de sua proteína são semelhantes aos de origem animal (Manara, 1988). A composição química da soja a torna um alimento altamente nutritivo: possui 35-45% de proteínas, 25-30% de materiais feculentos, 18-20% de gorduras, 5% de substâncias minerais e 10% água (Manara, 1988).

Economicamente, a soja tem grande importância mundial. A produção está baseada nas produções americana, brasileira, argentina e asiática. O maior produtor mundial é os Estados Unidos, seguidos do Brasil que é também o maior produtor da América Latina (EMBRAPA, 1996).

No Brasil, a soja foi introduzida em 1882, mas somente na década de 70 teve expansão significativa no país. A partir de 1983, consolidou-se como o produto agrícola mais importante do país (Manara, 1988). Na última safra, a produção foi de 31 milhões de toneladas e a produtividade ficou em torno de 2,5 ton./ha. O aumento significativo na produção ao longo dos anos, é devido não só as novas variedades desenvolvidas em centros de pesquisas, como a EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), como também, ao avanço das fronteiras agrícolas. A região Centro-Oeste, por suas condições geológica e climática, firmou-se como importante região produtora, sendo, hoje, uma das principais do país. Devido a importância econômica da cultura, a queda na produtividade é motivo de preocupação. A incidência de doenças é um dos mais importantes fatores de quebra na produtividade agrícola. Nos últimos anos, observou-se que na região Centro-Oeste houve significativo aumento da incidência da “Podridão Vermelha da Raiz” (PVR) causada por *Fusarium solani*. A doença foi observada pela primeira vez em São Gotardo

(MG), na safra de 1981/82 (EMBRAPA, 1996). A doença ocorre de maneira generalizada na lavoura.

Nas safras 1990/91 e 1991/92, a doença foi observada com alta frequência em diversas lavouras nos municípios de Presidente Olegário e São Gotardo, em Minas Gerais e em Arapoti, Ponta Grossa e Ventania, no Paraná. Em março de 1992, foi também observada em Planaltina, DF. Atualmente, a doença é encontrada nos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. A infecção tem início na raiz, com uma mancha avermelhada, mais visível na raiz principal, geralmente localizada um a dois centímetros abaixo do nível do solo. Essa mancha se expande, circunda a raiz e passa da coloração vermelho-arroxeadada para castanho-avermelhada a quase negra. Essa necrose acentuada localiza-se mais no tecido cortical, enquanto que o lenho da raiz adquire coloração, no máximo, castanho-clara, estendendo-se pelo tecido lenhoso da haste a vários centímetros acima do nível do solo. Nessa fase, observa-se na parte aérea, o amarelecimento prematuro das folhas e, com maior frequência, uma acentuada necrose entre as nervuras das folhas, resultando no sintoma conhecido como folha “carijó” (EMBRAPA, 1996) (Fig.1).

Alguns autores divergem quanto à chamada *forma speciale* de *F. solani* que causa a doença. Alguns consideram o *F.solani f. sp. phaseoli* como o patógeno causador da doença (O'Donnell & Gray, 1995). Outros afirmam ser *Fusarium solani f.sp. glycines* (Roy, 1997). Atualmente, a maioria dos autores considera o *F. solani f.sp.glycines*, como sendo o agente causal da doença (Huang, 1998; Li, 1998).



Fig. 1 -Sintomas de “Podridão Vermelha da Raiz” em folhas e raízes de soja.

1.1. Rizosfera e Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal

Em 1904, Hiltner propôs o termo rizosfera para descrever a região do solo sob influência das raízes. Intensa atividade microbiana e aumento destas populações ocorrem nesta região quando comparada a regiões sem a influência das raízes, devido à liberação de grande quantidade de matéria orgânica (50-100mg/g de raiz), na forma de exsudatos, lisados e mucilagem. Dezoito por cento do carbono assimilado durante a fotossíntese podem ser liberados pela raiz. Açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos graxos, nucleotídeos, vitaminas e enzimas são encontrados entre estes compostos orgânicos. Como a rizosfera é rica em exsudatos, a comunidade microbiana pode atingir até 1×10^9 células/cm³, 10-100 vezes maior que a comunidade do solo sem influência de raízes. Microrganismos rizosféricos incluem bactérias, vírus, fungos, amebas e flagelados. A rizosfera pode se estender a 1-2 mm da raiz.

O rizoplano se refere à superfície da raiz, entretanto, com o envelhecimento da raiz, as células corticais sofrem autólise e o limite entre o rizoplano e a rizosfera fica indefinido. O córtex da raiz é então colonizado por microrganismos, ficando apenas os tecidos do estelo vivos. Logo, uma parte da raiz se torna uma extensão da rizosfera, chamada de endorizosfera. O uso do termo endorizosfera tem sido questionado (Kloepper *et al.*, 1992). Apesar da intensa atividade microbiana na rizosfera, apenas 7 a 15% da superfície da raiz é coberta com microrganismos (Curl & Truelove, 1986). Estão agrupados em microcolônias, em sítios onde os nutrientes são mais abundantes. Estes incluem espaços entre células da epiderme, pêlos radiculares, lesões e sítios onde as raízes laterais surgem das células corticais. A rizosfera é um ambiente dinâmico e as suas interações têm significativo impacto sobre o crescimento e desenvolvimento da planta (Curl & Truelove, 1986).

A quantificação da influência do efeito da rizosfera sobre microrganismos é dada pela relação R:S, onde R é o número de microrganismos por unidade de peso do solo da rizosfera e S é o número de microrganismos por unidade de peso do solo não rizosférico (Alexander, 1977). Através desta relação, pode-se observar que o efeito rizosférico é mais pronunciado para as bactérias, seguido de fungos, actinomicetos e protozoários, nesta ordem. Em geral, a relação mais

comum varia entre 5 a 20 para algumas bactérias. Entretanto, pode variar de 10 a mais de 100 para alguns gêneros (Alexander, 1977). O efeito rizosférico é mais pronunciado nas bactérias gram-negativas que compõem maior parte da rizosfera.

Estes microrganismos são ecologicamente agrupados em: oportunistas que predominam nas raízes mais novas, caracterizados pelo crescimento rápido, alta capacidade competitiva e população de pequeno tamanho; e estrategistas que se caracterizam pela maior população, maior longevidade, baixa mortalidade e crescimento lento (Siqueira & Franco, 1988). São mais especializados e predominam nas raízes mais velhas. As bactérias deste grupo são denominadas rizobactérias.

Rizobactérias são bactérias associadas às plantas que são capazes de colonizar as raízes. As rizobactérias são subdivididas em grupos de efeito benéfico, deletério e neutro, baseado no efeito que causam ao desenvolvimento na planta. Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (Plant Growth Promoting Rhizobacteria - **PGPR**) são aquelas que têm habilidade de promover o crescimento de plantas, inoculando-se as sementes ou partes subterrâneas (Kloepper *et al.*, 1980). A indução do crescimento pode ocorrer através da estimulação direta da planta, seja por aumento da oferta de nutrientes ou produção de fitormônios (Lugtenberg *et al.*, 1991). As PGPR também estimulam o crescimento indiretamente, através da supressão de patógenos primários e secundários. Patógenos primários causam doenças vasculares e radiculares cujos sintomas são evidentes. Patógenos secundários são parasitos ou saprófitas que danificam, principalmente, tecidos jovens como pêlos radiculares e células corticais, e não têm sintomas evidentes.

As PGPR devem ter a capacidade de colonizar satisfatoriamente as raízes. Weller & Thomashow (1994) definem por colonização, como sendo o processo pelo qual as rizobactérias introduzidas em sementes ou partes da planta para propagação, são distribuídas ao longo das raízes que se desenvolvem em solo natural, multiplicando-se e sobrevivendo por algumas semanas na presença da microflora indígena. A colonização de raízes inclui o estabelecimento na superfície das raízes, dentro destas e/ou da rizosfera. Para colonizar adequadamente, é necessário que as PGPR sejam capazes de competir por sítios na rizosfera. Esta capacidade é descrita como a habilidade

relativa de colonização. Esta habilidade pode ser quantificada determinando-se o tamanho da população retida à raiz, comprimento e número de raízes colonizadas e/ou o tempo de sobrevivência das bactérias (Weller,1988).

Vários gêneros de bactérias produzem efeito positivo em plantas. Dentre estes, estão o grupo rizóbio e os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*. As espécies do grupo rizóbio são extensivamente usadas como fertilizantes de leguminosas. A interação entre leguminosas e plantas é bastante conhecida pela capacidade do microrganismo em fixar o nitrogênio atmosférico para a planta e receber dela carboidratos.

Espécies de *Bacillus* têm sido frequentemente utilizadas como inoculantes. Vários autores têm demonstrado a habilidade de *Bacillus* spp. em controlar doenças de plantas. Burr & Caesar (1984) relataram a eficácia de *Bacillus* spp. no controle de doenças de milho.

O gênero *Pseudomonas* inclui bactérias gram-negativas, cocobacilos móveis por flagelos polares. Pertencem à subclasse γ de Proteobacteria e contém em sua maioria *Pseudomonas* fluorescentes e não fluorescentes. Estudos de hibridização DNA-RNA-r dividem o gênero *Pseudomonas* em cinco grupos homólogos. O gênero *Pseudomonas sensu stricto* corresponde ao grupo I definido pela homologia de RNAr (Palleroni, 1984) e contém todas as espécies de *Pseudomonas* fluorescentes. Num grande ensaio fenotípico, grande número de *Pseudomonas* fluorescentes foram examinadas em suas propriedades nutricionais. Foi mostrado que *P. fluorescens* e *P. putida* são espécies bastante heterogêneas. *P. fluorescens* foi subdividida em sete biótipos. Os biótipos A,B,C,D e F foram denominados biovars (agrupamento por RNAr) (bv. I a V) e os biótipos D e E foram classificados como espécies *P. chlororaphis* e *P. aureofaciens*, respectivamente. Posteriormente, foram agrupadas como *P. chlororaphis*. A espécie *P. putida*, também, foi subdividida em biótipos A e B que se tornaram biovars A e B (Bossis *et al*, 2000)

P. fluorescens bv. V é um subgrupo heterogêneo que incluem estirpes que constantemente não podem ser classificadas porque perderam propriedades consideradas essenciais para diferenciação de outros biovars. A heterogeneidade do biovar V não permite designar estirpes de referência para este biovar. Este sistema de múltiplos biovars revela alto grau de

heterogeneidade fenotípica que provavelmente reflete a alta diversidade genômica. (Holt *et al.*, 1994; Bossis *et al.*, 2000).

Devido a sua grande versatilidade nutricional e habilidade de crescer em uma grande variedade de ambientes, várias espécies de *Pseudomonas* têm despertado interesse. Elas são encontradas em solos, folhagens, águas, sedimentos, e, como grupo, as *Pseudomonas* fluorescentes são de grande importância em diversas áreas como Fitopatologia, Tecnologia de Alimentos e Controle Biológico (Lynch, 1990). Dentre estas, as espécies *P. fluorescens* e *P. putida*, são as que mais se destacam (Schroth & Hancock, 1982).

Diversos autores têm estudado a relação entre *Pseudomonas* fluorescentes e raízes de plantas. Lemanceau *et al.*(1995), para melhor entender as particularidades que envolvem a colonização de raízes por *Pseudomonas* fluorescentes nativas, realizaram estudos fenotípicos e genotípicos de estirpes isoladas de solo não cultivado, de solo de rizosfera, de rizoplano e de tecido radicular de tomate e linho cultivados sob o mesmo tipo de solo. Observaram que as plantas tinham uma influência seletiva sobre a população de *Pseudomonas* fluorescentes e que, a intensidade de seleção variava com a planta-hospedeira, sendo parcialmente específica da planta. A maioria dos isolados de rizosfera de linho apresentava aspectos genotípicos diferentes daqueles obtidos no solo e esta diferença aumentava quanto mais íntima se tornava a relação com a planta. Este fato não era tão pronunciado nas plantas de tomate. Observaram, também que a maioria dos isolados do tecido radicular de linho era da espécie *Pseudomonas putida* bv.A, enquanto no tomate era da espécie *Pseudomonas fluorescens* bv.II.

Araújo *et al.*(1994) observou que as *Pseudomonas* fluorescentes foram bastante competitivas no rizoplano de milho, pois a comunidade aumentava significativamente, em relação a comunidade de bactérias heterotróficas totais e de gram-negativas totais. Observaram, também, que 30% das estirpes isoladas de *Pseudomonas* eram de *P.fluorescens* e 50% eram de *P. putida*.

1.2. Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (PGPR) e o Controle Biológico de Doenças de Plantas

O controle de doenças tem sido feito através do uso de agroquímicos. O uso de métodos químicos gera polêmica, devido aos riscos que a utilização maciça pode causar ao ambiente e a saúde pública, além de onerar significativamente os custos de produção da cultura. Nos últimos anos, a pesquisa em Controle Biológico de Doenças tem sido desenvolvida como uma alternativa aos métodos tradicionais. Controle Biológico é definido como sendo a redução da densidade de inóculo ou atividade causadora de doença de um patógeno ou parasito em seu estado ativo ou dormente, por um ou mais organismos, realizada naturalmente ou através de manipulação do ambiente, hospedeiro, ou antagonista, ou ainda, por introdução massal de um ou mais antagonistas (Cook & Baker, 1989).

Vários estudos demonstram que as PGPR suprimem populações de patógenos de raízes (Thomashow & Weller, 1988). A supressão de doenças ocorre por diversos mecanismos. A competição por nutrientes e a ocupação por sítios de infecção são apontadas como responsáveis por alguns processos de supressão. A bacterização de sementes de soja e ervilha com *P. putida* estirpe N1R, controlou o “damping-off”, causado por *Pythium ultimum*, devido a competição por compostos voláteis que poderiam servir de indutores ou nutrientes para o fungo (Paulitz, 1991).

Outro mecanismo de supressão ou de Controle Biológico ou Biocontrole, é a Resistência Induzida. Neste caso, a PGPR desencadeia na planta uma resposta defensiva à presença do patógeno, pela produção de determinadas substâncias. Van Peer *et al.*(1991) demonstraram que a bacterização de raízes de cravo com *P. fluorescens* estirpe WCS374 reduziu significativamente a murcha causada por *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*. Foi observado que grande quantidade de antranilato derivado das fitoalexinas dianalexina e um grupo das diantramidas se acumularam em plantas que receberam o tratamento com a estirpe. O potencial da Resistência Induzida sempre foi conhecido, entretanto, apenas recentemente, dados consistentes demonstram sua eficácia.

Sabe-se que para várias PGPR, a produção de metabólitos como sideróforos, cianetos e antibióticos é o principal mecanismo de Biocontrole.

Quase todos os microrganismos precisam de Fe para o crescimento. A sobrevivência em ambiente heterogêneo como a região da raiz, depende da habilidade de retirar Fe do ambiente. O ferro em solução aquosa apresenta-se nas formas de íon ferroso (Fe^{+2}) ou férrico (Fe^{+3}), sendo este último a forma mais insolúvel e predominante na maioria dos solos, principalmente de regiões tropicais. A concentração do íon férrico, em solução aquosa, a $\text{pH}=7.4$ é de aproximadamente 10^{-8} M que é extremamente baixa para crescimento normal dos microrganismos (O'Sullivan & O'Gara, 1992). Para sobreviver, alguns microrganismos secretam substâncias capazes de formar complexos com o Fe^{+3} e torná-lo disponível, denominadas sideróforos. As *Pseudomonas* do solo produzem sideróforos verde-amarelados, fluorescentes solúveis em água e podem ser do grupo hidroximatos e fenolatos (Raymond *et al.*, 1984). Estes sideróforos são classificados como pioverdinas ou pseudobactinas. A competição por ferro, mediada por sideróforos (pioverdina), é importante para Controle Biológico (Lopper & Buyer, 1991). Diversas observações demonstraram a função do antagonismo devido à captação de ferro efetuada pelas *Pseudomonas* spp. fluorescentes contra vários fitopatógenos *in vitro* e no solo (Buyer & Leong, 1986). Entretanto, estudos mais recentes levantam dúvidas quanto ao papel das pioverdinas (Kraus & Loper, 1992). Aparentemente, estes sideróforos contribuem para o controle apenas de certas doenças e somente quando os fatores físicoquímicos que determinam a disponibilidade de ferro no solo são favoráveis à produção e à atividade do sideróforo.

A produção de cianeto (HCN) tem sido apontada, também, como sendo um fator de inibição de doenças. *Pseudomonas* fluorescentes são insensíveis ao cianeto e muitas estirpes podem produzi-lo na presença de precursores. O cianeto gerado pela estirpe de *P. fluorescens* CHAO inibiu o fungo *Thielaviopsis basicola in vitro* e mutantes Hcn^- protegeram menos a planta contra a Podridão Negra da Raiz que a estirpe original (Voisard *et al.*, 1989). Entretanto, alguns autores têm relatado efeitos deletérios de HCN em plantas. Bakker & Schippers (1987) observaram redução no crescimento de batatas, quanto houve liberação de cianeto por *Pseudomonas* fluorescentes. Porém, a literatura enfatiza que cada tipo de planta responde de maneira diferente à presença de HCN na rizosfera.

Os antibióticos constituem um grupo quimicamente heterogêneo de pequenas moléculas orgânicas de origem microbiana que em pequenas concentrações são deletérias ao crescimento ou atividade de outros microrganismos. A importância dos antibióticos para o Controle Biológico e, de maneira geral, para o antagonismo microbiano no ecossistemas é atualmente reconhecida. O solo é dos mais ricos ambientes onde há vários tipos de interações entre microrganismos. Deste modo, é possível manipular certas interações, como o antagonismo. Em solos supressivos, esta característica fica clara, pois o estudo detalhado destes, informa como o ecossistema do solo pode ser modificado para estimular o Controle Biológico resultando em fonte de potentes microrganismos antagonistas adaptados à introdução em solo ou rizosfera. Define-se como solo supressivo, aqueles nos quais o patógeno não se estabelece ou se estabelece mas causa pouco ou nenhum dano a planta, ou ainda, quando se estabelece e causa doença por um período, mas perde a infectividade. A supressão pode ser geral ou específica. A supressão geral está diretamente relacionada à quantidade total de atividade microbiana específica. Não há um microrganismo ou grupo específico responsável por esta ação. A supressão específica possui efeito sobre indivíduos ou determinados grupos de microrganismos antagonistas aos patógenos que agem durante certo estágio do ciclo de vida do patógeno. São descritos vários solos supressivos a determinadas doenças vegetais. O mecanismo de supressão está relacionado à atividade de *Pseudomonas* fluorescentes e *Fusarium* não patogênicos capazes de competir com fitopatógenos (Cook & Baker, 1989; Alabouvette, 1990). O antagonismo de espécies de *Pseudomonas* fluorescentes é responsável pelos solos supressivos ao *F. oxysporum*, causador de murchas (Scher & Baker, 1982). *Fusarium oxysporum* não patogênico, também é escrito como inibitório às murchas, devido a competição por substratos utilizados pelas estirpes de patógenos (Cook & Baker, 1989). As *Pseudomonas* têm papel relevante na inibição de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, causador da “Podridão do Pé” em trigo (Weller & Cook, 1983). As estirpes de *P. fluorescens* 2-79 e *P. aureofaciens* 30-89 isoladas de solo supressivo a esta doença produziram antibióticos do grupo das fenazinas, como o ácido monocarboxílico fenazina (“Phenazine-1-Carboxylic Acid” – PCA).

As evidências da atividade das PGPR no Controle Biológico fazem com que haja o interesse para utilização comercial. Atualmente, existem no mercado, alguns produtos para biocontrole de origem microbiana, como o “SoilGard” e “RootShield” (*Gliocladium virens* e *Trichoderma harzianum*, respectivamente), ambos efetivos no controle de murcha de *Fusarium* em tomateiro (Larkin & Fravel, 1998).

Há, também, a possibilidade de utilização desta PGPR como vetores de genes em microrganismos geneticamente modificados (OGMs). O potencial efeito ecológico da introdução em larga escala de agentes do controle biológico ou “OGMs” nos agroecossistemas, através inoculação de sementes bacterizadas, tem sido estudado. A ampla distribuição de *Pseudomonas* associadas às raízes em solos de diferentes continentes (Keel *et al.*, 1996) pode minimizar as preocupações referentes à introdução de microrganismos não nativos, ou mesmo de geneticamente modificados.

As *Pseudomonas* spp. têm sido largamente utilizadas em estudos de utilização em Controle Biológico. Botelho *et al.*(1998) mostraram que a estirpe *P. fluorescens* BR-5 promoveu o crescimento das plantas e inibiu o desenvolvimento de vários fungos *in vitro*. A produção de antibióticos por *Pseudomonas* é apontada como o mecanismo mais eficiente de supressão de doenças e/ou estimulação do crescimento vegetal (Thomashow & Weller, 1995). Além das *Pseudomonas* spp., também são bastante estudados o fungo *Trichoderma* spp. e a bactéria do gênero *Bacillus* spp. Ambos microrganismos produzem metabólitos secundários, como antibióticos que inibem várias doenças de plantas (Frighetto & de Melo, 1995).

Na tabela 1 estão listados alguns dos produtos de origem microbiana utilizados no controle biológico de doenças de plantas, nos E.U.A.

Tabela 1 – Produtos para o Controle Biológico de Doenças (fonte USDA/ARS– E.U.A).

Produto	Agente do Biocontrole	Fitopatógeno	Culturas
Bio-Fungus	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Sclerotinia</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i> spp.	Flores, morangos, vegetais
BlightBan A506	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506	<i>Erwinia amylovora</i>	Maçã, pêssego, , tomate, cereja, batata
Conquer	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. tolassii</i>	cogumelo
Epic	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> spp.,	Algodão, leguminosas
Galltrol-A	<i>Agrobacterium radiobacter</i> 84	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Frutas, nozes, ornamentais
Intercept	<i>P. cepacia</i>	<i>R. solani</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Pythium</i> sp.	Algodão, milho, vegetais
SoilGard (GlioGard)	<i>Gliocadium virens</i> GL-21	<i>R. solani</i> , <i>Pythium</i> spp.	Ornamentais,
Mycostop	<i>Streptomyces griseoviridis</i> K61	<i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria bassicola</i> , <i>Botrytis</i> spp.	Grandes culturas, ornamentais, vegetais
Aspire	<i>Candida oleophila</i> I-182	<i>Botrytis</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.	Citrus
Biofox C	<i>Fusarium oxysporum</i> (não patogênico)	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium moniliforme</i>	Tomate, cravo, ornamentais
Polygandron	<i>Pythium oligandrum</i>	<i>Pythium ultimum</i>	beterraba

1.3. Controle Biológico através da utilização de PGPR no Brasil

Os primeiros trabalhos publicados no Brasil com PGPR testaram *Pseudomonas* fluorescentes para induzir crescimento de plântulas de tomate e café em casa-de-vegetação (Freitas, 1989; Mariano *et al.*, 1997). A partir destes resultados, vários estudos foram feitos para avaliar os aumentos no desenvolvimento das plantas através do tratamento bacteriano de partes de plantas, usado em diversas plantas. Luz (1993) relatou que *B. subtilis* aumentou a produção de grãos de trigo em 105% em experimentos de campo. Em tomate, observou-se indução no crescimento de plântulas por *Pseudomonas* fluorescentes. Os melhores aumentos nas germinações foram observados em *P. fluorescens* (60,3%), *P. marginalis* (51,7%) e *P. aeruginosa* (50,0%) (Mariano *et al.*, 1997). Plantas de café foram inoculadas com *Pseudomonas* fluorescentes. Os isolados Ps-2 e Ps-3 induziram significativamente o aumento de massa vegetal, depois de seis meses de avaliação (Freitas, 1989). Cattelan (1994) inoculou sementes de soja com suspensão de células de *Pseudomonas* spp. ou com sobrenadante desta, e observou que este último tratamento aumentou o comprimento das radículas em até 76%. Foi sugerido que a produção de substâncias de crescimento no meio de cultivo seria o mecanismo de promoção do crescimento.

Os estudos sobre controle biológico no Brasil começaram na década de 40. Entretanto, a utilização de bactérias para esta finalidade é mais recente. Luz (1993) relatou que *Bacillus subtilis* foi o agente microbiano que melhor protegeu o trigo contra a “Podridão do Pé” causada por *G. graminis* var. *tritici*. Este foi capaz de proteger a cultura em cerca de 98%. Outros experimentos mostraram que a bacterização protege contra várias doenças. Luz (1996) observou que *P. putida* biótipo B controlou a podridão comum do trigo.

Bettioli *et al.* (1992) testaram várias formulações do *B. subtilis*, bactéria capaz de inibir a “Ferrugem” comum do feijão (*Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*). Centurion (1994) selecionou *B. subtilis*, *Bacillus* spp. e *Arthrobacter* sp. antagonistas ao *Uromyces phaseoli*, causador da “Ferrugem” no feijão. Experimentos em casa-de-vegetação mostraram que três isolados de *B. subtilis* e três de *Pseudomonas* fluorescentes foram mais efetivos na proteção de plântulas contra o “tombamento” causado por *Rhizoctonia solani*

(Andrade *et al.*, 1994). Em caupi (Noronha *et al.*, 1995) e algodão (Silva *et al.*, 1996), estirpes de *B. subtilis* e *Pseudomonas* fluorescentes, também, mostraram eficiência contra *R. solani*, inclusive sendo mais eficiente que o fungicida quintozene, em caupi (Barbosa *et al.*, 1995).

Lesões causadas por *Hemileia vastatrix* em café foram controladas por suspensões *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Alcaligenes faecalis*, *Xanthomonas manihotis* e *P. rubrilineans* (Martins *et al.*, 1985). Outros estudos sobre controle de doenças por bactéria tem sido relatado. Foi observado controle de doenças em trigo, como “Podridão da Raiz” por *P. putida* e “Sarna” do trigo por *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. e *Sporobolomyces roseus* (Perondi *et al.*, 1996). No feijão, o *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. e *Arthrobacter* sp. (Bettioli *et al.*, 1992; Mizubuti *et al.*, 1995; Centurion & Kimati, 1994) controlaram a “Ferrugem”.

1.4. Impacto Ambiental decorrente da introdução de PGPR

O controle biológico de doenças de raiz utilizando microrganismos originais ou geneticamente modificados, requer a liberação destes organismos em grandes concentrações no ecossistema do solo. Por este motivo, é necessário avaliar possíveis impactos nas populações residentes. Alguns estudos não detectaram efeito deletério das *Pseudomonas* fluorescentes ao ambiente. Botelho *et al.* (1998) relataram que não houve diferença significativa nas comunidades bacterianas analisadas, quando foi inoculada a estirpe de *P. fluorescens* BR-5 em sementes de milho. Entretanto, é necessário determinar o potencial de competição de microrganismos liberados (colonização de raízes, sobrevivência na rizosfera e no solo ao redor), sua disseminação (águas subterrâneas) e seu impacto. Vários estudos sobre sobrevivência e colonização de raízes por OGMs apresentaram resultados positivos no estabelecimento destas bactérias no solo. Araújo *et al.* (1993) testaram o estabelecimento de *P. fluorescens* e *P. putida* marcadas com resistência à rifampicina, isoladas de rizosfera de milho e as respectivas estirpes geneticamente modificadas, quando inoculadas nas sementes. Estes OGMs foram obtidos pela introdução do transposon Tn5 carregando o gene TOX-cry IVB que codifica a endotoxina de *B. thuringiensis* var. *morrisoni* nas estirpes isoladas (van Elsas *et al.*, 1991). Os autores observaram que as bactérias OGMs tiveram nível de sobrevivência semelhante ao da estirpe original, sugerindo ausência de efeito deletério na adaptação ecológica. Observaram, também, que o OGM que apresentou maior índice de sobrevivência foi a BR-12, originária de uma estirpe de *P. fluorescens* que apresentava resistência espontânea à rifampicina, isolada da rizosfera de milho, designada como BR-5. Para ser efetivo no ambiente, os OGMs precisam, também, competir com a biota nativa do solo, pelo menos durante o período mais crítico para proteção da cultura. Araújo *et al.* (1994) observaram que a estirpe geneticamente modificada BR-12 foi capaz de competir com a biota nativa desde que na ausência da estirpe original.

Diretrizes e leis estão sendo desenvolvidas, em vários países, para monitoramento e liberação de microrganismos no ambiente. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (U.S. Environmental Protection Agency), por exemplo, produziu um documento denominado

“Microbial Pesticide Test Guidelines”, onde define o que são Agentes Microbianos para o Controle de Pestes (Microbial Pest Control Agents). Este Código de Regulamentação Federal, também especifica os tipos de dados e informações que devem ser submetidos à agência para análise do registro do biopesticida, fornece informações sobre os dados necessários, os padrões de avaliações aceitáveis, guias de avaliação e publicações de dados e exemplos de protocolos. Um microrganismo só é liberado para controle biológico quando não produz efeitos adversos ao ser humano e/ou ao ambiente.

No Brasil, a legislação ainda está sendo formada. Entretanto, regulamentos, como a lei constitucional nº 8974/1995 que “estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização no uso das técnicas de engenharia genética na construção, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, liberação e descarte do organismo geneticamente modificado (OGM), visando proteger a vida e a saúde do homem, dos animais e das plantas, bem como o meio ambiente”, demonstram que já há preocupações referentes ao uso de organismos exógenos. Estas preocupações fez com que fosse formada a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Algumas das várias atribuições desta comissão são: a responsabilidade de propor uma Política de Biossegurança para o País e acompanhamento técnico de OGM. A Instrução Normativa n.º 3 se aplica à liberação planejada no meio ambiente de viróides, vírus, células ou organismos multicelulares geneticamente modificados (OGMs), seja por meio de experiências de campo ou qualquer outro meio, a não ser que a liberação seja isenta.

Recentemente, a lei de Biossegurança foi alterada por meio de Medida Provisória de 28/12/2000 que “regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225, os arts. 1º, 8º, alínea "j", 10, alínea "c", 15 e 16, alíneas 3 e 4 da Convenção sobre Diversidade Biológica que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado, a repartição de benefícios e o acesso à tecnologia e a transferência de tecnologia para sua conservação e utilização...”.

Esta Medida Provisória dispõe “sobre os bens, os direitos e as obrigações relativos ao acesso a componente do patrimônio genético existente

no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ao conhecimento tradicional a ele associado e relevante à conservação da diversidade biológica, à integridade do patrimônio genético do País, à utilização de seus componentes e à repartição justa e eqüitativa dos benefícios derivados de sua exploração e sobre o acesso à tecnologia e transferência de tecnologia para a conservação e utilização da diversidade biológica”. Além disto, estabelece que é de propriedade da União, o patrimônio genético existente em seus bens, bem como os recursos naturais encontrados na plataforma continental e na zona econômica exclusiva.

1.5. Métodos de estudos de comunidades microbianas

O interesse na utilização de microrganismos para diversas finalidades, especialmente, para uso na agricultura como PGPR e/ou ACB tem crescido significativamente. Entretanto, a diversidade existente em ecossistemas, como por exemplo o solo, é pouco conhecida. Ao longo dos anos, várias técnicas têm sido desenvolvidas para estudo de comunidades microbianas. A técnica tradicional de plaqueamento em meio de cultivo permite isolar determinadas comunidades existentes para estudos mais detalhados. Entretanto, grande parte das comunidades de solo não é cultivável em meio de cultivo ou, muitas vezes não pode ser distinguida de outros membros da comunidade (Rosado *et al.*, 2000). As técnicas de microscopia propiciam a detecção de células microbianas não cultiváveis. Alguns métodos têm sido propostos para estimar a viabilidade e a atividade fisiológica destas células. O teste de Kogure é baseado no pressuposto de que células viáveis podem aparecer, apesar de não serem necessariamente capazes de formar colônias em placas em poucos ciclos de divisão celular (Kogure *et al.*, 1979). Neste mesmo pressuposto é baseada a técnica da epifluorescência que utiliza marcadores fluorescentes conjugados a anticorpos específicos expressos pelas células microbianas (Binnerup *et al.*, 1993). Estas técnicas têm sido utilizadas para o monitoramento de populações de *Pseudomonas fluorescens* introduzidas em solos ou rizosfera (Normander *et al.*, 1999; Mascher *et al.*, 2000)

Por várias décadas, as bactérias têm sido caracterizadas, agrupadas e identificadas de acordo com poucas características fenotípicas, como morfologia, pigmentação, reação a corantes, presença ou ausência de esporos, necessidades nutricionais, habilidade de produzir ácidos de açúcares e sensibilidade a inibidores. Estes métodos simplificados de caracterização são a base dos sistemas de classificação e identificação.

A identificação de microrganismos necessita de culturas puras. Para identificação de um microrganismo é necessário, antes, caracterizá-lo. Esta caracterização consiste na descrição qualitativa de propriedades relativas à morfologia, cultivo, nutrição, bioquímica, metabolismo, proteínas, ácidos nucleicos, patogenicidade e ecologia. Devido ao grande número de microrganismos distribuídos em uma variedade de grupos taxonômicos

diferentes, é muito difícil a padronização de método para caracterização e identificação. Entretanto, há a necessidade de método padronizado, usando-se requerimentos mínimos. Este método baseia-se em testes bioquímicos, que caracterizam o perfil metabólico do microrganismo. Este método está sendo substituído por outros como tiras de papel, discos e baterias de testes sob a forma de “kits”. Estes novos métodos oferecem a vantagem de diminuir o tempo de análise (Yano & Valarini, 1998), o que é importante em estudos de comunidades microbianas, onde são identificados diversos microrganismos. Garland & Mills (1991) descreveram técnica cultural para caracterização de comunidades bacterianas baseada na inoculação de microplacas de Biolog Gram Negativo (GN) (Biolog, Inc., Hayward, CA) com amostras ambientais, que gera padrões de utilização de fonte única de carbono. O sistema BIOLOG GN foi inicialmente desenhado para classificação de isolados bacterianos com base na sua capacidade de oxidar 95 diferentes fontes de carbono. Esta técnica têm sido utilizada numa série de estudos relacionada à associação entre raiz-bactérias (Garland, 1996; Haas *et al.*, 1995; Di Giovanni *et al.*, 1999). Evidentemente, devido às limitações de quaisquer técnica, a totalidade da comunidade não é representada. Entretanto, a avaliação simultânea de 95 diferentes fontes de carbono, coleção de dados computadorizados e potencial para comparação rápida de amostras ambientais representam algumas vantagens sobre os métodos culturais convencionais.

Recentemente, métodos baseados na análise do genoma dos organismos têm permitido maior precisão no estudo da diversidade microbiana, e fez surgir uma nova especialidade em Ecologia, denominada Ecologia Microbiana Molecular (De Bruijn *et al.*, 1997).

Os métodos baseados na análise de ácidos nucléicos são frequentemente mais rápidos, mais estáveis, constantemente refletem relações filogenéticas e arranjam estirpes em grupos. Protocolos de hibridização do DNA formam a base para determinação do gênero e espécie de microrganismos. As hibridizações envolvem a detecção de sequências de DNA específicas. Esta detecção é determinada pela ligação de um fragmento de DNA homólogo a uma sequência-alvo (sonda) que pode ser marcada radioativamente ou não. A hibridização pode ser direta (extração direta do DNA

– “Southern”) ou com as próprias colônias bacteriana (hibridização de colônias) (Rosado *et al.*, 2000).

Outras técnicas que utilizam a digestão total do DNA usando endonucleases que sempre cortam o genoma (ex: Análise com Enzima de Restrição) ou não (ex: “Pulse Field Gel Eletroforesis, PFGE”; Field Inversion Gel Eletroforesis, FIGE), análise de plasmídeos, “Restriction Fragment Length Polymorphism analyses, RFLP” e análise de gene ribossomal 16S (ex: sequenciamento) são frequentemente usadas para fornecer informações a nível de espécies-subespécies-estirpe (Lee *et al.*, 1996; Muyzer *et al.*, 1993; Liesack *et al.*, 1997).

Vários protocolos foram descritos para extração de ácidos nucleicos do ambiente (Ogram *et al.*, 1987; Smalla *et al.*, 1993). Dois protocolos serviram como base para desenvolvimento de protocolos mais simples e rápidos. O primeiro utiliza lise direta *in situ*, no qual a lise celular ocorre diretamente da amostra de solo (Ogram *et al.*, 1987). No segundo processo de extração/lise, as células são separadas do solo mediante uma série de centrifugações diferenciais e, então, lisadas (Holben *et al.*, 1988). Os protocolos com base na extração direta de RNA do solo resultam, muitas vezes, em RNA de baixa pureza. Técnicas mais recentes permitem obter DNA e RNAr com maior rendimento e pureza (Rosado *et al.*, 2000)

Vários métodos de classificação e identificação de estirpes são baseados na amplificação de DNA por reação em cadeia de polimerase (“Polymerase Chain Reaction” – PCR). Em geral, duas classes de protocolos para PCR são empregadas . A primeira classe envolve a amplificação de um ou poucos fragmentos específicos do DNA, como porções do operon de rRNA, geralmente seguido de sequenciamento de DNA ou análise de restrição (ARDRA). Também, as regiões intergênicas variáveis de genes do RNA 16S e 23S ou regiões variáveis do gene tRNA são amplificadas e analisadas. Além disto, informação do sequenciamento do DNA sobre um gene particular ou região permitiu a amplificação de segmentos do DNA que são diagnóstico para gêneros, espécies e estirpe. A técnica denominada eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE – “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”) permite analisar produtos de PCR de acordo com suas sequências de pares de base, e não com diferenças nos tamanhos dos produtos. O DGGE utiliza géis

de poliacrilamida contendo um gradiente linear de desnaturantes (uréia e formamida). Desta maneira, permite a determinação da diversidade genética de comunidades microbianas naturais e, também, a identificação filogenética dos membros da comunidade (Muyzer *et al.*, 1993). Uma variação desta metodologia é o TGGE (“Temperature Gradient Gel Electrophoresis”) que se baseia na utilização de um gradiente térmico e concentração constante de desnaturantes (Rosembaum & Riesner, 1987).

A segunda classe de protocolos para PCR utiliza pequenas sequências de DNA que servem como “primers” para amplificar numerosos fragmentos distintos de DNA genômico. Quando estes fragmentos são eletroforeticamente fracionados por tamanho, os padrões de bandas resultantes produzem perfis específicos de espécies ou estirpes. No caso de microrganismos, dois protocolos foram desenvolvidos. O primeiro utiliza pequenos “primers” de sequências arbitrárias (RAPD) ou “primers” maiores combinados com baixas temperaturas de anelamento (AP-PCR) para amplificar fragmentos de DNA de comprimentos variáveis.

As bactérias, como outros organismos (Wyman & White, 1980), apresentam locus com alto grau de polimorfismo, resultante de mudanças de algumas bases. Estas variações geram os “Restriction Fragment Length Polymorphisms” (RFLP). As análises de RFLP podem ser usadas como métodos para tipagem genética de estirpes bacterianas. Uma análise do genoma bacteriano bastante utilizada, é a que detecta variações de sequências dentro de operons que codificam para o RNA ribossomal (Welsh & McClelland, 1990). Estas regiões são bastante conservadas, tanto quanto variáveis. As regiões conservadas são usadas para detectar fragmentos de DNA que contêm genes do RNAt, enquanto as regiões variáveis são a base para os RFLPs.

Um método semelhante, utilizando sequências de RNAt como “primers” de PCR (Welsh & McClelland, 1991), gera padrões de fragmentos espécie - específicos para bactérias, que podem ser, em seguida, analisados por “RAPD fingerprinting” de alta resolução.

O segundo tipo é baseado na ocorrência de sequências naturais, altamente conservadas e repetitivas no DNA presentes em várias cópias nos genomas de muitas bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas (Lupski & Weinstock, 1992; De Bruijn, 1992; Wood *et al.*, 1993). Três famílias

de sequências repetitivas foram identificadas, incluindo a sequência de 35-40bp (Repetitive Extragenic Palindromic - REP-PCR), o elemento BOX de 154bp (BOX-PCR), composto de três subunidades (boxA, boxB e boxC) e a sequência de 124-127bp (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - ERIC-PCR) (Versalovic *et al.*, 1994). Estas sequências parecem estar localizadas em posições intergênicas distintas ao redor do cromossoma (Dimri *et al.*, 1992). REP, e também a sequência conservada no centro de ERIC, tem repetições invertidas com potencial para formar “stem-loop” estáveis. Os elementos repetitivos podem estar presentes em ambas orientações no cromossoma e as regiões conservadas podem servir como sítios de ligação para “primers”. Os “primers” são desenhados para leitura fora das repetições invertidas em REP e ERIC (Versalovic *et al.*, 1994) e da subunidade boxA de BOX (de Bruijn *et al.*, 1997).

O uso dos “primers” para estas técnicas levam a amplificação seletiva de regiões do genoma localizadas entre as sequências de REP, ERIC e BOX. Os respectivos protocolos são citados como REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR, sendo denominados conjuntamente como *rep*-PCR (Versalovic *et al.*, 1994). As bandas amplificadas são fracionadas por tamanho através de gel para produzir padrões complexos para caracterização.

A análise da grande quantidade de dados que são as múltiplas bandas geradas por *rep*-PCR requer o uso de computador. Um dos programas utilizado é o GelCompar (Applied Maths, Bélgica). Os géis são fotografados e as imagens levadas ao computador através de “scanners”. Estes são normalizados de acordo com padrões de referência e/ou por alinhamento de picos de referência interna. A retirada de imperfeições da imagem são efetuadas e cerca de 1000 padrões podem ser agrupados usando um dos vários coeficientes e algoritmos de agrupamento. Além disto, as colunas (na imagem) podem ser eletronicamente rearranjadas para melhorar a visualização e a comparação dos perfis de *rep*-PCR. O GelCompar, também, possui uma biblioteca e um módulo de identificação para comparar novos perfis a uma base de dados.

A análise dos padrões genotípicos necessita uma simplificação dos dados originais pela geração de uma matriz de proximidade baseada no critério de similaridade ou não. Estas matrizes de proximidade podem ser

estabelecidas usando um grande espectro de coeficientes. O método inicial de comparação, usando o coeficiente de similaridade considera apenas a presença ou ausência de uma banda. O aperfeiçoamento do método, também, utiliza a informação fornecida pela posição da banda, mas adiciona mais peso ao emparelhamento das bandas do que a sua ausência. GelCompar oferece um coeficiente que permite emparelhar bandas proporcionalmente com seu grau de justaposição (de Bruijn *et al.*, 1996).

O agrupamento de uma coleção de padrões genotípicos pode ser feita de diferentes maneiras. A entrada de dados em algoritmo de agrupamento é uma matriz de proximidade ou semelhança e geralmente, a saída é um dendograma ou apresentação de dados em três dimensões. Proximidades relativas podem ser determinadas usando um largo espectro de coeficientes por comparação de um ou mais aspectos de perfis e esta análise resulta na geração de unidades de similaridade e dissimilaridade específicas.

Alguns algoritmos podem ser utilizados para análises hierárquicas ou agrupamentos divisíveis, levando à geração de dendogramas. O método “unweighted pair-group method using arithmetic averages” (UPGMA) é frequentemente usado. Este método, também, pode ser aplicado, a análise de perfis genômicos por rep-PCR (Versalovic *et al.*, 1994)

As novas técnicas culturais e moleculares citadas acima, permitem avaliar com mais precisão, se a introdução de PGPR interfere ou não no equilíbrio do ecossistema. Uma avaliação precisa do comportamento de PGPR e de Agentes do Controle Biológico podem não só prevenir problemas de ordem ambiental, mas também, evitar que haja falha na introdução de microrganismos que têm grande potencial de inibição de doenças, entretanto, não se adaptam ao ambiente em que estão sendo introduzidos.

1.6.A produção de antibióticos por PGPR

Nos últimos anos, avaliações envolvendo estudos moleculares e de genética, associadas às análises específicas e a sistemas de detecção têm mostrado efetivamente, que a supressão de algumas doenças de raízes é mediada por antibióticos produzidos por PGPR na rizosfera (Cook *et al.*, 1995). A estratégia básica extensamente empregada para determinar a função de um gene específico ou de certa característica num processo de Biocontrole por PGPR, envolvem: desenvolvimento de avaliação que demonstre a atividade no Controle Biológico; seleção de estirpes naturais com atividade no Controle Biológico; mutagênese das estirpes; procura de mutantes que não apresentem a característica desejada; preparação de biblioteca genômica do DNA original e complementação dos mutantes para restaurar a característica desejada (Weller & Thomashow, 1994). Estudos moleculares têm sido direcionados, principalmente, para as *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente que produzem um ou mais antibióticos, como fenazina, fluoroglucinol, pirrolnitrina e pioluteorina.(Fig.2).

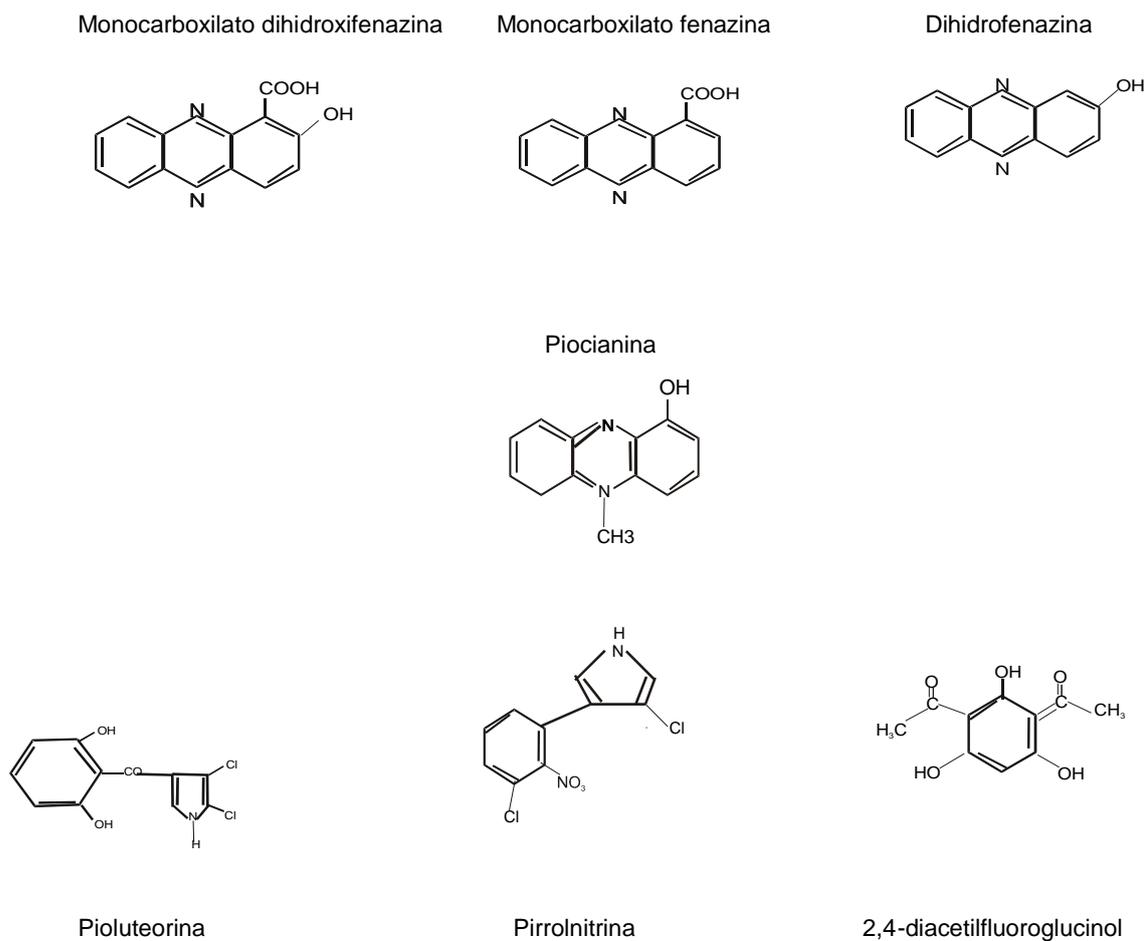


Fig. 2- Antibióticos produzidos por *Pseudomonas* spp. fluorescentes

Os loci biossintéticos destes antibióticos foram clonados e todos, com exceção do referente à pioluteorina, foram completamente sequenciados. (Bangera & Thomashow, 1996; Hammer *et al*, 1995; Kraus & Loper, 1995). Os resultados obtidos pela aplicação de técnicas moleculares e isolamento direto do antibiótico demonstram que efetivamente, estes antibióticos são produzidos na esferosfera e rizosfera e têm grande importância na supressão de patógenos de plantas existentes no solo (Thomashow & Weller, 1988; Weller & Thomashow, 1993; Kraus & Lopper, 1995). Atualmente, a fenazina e o fluoroglucinol são os metabólitos mais intensamente pesquisados.

Os fluoroglucinóis são metabólitos fenólicos encontrado em bactérias e plantas, com atividade antifúngica e antibacteriana (Keel *et al.*, 1992; Levy *et al.*, 1992); fitotóxica (Keel *et al.*, 1992), antiviral (Tada *et al.*, 1990) e anti-helmíntica (Bowden *et al.*, 1965). O 2-4 diacetilfluoroglucinol (PhI) é o mais estudado, pois é produzido por *Pseudomonas* spp. fluorescentes originárias de várias partes

do globo (Keel *et al.*,1992; Levy *et al.*, 1992; Fenton *et al.*,1992). É considerado o principal ou mesmo o único metabólito associado a supressão de vários patógenos (Weller & Thomashow, 1993). A estirpe de *Pseudomonas fluorescens* CHAO foi isolada de solo supressivo à doença “Podridão Negra da Raiz” do tabaco causado por *Thielaviopsis basicola*, na região de Morens – Suíça (Stutz *et al.*, 1986). Esta estirpe produz fluoroglucinol (PhI), assim como, monoacetilfluoroglucinol, cianeto de hidrogênio, pioluteorina, vários compostos bioativos (Voisard *et al.*,1994). O PhI contribui para a supressão da “Podridão Negra da Raiz” em tabaco e é um dos principais determinantes na supressão da “Podridão do Pé” em trigo, causado por *G. graminis* var. *tritici* (Keel *et al.*,1992). Um mutante Tn5 PhI⁻ da estirpe CHAO foi menos inibitório à *T. basicola* e *G. graminis* var. *tritici*. A complementação do mutante, com fragmento de 11 kb da biblioteca genômica da estirpe CHAO, restaurou amplamente a produção de PhI, a inibição do fungo e a supressão de doenças. O PhI também pode ser isolado da rizosfera de trigo colonizado pela estirpe original e pelo mutante complementado (Keel *et al.*,1992).

A estirpe de *P. fluorescens* Q2-87 foi isolada de rizosfera de trigo, cultivado em solo supressivo à “Podridão do Pé”. Esta estirpe também produz PhI, além de HCN e monoacetilfluoroglucinol (Shanahan *et al.*, 1992). Mais uma vez, os estudos mostraram que o PhI é um dos envolvidos na supressão da doença (Weller & Thomashow, 1993). Os genes para produção deste antibiótico estão contidos em um fragmento de DNA genômico de 6,5kb que transferiu a capacidade biossintética do PhI, para estirpes de *Pseudomonas* que não produziram o antibiótico (Bangera & Thomashow, 1996). Observou-se que o locus responsável pela produção de PhI, é extremamente conservado entre as *Pseudomonas* associadas às raízes ao redor do mundo (Keel *et al.*, 1996). A análise do fragmento de DNA de 6,5kb revelou seis “Open Reading Frames” (ORFs). Os designados como *phIA*, *phIC*, *phIBI* e *phID* estão contidos numa unidade de transcrição única necessária para produção de PhI (Bangera & Thomashow,1996; 1997). Este grupo de genes está margeado de um lado por um gene transcrito divergentemente, designado *phIF*, e do outro lado, por um gene colinear, mas transcrito separadamente, *phIE*. O *phIF* é um regulador da síntese de fluoroglucinol, enquanto o produto de *phIE*, uma permease da membrana, pode funcionar como exportador de PhI. Este, também, está

associado ao pigmento vermelho presente no meio quando PhI é produzido (Bangera & Thomashow, 1996; 1997; Keel *et al.*, 1996).

Provavelmente, PhI é sintetizado via reações sucessivas de condensação do acil, com acetilação do monoacetilfluoroglucinol, como último passo (Thomashow, 1996). Entretanto, a PhID tem poucas sequências similares às enzimas de condensação de acil em procariontes, incluindo aquelas necessárias para síntese de policetídeos. No entanto, a PhID é homóloga à chalcone de plantas e sintetase estilbeno que catalizam reações similares a produção de flavonóides e fitoalexinas, importantes na defesa vegetal. Estes paralelos genéticos e funcionais ratificam a origem evolucionária comum destas enzimas.

Pioluteorina é um tetraciclídeo clorídrico fenólico com atividades antimicrobiana e fitotóxica. É sintetizado pela adição serial de unidades de acetila em prolina ou unidades iniciadoras equivalentes derivadas do ciclo do ácido tricarbóxico. É um antibiótico altamente inibitório ao *Pythium ultimum*, mas não a outros patógenos do algodão (Howell & Stipanovic, 1980). O efeito destes antibióticos sobre o *Pythium* em culturas diferentes têm apresentado resultados conflitantes (Kraus & Loper, 1992; Maurhofer *et al.*, 1992). Diferenças entre os desenhos experimentais podem ser responsáveis por estes resultados.

Fragmentos clonados, contendo inserções e sequências adjacentes de mutantes de *P. fluorescens* Pf-5 deficientes em pioluteorinas, foram usados para identificar um cosmídeo do clone original. Este continha uma região genômica com sítios de inserção Tn5 de sete mutantes Plt⁻. Este fragmento de DNA de 21kb parcialmente restaurou a produção de pioluteorina a um mutante de Pf-5 (Kraus & Loper, 1995). O tamanho da região *plt* e a especificidade fenotípica de mutações dentro deste, são consistentes com um grupo de genes que codificam enzimas biossintéticas. Análise da sequência do DNA desta região identificou dois grandes genes, *pltB* (7,4kb) e *pltC* (5,3kb), com produtos de 2.458 e 1.774 aminoácidos, respectivamente, que estão ligados a formação de pioluteorinas (Thomashow & Mavrodi, 1997). A similaridade foi maior com o Tipo I multifuncional de sintases policetídeos (PKSs), em que cada um possui um ou mais módulos enzimáticos, incluindo a cetooxil sintase, aciltransferase e centro ativos catalíticos de proteínas carreadoras de acil. Um módulo separado

cataliza a condensação e reação de modificação necessária para adicionar unidades compostas de dois carbonos na forma de um Co-A tioéster para alongar o esqueleto de policetídeo. O produto do PltB contém dois módulos e um terceiro foi identificado em PltC. A presença e organização destes centros ativos acil estão de acordo com uma regra para a formação de anel de resorcinol “moiety” de Plt. Porém, genes adicionais contidos no locus, também, podem ser necessários para completar o processo (Thomashow & Mavrodi, 1997).

Pirrolnitrinas são os mais ativos antibióticos de uma família de fenilpirrol clorados produzidos por espécies de *Pseudomonas*, a partir do triptofano através de uma série de cinco a seis reações que incluem a cloração do benzeno e de anéis de pirrol, rearranjo do esqueleto, descarboxilação e de um grupo amino para um nitro. A biossíntese de pirrolnitrinas é amplamente distribuída entre as *Pseudomonas*, e muitas delas com atividade em Controle Biológico. *P. fluorescens* Pf-5 aumenta a emergência e sobrevivência de plântulas de algodão em solos infectados com *Rhizoctonia solani*, e o antibiótico também foi ativo *in vitro* contra *Alternaria* sp., *Thielaviopsis basicola* e *Verticillium dahliae* (Howell & Stipanovic, 1979). Esta estirpe, também, inibiu *Pyrenophora tritici-repentis*, agente causal da doença “Mancha marrom” em trigo *in vitro* (Pfender *et al.*, 1993). Estirpes de *P. cepacia* com alto nível de produção de pirrolnitrina suprimiu o crescimento de hifas e o “Damping-off” em beterraba causado por *Aphanomyces cochliodes* (Homma, 1994).

Um cosmídeo contendo sequências de *P. fluorescens* BL915 (isolada por Hill *et al.*, 1994) envolvido na produção de pirrolnitrina (Prn) foi identificado (Hammer *et al.*, 1997) pela hibridização com DNA contendo uma inserção Tn5 e sequências marginais de um mutante. Sequências no cosmídeo, necessárias para a síntese, foram localizadas num segmento de 6,2kb por mutagênese Tn5 e reintrodução no genoma do mutante de BL915 (Hammer *et al.*, 1997). Este segmento contém um grupo de quatro grandes (ORFs) colineares. Cada ORF é precedido por um sítio típico de ligação a ribossoma, dois deles (ORFs 1 e 2, subsequentemente, designados *prnA* e *prnB*) parecem ter tradução acoplada. O grupo inteiro é flanqueado por sinais de terminação de transcrição, sugerindo que eles são expressos como uma unidade transcricional. Mutações de deleções em cada ORFs resultou num fenótipo Prn⁻ que foi complementado

quando o gene correspondente foi fundido a um promotor potente e expresso *in trans* de um plasmídeo.

A provável sequência de aminoácidos prediz uma proteína de 567 aminoácidos com extrema similaridade com o produto do gene *chl*, uma enzima de cloração envolvida na síntese de tetraciclina. Esta conservação de sequências sugere que as funções de PrnC, em uma das duas etapas de cloração da via biossintética proposta para Prn. Três regiões do produto de *prnD*, uma proteína de 363 aminoácidos assemelha-se com centros ativos conservados da dioxigenase e de enzimas desmetilases. A PrnD cataliza a oxidação de grupos amino de aminopirrolnitrina para grupo nitro de pirronitrina, a etapa final no caminho biossintético proposto (Hammer *et al*, 1997).

As fenazinas são compostos heterocíclicos nitrogenados e pigmentados produzidos por bactérias pela via do ácido chiquímico (Turner & Messenger, 1986) e são os principais envolvidos na habilidade da estirpe de *P. fluorescens* 2-79 e de *P. aureofaciens* 30-84 em suprir “Podridão do pé” em trigo e cevada. Ambas estipes produzem o ácido monocarboxílico fenazina (PCA), mas a estirpe 30-84, também produz os derivados do PCA, ácido monocarboxílico dihidroxifenazina e dihidroxifenazina (Pierson III & Thomashow, 1992), além do cianeto de hidrogênio. Mutantes deficientes na produção de fenazina de 2-79 e 30-84 reduziram a habilidade de suprir a doença. A complementação genética restaurou a atividade de Biocontrole comparável ao das estirpes originais. As duas estipes foram isoladas de raízes de trigo cultivado em solos dos Estados Unidos da América, naturalmente supressivos à doença. A estirpe de *P. aureofaciens* PGS12 foi isolada de raiz de milho (Georgakopoulos *et al.*, 1994a) e mostrou ter um amplo espectro de ação contra fungos fitopatogênicos. Produz, também, PCA e duas dihidroxifenazinas e cianeto de hidrogênio, além de pirrolnitrina e ácido indolacético (Georgakopoulos *et al.*, 1994a; 1994b).

Estudos utilizando mutantes mostraram que, dependendo das condições de solo e avaliação, cerca de 60% a 90% da capacidade de supressão da estirpe 2-79 para a “Podridão do pé” em trigo estava associada à produção de fenazina (Thomashow & Weller, 1988; Ownley *et al.*, 1992). A biossíntese de fenazina não está associada somente à inibição de doenças radiculares, mas, também, à capacidade adaptativa do microrganismo ao ambiente. A produção de fenazina está associada à competitividade e persistência das estirpes 2-79 e

30-84. As populações de mutantes não produtores de fenazinas de ambas estirpes declinaram mais rapidamente que as das estirpes originais ou dos mutantes complementados em rizosfera ou solo, mas não em solo pasteurizado, sugerindo que o antibiótico contribui para competitividade contra os microrganismos naturais. Foi observado, também que a perda da habilidade em produzir fenazina, resultou na redução da sobrevivência em solo natural e colonização da rizosfera de trigo (Mazzola *et al.*, 1992).

Os grupos de genes de fenazina de 2-79 e 30-84 são extremamente conservados. Cada grupo tem aproximadamente 8,5kb e incluem genes regulatórios designados *phzI* e *phzR* (Pierson III *et al.*, 1995; Wood & Pierson III, 1996; Mavrodi *et al.*, 1998), assim como, operon de sete genes biossintéticos designados *phzABCDEFG* em 2-79 (Mavrodi *et al.*, 1998 - fig.3) que corresponde a *phzXYABCDE* em 30-84 (Pierson III *et al.*, 1995; Mavrodi *et al.*, 1998). A expressão de *phzFAB* em 30-84 é necessária para produção de PCA em *Escherichia coli* e *phzC* está envolvido na conversão de PCA para ácido monocarboxílico dihidroxifenazina (Pierson III & Thomashow, 1992; Pierson III *et al.*, 1995;).

Para determinar que genes do locus biossintético da fenazina são essenciais para a produção de PCA, o cassete Kan^r foi inserido nos genes *phzC*, *phzD*, *phzE* e *phzG* e cada gene desconectado foi introduzido no genoma da estirpe 2-79 por recombinação. Inexplicavelmente, não foi possível recuperar recombinantes de *phzA*, *phzB* e *phzF*. As inserções do cassete Kan^r nos genes *phzC*, *phzD* e *phzE* interferiram na produção de fenazina e os mutantes foram completamente deficientes na biossíntese de PCA (Fig.3). A estirpe 2-79 de *P. fluorescens* MXG, com uma inserção de Kan^r em *phzG*, foi capaz de produzir PCA. Porém, a produção foi em torno de 1,3% do produzido pela estirpe original (Mavrodi *et al.*, 1998)

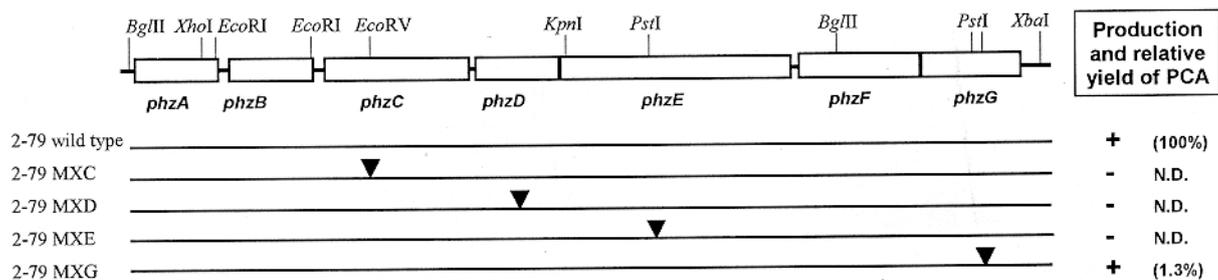


Fig.3 – Análise da biossíntese de fenazina em mutantes de estirpe 2-79 de *P.fluorescens* por substituição de genes. - Os triângulos mostram a localização das inserções do cassete Kan^r no cromossoma dos mutantes da estirpe 2-79. N.D., Não Detectado. (Mavrodi *et al.*, 1998)

Entretanto, o mecanismo exato de síntese e a identificação de intermediários metabólicos continuam desconhecidos. Mavrodi *et al.*(1998) observaram que os produtos de *phzC*, *phzD* e *phzE* têm significativa homologia com enzimas bem caracterizadas das vias biossintéticas do chiquimato e triptofano. Estas observações forneceram novas informações sobre a via biossintética das fenazinas em *Pseudomonas* spp. fluorescentes (Fig.4).

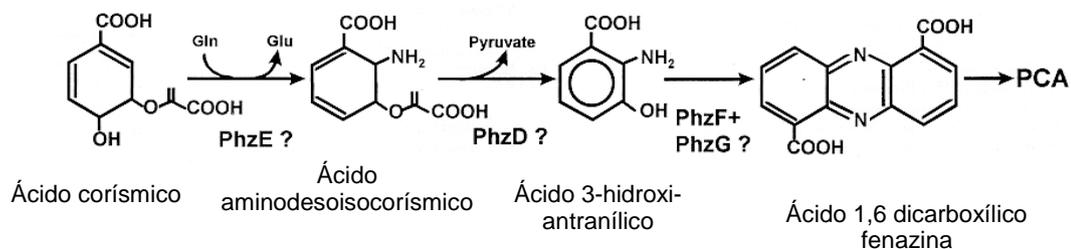


Fig.4 – Ação proposta de PhzC, PhzD, PhzE, PhzF e PhzG na biossíntese de PCA (Mavrodi *et al.*, 1998)

PhzC (PhzF na estirpe 30-84) assemelha-se a 3-desoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato sintase que é o ponto de bifurcação da via do chiquimato. PhzD e PhzE (PhzA e PhzB em 30-84) assemelham-se a 2,3-dihidro-2,3-dihidroxi-benzoato sintase (isocorismatase ou EntB) e antranilato sintase de enteroquelina e do caminho biossintético do triptofano, respectivamente; estas enzimas podem modificar e condensar corismato, produzindo o anel heterocíclico da fenazina. Os produtos de *phzF* e *phzG* atuam na condensação de duas moléculas 3-hidroxiantranilato, ou um precursor similar para gerar o núcleo de fenazina. Análise da sequência de PhzF não revelou similaridades com outras proteínas de função conhecida. Entretanto, PhzG assemelha-se a piridoxamina-5'-fosfato oxidase bacteriana que funciona na síntese de piridoxina (vitamina B₆) e na conversão de piridoxamina-5'-fosfato para piridoxal fosfato, um cofator para numerosas reações de transaminação. Outros passos no caminho biossintético da fenazina, presumivelmente, envolvem intermediários e enzimas comuns ao caminho do chiquimato (Thomashow, 1996; Mavrodi *et al.*, 1998).

Não foi observada similaridade entre os produtos de *phzA* e *phzB* e sequências de proteínas de várias bases de dados. Entretanto, PhzA e PhzB são similares entre si. Isto sugere o resultado de um evento de duplicação. Os homólogos *phzA* e *phzB*, também, foram identificados no locus biossintético da estirpe 30-84. A análise funcional indicou que nas estirpes 2-79 e 30-84, estes genes influenciam os tipos e quantidades de compostos aromáticos e heterocíclicos sintetizados como um resultado da expressão dos genes *phz*. Assim, *E. coli* que possuíam o locus *phz* completo sintetizavam grande quantidade de PCA, enquanto os que possuíam apenas os genes *phzCDEFG* produziam grande quantidade de uma mistura de compostos aromáticos e heterocíclicos contendo nitrogênio, na qual havia quantidade mínima de PCA. PhzA e PhzB podem estabilizar um complexo biossintético de multienzimas da fenazina. Na ausência destes, o sistema biossintético funciona, mas a especificidade e, talvez, a eficiência caem drasticamente (Thomashow, 1996; Mavrodi *et al.*, 1998).

2. OBJETIVOS

- I. Formação de coleção de *Pseudomonas* do grupo fluorescente isoladas de raízes de soja com potencial de estimulação do crescimento de plantas e/ou de supressão de doenças, em especial a Podridão Vermelha da Raiz.
- II. Verificação da produção de antibióticos em estirpes selecionadas
- III. Análises genotípica e fenotípica das estirpes de *Pseudomonas*
- IV. Sequenciamento de fragmentos de genes responsáveis pela produção de antibióticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e análise de solo de região de Cerrado

Foram coletadas amostras simples de solo a profundidade de 0-5 cm de 24 pontos da Fazenda Santa Fé, produtora de grãos de soja e milho, na região de Uberaba, MG (Fig 3). Doze amostras foram retiradas de pontos onde foram observados sintomas da doença Podridão Vermelha da Raiz (PVR), causada pelo fungo *Fusarium solani*, e a outra metade de pontos onde não havia sintomas. As amostras de solo foram retiradas da rizosfera de plantas de soja em plena formação de vagens (fase R4) cultivadas nestas áreas. As amostras foram transportadas em caixas da região de coleta.

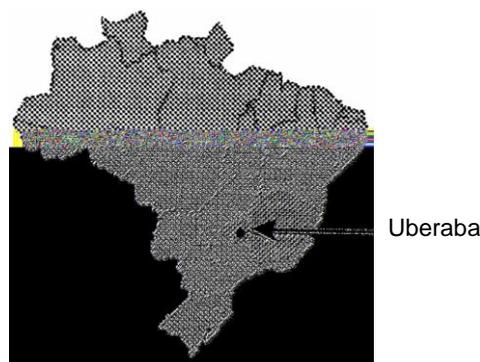


Fig. 3 – Região de Uberaba – Minas Gerais- MG – Brasil

Foram escolhidas duas amostras (amostra 9 – UN e amostra 4 – UQ) de solo dos pontos onde não foram observados sintomas, para isolamento de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente, como possíveis agentes do controle biológico da doença PVR. Estas amostras foram analisadas pelos laboratórios da EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Solos – Rio de Janeiro – RJ (tabelas.2 e 3). A amostra nº 9 foi processada cerca de uma semana após a coleta e transporte para o laboratório de Ecologia e Taxonomia Microbiana (IMPPG –CCS – UFRJ). As demais foram estocadas a temperatura ambiente e, após um mês, foi processada a amostra nº 4.

Tabela 2 – Análise química das amostras de solo de Cerrado

Amostra	pH água 1: 2,5	Al meq/100mg	Ca + Mg meq/100mg		Na ppm	K ppm	H + Al meq/100mg	P ppm
4	5.8	0.0	3.8	1.1	5	101	4.1	9
9	5.9	0.0	3.2	1.6	12	59	4.6	14

Tabela 3 – Análise granulométrica das amostras de solo de Cerrado

Amostra	Areia grossa	Areia fina	Silte	Argila
	%			
4	05	08	43	44
9	05	07	34	54

3.2. Quantificação e Isolamento de microrganismos

3.2.1. Isolamento de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente de solos de Cerrado

Para isolamento de *Pseudomonas* spp., foi utilizada metodologia descrita por Raaijmakers et al. (1997), que utiliza vários ciclos de semeadura para incremento das comunidades microbianas, em especial de *Pseudomonas* spp. Foram feitas algumas modificações. Para a primeira amostra de solo (nº 9) foram processados quatro ciclos e para a segunda amostra (nº 4) foram feitos três ciclos. As estirpes isoladas da amostra 9 foram denominadas UN e as da amostra 4 denominadas UQ. Em cada ciclo, para cada uma das amostras de solo, foram utilizados três potes contendo 100g de solo, onde foram plantadas quatro sementes de soja cultivar Garimpo, por aproximadamente 21 dias, em casa-de-vegetação telada, próxima ao IMPPG. Após este período, a parte aérea foi seccionada a altura da superfície do solo. Este solo foi deixado em repouso por cerca de uma semana e, em seguida, era processado o ciclo subsequente.

De cada pote foram retirados dez gramas de raiz e solo rizosférico que foram colocados em frascos contendo 90 ml da solução de pirofosfato de sódio

0,1% e Tween 80 0,1%. Estes frascos foram agitados a 200RPM por 45 min e, em seguida, colocados em banho de ultrassom por 5 min. Em seguida, foram feitas diluições seriadas a partir de cada frasco. Alíquotas de cada diluição foram espalhadas sobre placas contendo meio King B (King *et al.*,1954 - apêndice), para contagem e isolamento de *Pseudomonas*. As placas foram incubadas por 24/48h a 29°C. Após este período, as colônias que surgiram sobre as placas foram enumeradas e avaliadas utilizando luz UV (365nm) para identificação das *Pseudomonas* do grupo fluorescente. As colônias que apresentaram fluorescência, foram purificadas e estocadas em criotubos contendo meio King B e 15% de glicerol a -20°C.

3.2.2. Quantificação de bactérias heterotróficas

Alíquotas das diluições obtidas através da metodologia descrita acima foram espalhadas sobre placas contendo meio Trypticase Soy Agar (TSA) - (Difco) 10%, para quantificação de bactérias heterotróficas. Estas placas foram incubadas por 24/48h a 29°C. Em seguida, as colônias foram enumeradas.

3.2.3. Isolamento de *Fusarium solani* do solo de Cerrado

Alíquotas das diluições seriadas obtidas da suspensão de solo descrita acima foram espalhadas em placas contendo meio Batata Dextrose Agar (“Potato Dextrose Agar” - PDA) (Difco), contendo 100µg/ml de cloranfenicol. As placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 3 a 5 dias. Após este período, os fungos de micélio branco (característica de *F. solani*) foram purificados em novas placas de meio Batata-dextrose. Os fungos purificados foram crescidos durante cinco dias. Parte do micélio destes fungos foi retirado para a preparação de lâminas e observação de seus esporos ao microscópio. Os esporos do gênero *Fusarium* têm forma de “meia lua”. Para iniciar a determinação da espécie, foi necessário observar o número de septos no esporo. Para isto, foi utilizada a técnica da microcultivo. A classificação a nível de espécie foi feita pela equipe do Prof. Erlei Reis , UFagro, Rio Grande Sul

3.3. Pré- avaliação da antibiose in vitro

O *F.solani*, isolado de solo de região onde foi observado o sintoma da doença, foi crescido por 7 dias em meio Batata Dextrose Agar. Cerca de 9mm²

do crescimento foi transferido para o centro de placas contendo King B + PDA (Thomashow & Weller, 1988). Após 24h, 3 μ l do crescimento das estirpes de *Pseudomonas* fluorescentes, previamente crescidas em meio KING B a 28°C por 24h, foram colocados em quatro pontos equidistantes, nas bordas das placas. Após cinco dias, os halos de inibição do crescimento do fungo foram observados, para selecionar as estirpes com potencial de inibição.

3.4. Detecção de genes da síntese de antibióticos através de PCR

A existência entre as estirpes de genes da produção de antibióticos utilizando a técnica de PCR foi testada, baseado no fato da produção de antibióticos ser o mecanismo mais eficiente na supressão de doenças e/ou estimulação do crescimento vegetal por *Pseudomonas*. Quatro análises de PCR foram realizadas para cada uma das estirpes selecionadas pela pré-avaliação *in vitro* para detectar os genes dos antibióticos fluoroglucinol, fenazina, pioluteorina e/ou pirrolnitrina. Os “primers” foram desenvolvidos a partir de sequências de loci biossintéticos de PhI de *P. fluorescens* Q2-87 (GenBank accession noU41818), PCA de *P. fluorescens* 2-79 (GenBank accession noL48616), Prn de *P. fluorescens* Pf-5 (GenBank accession noU30858) e CHAO (GenBank accession noM80913) e Plt de *P. fluorescens* Pf-5 (GenBank accession noU30858). Os “primers” PhI2a e PhI2b foram desenvolvidos das sequências de *phID* e PCA2a e PCA3b de sequências de *phzC* e *phzD*. “Primers” PrnCup e PrnClow foram desenvolvidos de sequências de *prnC* e PltBup2 e PltBlow de sequências de PltB. Os “primers” foram sintetizados pela Operon Technology Inc. (Alameda, Calif.) e estão listados na tabela 4.

Tabela 4 – “Primers” utilizados nas análises de PCR.

“Primers”		Sequências	Referências
Fluroglucinol	Phl2a	5' GAGGACCTCGAAGACCACCA 3'	Bangera & Thomashow, 1997
	Phl2b	5' ACCGCAGCATCGTGTATGAG 3'	
Fenazina	PCA2a	5' TTGCCAAGCCTCGCTCCAAC 3'	Mavrodi <i>et al.</i> , 1998
	PCA3a	5' CCGCGTTGTTCTCGTTCAT 3'	
Pirrolnitrina	PrnCup	5' CCACAAGCCCGGCCAGGAGC 3'	Corbell <i>et al.</i> , 1995
	PrnClow	5' GAGAAGAGCGGGTTCGATGAAGCC 3'	
Pioluteorina	PltBup2	5' CGGAGCATGGACCCCGAGC 3'	Corbell <i>et al.</i> , 1995
	PltBlow	5' GTCCCCGATATTGGTCTTGACCGAG 3'	

25µl da mistura de amplificação contendo 1 x tampão de PCR GeneAmp (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, Ca), 200µM de cada um dos ddNTPs (dATP, dCTP, dGTP and dTTP) (Perkin-Elmer), 20µmol de cada “primer”, 2U de DNA polimerase Amplitaq (Perkin-Elmer) e pequena quantidade de células de culturas com menos de um dia, crescidas em placas contendo meio KB, retiradas com ponteiros estéreis para repipetador de 100µl. As amplificações foram executadas em um termociclador “Perkin Elmer thermal cycler”. Os programas de PCR são descritos na tabela 5.

Tabela 5 – Programas utilizados nas análises de PCR

Primers	Programas
Fluoroglucinol	95°C –3min 29 ciclos de 94°C – 1min., 48°C – 45s.,72°C – 45s. 72°C – 5min.
Pirrolnitrina	94°C – 2min. 30 ciclos de 94°C –1min., 57°C – 1 min., 72°C – 1min.
Pioluteorina	94°C – 2min. 30 ciclos de 94°C –1min., 57°C – 1 min., 72°C – 1min.
Fenazina	94°C – 2min. 25 ciclos de 94°C – 1min., 56°C – 45s., 72°C – 1min. 45s 72°C – 1min.

Os produtos de PCR foram observados após eletroforese em géis de agarose 0.8% usando tampão 1xTBE com voltagem de 75V durante 2h. Os géis foram corados com brometo de etídio 0,1% (solução estoque 10mg/ml) por 20min. e os produtos de PCR visualizados em luz UV.

3.5. Extração de DNA genômico para hibridização do DNA

As estirpes escolhidas para hibridização foram crescidas por 24h a 27/29°C. Após este período, 1,5ml da suspensão bacteriana foram centrifugados por 1min. O sobrenadante foi descartado e a extração do DNA foi processada de acordo com as etapas descrita abaixo (Ausubel *et al.*, 1995):

- ◆ As células foram ressuspendidas em 565 µl de TE tampão
- ◆ Foram adicionados 30µl de SDS 10% e 5µl de proteinase K (20 mg/ml) e incubados por 1h.
- ◆ Foram adicionados 100µl de 5M NaCl
- ◆ 80µl de solução de CTAB 10% foram misturados e o material incubado por 15min. a 65°C.
- ◆ Volume equivalente (cerca de 700µl) de clorofórmio/isoamílico (24:1) foi adicionado e misturado invertendo por 2-3 min.
- ◆ A suspensão foi centrifugada por 4-5 min. e a fase aquosa transferida para um microtubo novo.
- ◆ Volume equivalente foi adicionado de fenol: clorofórmio: isoamílico (25:24:1), misturado por 4-5 min. e, novamente, centrifugado por 4 min.
- ◆ A fase superior foi transferida para um microtubo novo e 0.6 volumes de isopropanol foram adicionados e misturados levemente.
- ◆ A suspensão foi centrifugada por 10 min. O sobrenadante foi descartado.
- ◆ O “pellet” foi lavado com 200µl de etanol (70%) por duas vezes.
- ◆ Após a secagem, o “pellet” foi ressuspendido em 100µl de água de HPLC.

3.6. Detecção de genes da síntese de fenazina por “Southern Blot”

⇒ Preparação da sonda

Para a produção da sonda de fenazina foi processada a reação de PCR descrita no tópico 3.5, utilizando a estirpe 2-79. Após a reação de PCR, a banda específica foi extraída do gel e purificada. Foi utilizado o sistema BrightStar™ Psoralen-Biotin (Ambion, catálogo#1480) para a marcação da sonda.

⇒ Etapas da hibridização

Antes da digestão do DNA para a análise de “Southern Blot”, foi feito espectrograma (260 e 280nm) do DNA, diluído dez vezes, para checagem da concentração e pureza.

Para a digestão, foi utilizada a reação da tabela 6 (volume total de 30µl).

Tabela 6 – Reação de digestão para hibridização de DNA

	VOLUME de DNA	VOLUME de PstI	VOLUME de EcoRI	VOLUME de tampão	VOLUME de RNase	VOLUME de água
<i>P. fluorescens</i> 2-79	10	1	1	2	1	15
<i>P. fluorescens</i> Q2-87	10	1	1	2	1	15
<i>Pseudomonas</i> spp.	20	1	1	2	1	5

O gel foi cortado de maneira a excluir áreas onde não havia DNA e o marcador de peso molecular (1kb). A membrana tipo Hybond positivamente carregada foi cortada do mesmo tamanho. Foram cortados pedaços de papel 3M, sendo que dois foram maiores, principalmente, no comprimento, o suficiente para ficarem imersos nos 200ml da solução de NaOH 0,4M.

A solução de NaOH foi colocada num recipiente e sobre este um vidro. Sobre o vidro, foi colocado o papel 3M, previamente embebido em água destilada, e sobre este o gel. A membrana, previamente embebida em água, foi colocada sobre o gel. As bolhas de ar foram retiradas e os papéis 3M, embebidos em água, sobrepostos. Foi colocado papel tipo parafilme nas laterais do gel e sobre este, um maço de papel-toalha, um vidro, e um peso para manter o contato. Este aparato foi deixado em repouso por um período mínimo de 16h. Após este período, a membrana Hybond foi removida e rinsada rapidamente em 200ml de 2x SSC (apêndice). A membrana foi posta sobre uma folha seca e limpa de papel de filtro (com a parte do DNA para cima) e exposta por 2min ao UV(254nm). A membrana foi seca ao ar (Manniatis *et al.*, 1982).

A solução de pré-hibridização (4x SSC; 4x Solução de Denhardt's; 1% SDS - apêndice) foi feita de acordo com a relação 2ml de solução por 10cm² de área de membrana. Esta foi colocada, no cilindro do forno de hibridização e aquecida a 55°C. A solução de esperma de salmão (300µg/ml) foi fervida por

5min. e adicionada rapidamente à solução de pré-hibridização. A membrana foi colocada no forno de hibridização por 4h.

Após o período de 4h foi processada a hibridização. A solução de hibridização (4x SSC; 4x Sol. de Denhardt's; 1% SDS - apêndice), foi feita de acordo com a relação 1ml de solução para 10cm² de área de membrana. A solução de hibridização foi aquecida por 10 min. (em forno de hibridização). A solução de esperma de salmão (300µg/ml) foi fervida por 5min. e foi adicionada 15µl da sonda. Esta mistura foi adicionada à solução de hibridização que foi deixada em forno de hibridização à temperatura de 55°C, por período mínimo de 16h.

Após este período, a membrana foi lavada de acordo com a seguinte sequência (no próprio forno de hibridização):

- 2x SSC e 0,1% SDS (temperatura ambiente - 25°C) - duas vezes por 10min.
- 0,2x SSC e 0,1% SDS (temperatura ambiente) - duas vezes por 10min.
- 0,2x SSC e 0,1% SDS (58°C) - duas vezes por 15min.
- 0,1x SSC e 0,1% SDS (58°C) - uma vez por 15min.

A membrana foi rinsada rapidamente em 2x SSC, antes de proceder à detecção.

Para a detecção foi utilizado o kit BrightStar™ BioDetect™ (Ambion, catálogo#1930). A membrana foi lavada, sob agitação, na seguinte sequência:

- Duas vezes por 5min. em 1x "Wash Buffer"
- Duas vezes por 5min. em "Blocking Buffer" (0,5ml/cm²)
- Uma vez por 30min. em "Blocking Buffer" (1ml/cm²)
- Uma vez por 30min. em "Conjugate Solution" (preparada previamente)
- Uma vez por 10min. em "Blocking Buffer" (0,5ml/cm²)
- Três vezes. por 5min. em "Wash Buffer" (1ml/cm²);
- Duas vezes por 2min. em 1x "Assay Buffer"

A membrana foi lavada por 5min. em CDP-Star™ (protegida por um papel preto, pois o CDP-Star™ é sensível à luz). As soluções citadas são fornecidas no kit pelo fabricante.

Sob luz amarela, a membrana foi exposta ao filme na caixa de revelação por 20 min. Após este período, o filme foi removido da caixa e foi posto em solução reveladora, até que as bandas ficassem nítidas. O filme foi rinsado em

água destilada e colocado em solução fixadora, até que ficasse claro. Novamente, foi rinsado em água destilada. Fora da câmara escura, o filme foi lavado em água destilada e deixado para secar.

3.7. Caracterização genotípica através da técnica de BOX-PCR

As colônias das estirpes de *Pseudomonas*, previamente crescidas em placas em KING B por 24h a 27-29°C, foram diluídas em 200µl de água destilada estéril e lisadas a -80°C por 30min. Vinte microlitros da mistura de amplificação contendo 5 x tampão Gitschier, 2mM de cada um dos dNTPs (dATP, dCTP, dGTP and dTTP) (Perkin-Elmer), “Bovine Serum Albumin” (BSA) - 14mg/ml; Dimetil Sulfoxido (DMSO), 99%; 25µmol de cada “primer”, 2 U de polymerase Amplitaq DNA e pequena quantidade de células de uma cultura com menos de um dia. O “primer” utilizado foi listado na tabela 7.

Tabela 7 – “Primers” utilizados nas análises de BOX-PCR.

Primer	Sequência	Referência
BOX A1R	5'-CTACggCAAaggCgACgCTgACg-3'	Versalovic <i>et al.</i> , 1994

As amplificações foram executados em um termociclador “Perkin Elmer thermal cycler”. O programa utilizado foi listado na tabela 8.

Tabela 8 – Programa utilizado nas análises de BOX-PCR.

Programas
95°C – 5min. 30 ciclos de 94°C – 1min., 50°C – 1min., 65°C – 8min. 65°C – 16min. 4°C

Os produtos de PCR foram observados após eletroforese em géis de agarose 1,5% usando tampão 0,5xTBE com voltagem de 200V durante 6h em câmara fria (4°C). Os géis foram corados com brometo de etídio 0,1% (solução estoque 10mg/ml) por 20min. e descorados em água destilada por 20min., sob agitação. Os produtos foram visualizados em luz UV e as imagens capturadas por câmara digital, impressas e estocadas em computador como arquivo tipo "TIFF". Estas imagens foram analisadas pelo programa de computador GelCompar (Applied Maths, Bélgica). O método de análise comparativa utilizado foi "Unweighted pair-group method using arithmetic averages" (UPGMA)

3.8. Caracterização genotípica através da técnica de ERIC-PCR

Foram extraídos os DNAs de 13 estirpes de *Pseudomonas* fluorescentes oriundas de Cerrado. Vinte microlitros da mistura de amplificação, contendo 5 x tampão de Gitschier (apêndice), 2mM de cada um dos dNTPs (dATP, dCTP, dGTP and dTTP) (Perkin-Elmer), BSA (Bovine Serum Albumine) - 14mg/ml; DMSO (99%); 25µmol de cada “primer”, 2 U de polymerase Amplitaq DNA e 50µl de DNA extraído. Os “primers” utilizados foram listados na tabela 9.

Tabela 9 – “Primers” utilizados nas análises de ERIC-PCR.

Primers	Sequência	Referência
ERIC 1R	5'-ATgTAAgCTCCTggggATTCAC-3'	Versalovic <i>et al.</i> , 1991
ERIC 2	5'-AAgTAAgTgACTggggTgAgCg-3'	Versalovic <i>et al.</i> , 1991

As amplificações foram executados em um “Perkin Elmer thermal cycler”. O programa utilizado foi listado na tabela 10:

Tabela 10 – Programa utilizado nas análises de ERIC-PCR.

Programa
<p style="text-align: center;">95°C – 5min. 30 ciclos de 94°C – 1min., 50°C – 1min., 65°C – 8min. 65°C – 16min. 4°C</p>

Os produtos de PCR foram observados após eletroforese em géis de agarose 1,5% usando tampão 0,5xTBE com voltagem de 200V durante 6h em câmara fria (4°C). Os géis foram corados com brometo de etídio 0,1% (solução estoque 10mg/ml) por 20min. e descorados em água destilada por 20min., sob agitação. Os produtos foram visualizados em luz UV, as imagens capturadas por câmara digital, impressas e estocadas em computador como arquivo tipo “TIFF”. Estas imagens foram analisadas pelo programa de computador GelCompar (Applied Maths, Bélgica). O método de análise comparativa

utilizado foi “Unweighted pair-group method using arithmetic averages” (UPGMA).

3.9. Extração de antibiótico para análise em HPLC (“High Performance Liquid Chromatography”) (Thomashow *et al.*, 1990; Bonsall *et al.*, 1997)

As bactérias foram crescidas em 5ml de meio King B por 2 dias a 27°C. Após este período, 50µl do crescimento foram transferidos para 5ml de meio King B por 4 dias a 27°C. Em seguida, a densidade ótica foi medida (OD₆₀₀) e 4ml do crescimento foram colocados em frascos de extração. Foram adicionados 40µl de Ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e 10ml de acetato de etila. O material foi agitado em vortex e centrifugado por 10min. a 3/4 de velocidade. A fase aquosa foi transferida para outro frasco de extração limpo. Ao que ficou no primeiro frasco, novamente, foram adicionados 10ml de acetato de etila e repetidos os passo anteriores.

Os frascos ficaram em câmara de exaustão por 12h., para secagem. Após a secagem, foram estocados em freezer a -20°C. Para ressuspender o material, foi adicionado 1ml de Acetonitrila 35% e TFA 0,1%, agitado em vortex e colocado em microtubos. O material foi centrifugado por 10 min. a 4°C. A fase superior foi retirada, filtrada em membrana Millipore 0,2µm e colocada em frascos de HPLC. Os extratos foram submetidos a HPLC de fase reversa C₁₈ (Waters, Simetria C₁₈; material de empacotamento de partículas de 5µm; 3 a 150mm) com volume de injeção de 30µl. O sistema “Waters HPLC Integrity System” consistia de módulo de separação Alliance 260, detector de fotodiodo 996 e detector de espectrometria de massa Thermobeam. O restante do material foi transferido para outro microtubo e estocado a - 20°C.

3.10. Caracterização fenotípica através do sistema BIOLOG™

Vinte estirpes que produziram fenazina foram crescidas em caldo de KING B por 24h a 27-29°C. Estas foram diluídas de 1:100 e crescidas por \cong 12hs – 16hs no mesmo meio. As células foram lavadas por duas vezes em solução de NaCl 0,9% estéril. As suspensões bacterianas foram diluídas até a DO₆₀₀ (Densidade Ótica - 600nm) = 0.1, em solução de NaCl 0,9%. Em seguida, estas suspensões foram diluídas de 1:100, por cinco vezes em NaCl 0,9%.

Foram utilizadas três Microplacas (réplicas) de BIOLOG SF-N™ (BIOLOG Inc, Hayward, Calif.) para cada uma das estirpes. Em cada uma das placas, foram colocados 95 μ l de água estéril em cada poço da placa e 5 μ l da suspensão. As microplacas foram incubadas a 27°C e a verificação do crescimento foi feita por leitura da DO₆₀₀, após o período 4 dias.

3.11. Sequenciamento do fragmento dos genes para síntese de fenazina

Foram utilizadas duas estirpes, das quais foram amplificados os fragmentos de genes da produção de fenazina amplificados por PCR. Os fragmentos foram extraídos do gel de agarose 0,8% em TBE e purificados pelo Kit QIAEX II (Quiagen, Santa Clarita, CA). Em seguida, foi processada a reação de ligação no vetor pGEMTeasy (50 μ g/ μ l), na relação 1:3 ou 1:5. A reação foi incubada durante a noite a 16°C. Após este período, foi feita a transformação das células de *Escherichia coli* JM109 com o produto da reação de ligação. O material foi incubado no gelo por 15 a 30min., e em seguida foi aquecido a 42°C por 1min. e 30s. Logo após, foi incubado, mais uma vez, em gelo. Foi adicionado 1ml de meio LB e a mistura foi incubada por 20 a 30min. a 37°C. Foram feitas duas placas de meio LB, contendo 100 μ g/ml de ampicilina, 23 μ g/ml de Xgal e 0,1mM de IPTG. Cem microlitros do crescimento foram colocados em uma placa, o restante do crescimento foi centrifugado, e parte do sobrenadante removido. O “pellet” foi ressuscitado e colocado na segunda placa. Ambas as placas foram incubadas a 37°C.

Após 24h, as colônias brancas (recombinantes) foram transferidas para placas de LB contendo 100 μ g/ml ampicilina e incubadas a 37°C.por 24h.

A reação de PCR foi processada para cada uma das colônias, para constatar a presença da inserção. Das colônias positivas, foram isolados os DNAs plasmidiais através do kit QIAEX II (Quiagen, Santa Clarita, CA) que foram digeridos pela enzima de restrição EcoRI. Após a extração e purificação do fragmento, foi possível proceder ao programa de PCR para sequenciamento.

Dez microlitros da mistura de amplificação, contendo 5 a 10 μ g do DNA, 3,2 μ M de primer M13, 4 μ l de “*TaqDyeDeoxy terminator*” e água para HPLC foram colocados em termociclador Perkin Elmer, para proceder ao programa de sequenciamento listado na tabela 11:

Tabela 11 – Programa de PCR utilizado para o sequenciamento. .

Programa
<p style="text-align: center;">96°C – (pré-aquecimento). 25 ciclos de 96°C – 30seg., 50°C – 15seg., 60°C – 4min. 4°C</p>

Em seguida, foi utilizado o kit QUIAQuick nucleotide Removal (Quiagen, Santa Clarita, CA) para remoção de excesso de “*TaqDyeDeoxy terminator*”.

O sequenciamento foi processado em sequenciador Perkin-Elmer. Uma pesquisa na base de dados por sequências de nucleotídeos semelhantes foi feita através do servidor BLAST do “National Center for Biotechnology Information”. Os alinhamentos genômicos foram obtidos pelo programa GCG GAP (“gap weight =4”).

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e Pré-avaliação de *Pseudomonas* para Controle Biológico

Foram isoladas aproximadamente 600 estirpes das sete ciclagens (quatro plantios feitos com a amostra de solo 9 e três com a amostra de solo 4). Observou-se que os plantios sucessivos teve efeito bastante significativo, sobre a comunidade de *Pseudomonas* Fluorescentes, pois o número de estirpes isoladas foi incrementado ao longo dos sucessivos plantios (Fig.4).

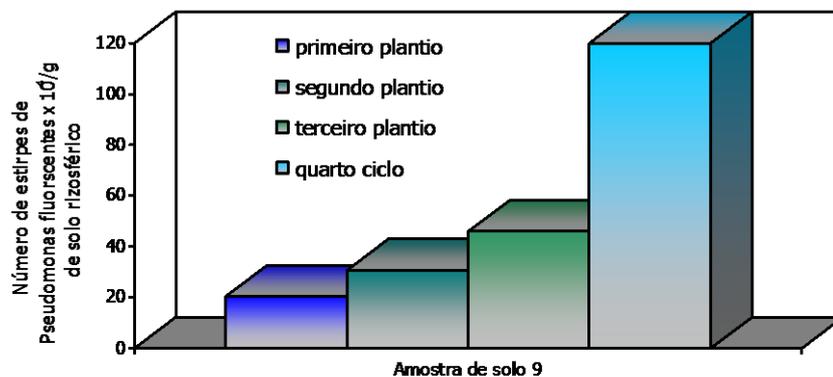


Fig.4 – Efeito dos Plantios Sucessivos sobre a comunidade de *Pseudomonas* Fluorescentes (amostra de solo9)

O efeito dos plantios sucessivos, também, foi observado na comunidade de estirpes com genes para síntese de fenazinas (Fig.5). Este efeito é mais evidente quando se compara o primeiro e o segundo plantios quando a população aumenta cerca de cinco vezes (Tabela 12). Nos demais plantios, há o incremento da comunidade à níveis mais baixos. Entre o segundo e terceiro plantio, a comunidade aumentou cerca de 47% e entre o terceiro e quarto plantio houve aumento de cerca de 32%.

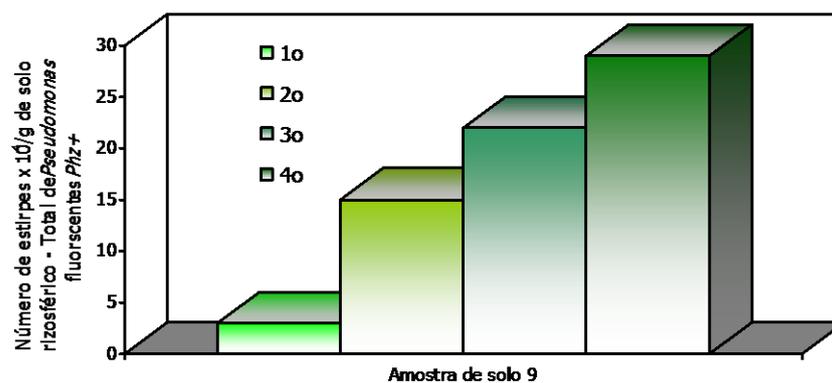


Fig.5 – Efeito dos Plantios Sucessivos sobre a comunidade de *Pseudomonas* Fluorescentes *phz+* (amostra de solo 9)

Tabela 12 - Frequência de estirpes com genes para síntese de fenazina ao longo dos plantios sucessivos (amostra de solo 9)

	Plantios			
	Primeiro	Segundo	Terceiro	Quarto
Total de estirpes isoladas	19	89	81	159
Total de estirpes <i>phz+</i>	3	17	22	30

A quantificação de bactérias heterotróficas sugeriu, também, o efeito dos plantios sucessivos sobre as comunidades microbianas.

Tab. 13– Efeito dos plantios sucessivos na comunidade de bactérias heterotróficas da amostra

9

	Plantios			
	Primeiro	Segundo	Terceiro	Quarto
UFC*/g de solo rizosférico	2,2x10 ⁸	7,6x10 ⁹	ND**	ND

*Unidade Formadora de Colônias

**Não determinado

Na pré-avaliação da inibição ao *F. solani in vitro*, considerou-se a capacidade da estirpe inibir mais de 50% do crescimento do fungo (Thomashow & Weller, 1988) (metade da distância entre o crescimento do fungo e da estirpe) (Fig.6). Das 600 estirpes obtidas, 147 foram selecionadas (apêndice), ou seja, cerca de 25% do total isolado apresentou capacidade de inibição ao desenvolvimento fúngico.

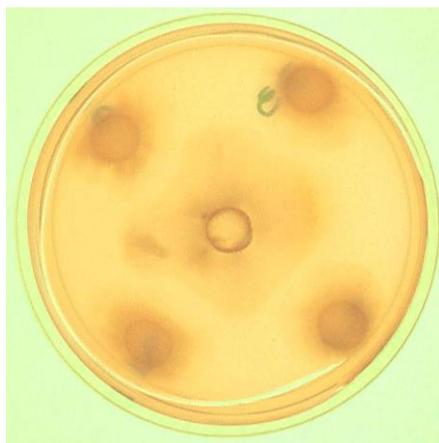


Fig.6 – Pré- avaliação da inibição do *F.solani in vitro*

4.2. Detecção de genes de produção de antibióticos

Cada uma das 147 estirpes selecionadas pela pré-avaliação *in vitro* foi testada para detectar os genes da produção dos antibióticos fluoroglucionol, fenazina, pioluteorina e pirrolnitrina. As quatro reações de PCR demonstraram elevado número de estirpes que possuíam reação positiva para os genes da síntese de fenazina. Na fig.7 é mostrada a detecção destes genes para algumas das estirpes selecionadas. Oitenta e dois das 147 estirpes inibitórias ao *F. solani* apresentaram reação positiva para *phz*, representando aproximadamente 55% da coleção (Tab.14). Estas estirpes, após a reação de amplificação apresentaram fragmento de 1,4kb, o mesmo tamanho do fragmento da estirpe de *P. fluorescens* 2-79, utilizada como padrão (Fig.7). As reações de PCR foram repetidas, em média, duas vezes para ratificação dos

resultados obtidos. Os “primers” utilizados são específicos e permitem a detecção de várias estirpes produtoras de fenazina, que podem diferir estruturalmente do PCA (Raaijmakers *et al.*, 1997)

Tabela 14 –Detecção de genes para produção de antibióticos por PCR

Nº da amostra de solo	Total de estirpes por antibióticos ¹				Total de estirpes ²	Total de estirpes positivas ³	%
	Phl	Phz	Plt	Prn			
9	3	69	0	0	110	72	62
4	0	13	0	0	37	13	35

¹ Total de estirpes com reação positiva aos antibióticos testados

²Total de estirpes inibitórias ao *F. solani in vitro*

³Total de estirpes com reação positiva a fenazina

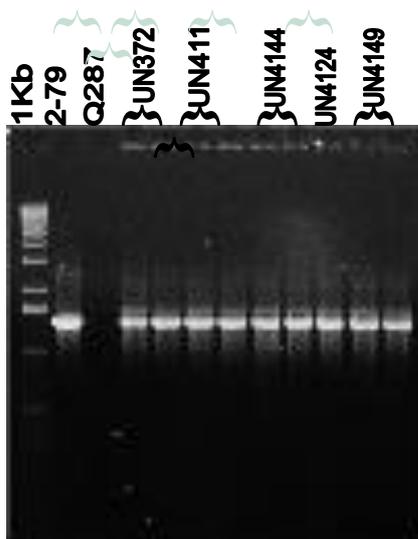


Fig.7 - Detecção de genes da síntese de fenazina
(padrão:*P. fluorescens* estirpe 2-79 tamanho do fragmento:1,4kb)

Os genes de fluoroglucinol foram detectados apenas em três estirpes, totalizando cerca de 2% das estirpes pré-selecionadas. A estirpe utilizada como padrão foi a Q2-87, cujo tamanho de fragmento era 745bp.

Os genes de pioluteorina e pirrolnitrina não foram detectados. As reações para detecção dos genes destes antibióticos foram repetidas três

vezes, pois os “primers” apresentam certa inespecificidade, e por este motivo estão sendo aprimorados (Thomashow, comunicação pessoal). Na fig. 8, pode-se observar as falhas que os “primers” têm causado nas reações, mesmo para os padrões (pioluteorina - *P. fluorescens* estirpes pf-5 e CHAO: 773bp; pirrolnitrina - *P. fluorescens* estirpes pf-5 e CHAO: 719bp). Nas fig. 8a e 8b, foi observado que não houve repetitividade das reações para estes padrões. A inespecificidade dos “primers” pode, ainda, ser notada pelas bandas geradas em algumas estirpes.

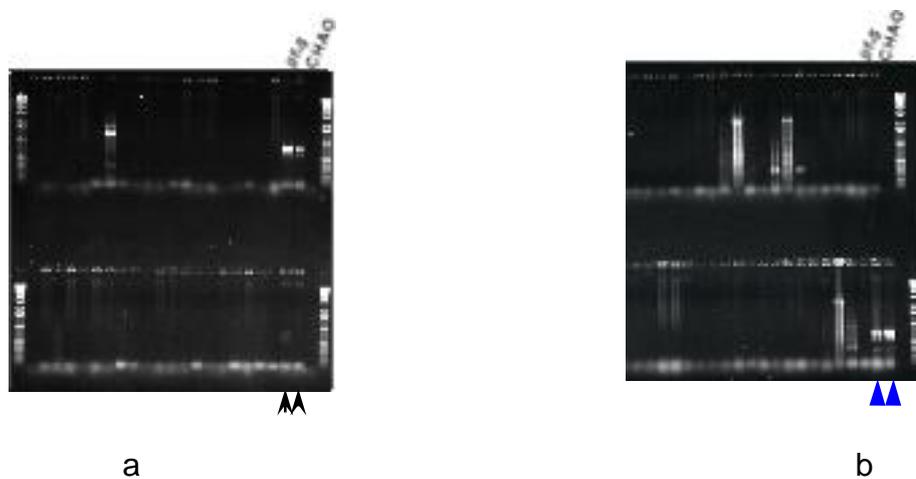


Fig.8- Detecção de genes: a) pioluteolira (>padrões: -:*P. fluorescens* estirpes pf-5 e CHAO– tamanho do fragmento: 773bp; b) pirrolnitrina (>padrões: -:*P. fluorescens* estirpes pf-5 e CHAO– tamanho do fragmento: 719bp)

4.3. Hibridização para detecção de genes de fenazina

Com o número elevado de resultados positivos nas análises de PCR para genes de produção de fenazina, foi necessário confirmá-los através da hibridização do DNA. Foram extraídos os DNAs de seis estirpes. Todas as estirpes testadas apresentaram homologia com a sonda, que representava o fragmento de 1,4kb. indicando a presença do referido gene em seus genomas, sendo, então, estirpes de possíveis produtoras de PCA (Fig.9).

Não houve produto de PCR amplificado do DNA da estirpe Q2-87, assim como não foi observada hibridização da referida estirpe com a sonda.

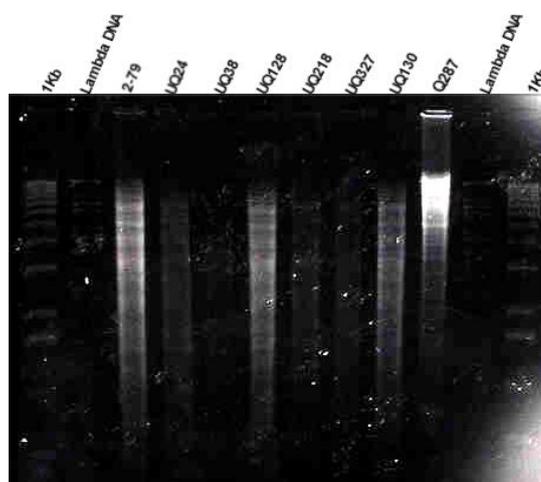


Fig.9 – Hibridização do DNA para detecção de genes da síntese de fenazina

4.4. Análise dos compostos excretados através da técnica HPLC

Para constatar se as estirpes que apresentaram o gene da fenazina, eram capazes de expressá-lo, foram analisados por HPLC os metabólitos

excretados *in vitro* por 6 estirpes selecionadas (Tabela 15). Os compostos produzidos pelas estirpes apresentavam tempos de retenção na coluna de HPLC e espectros de U.V. semelhante ao do composto ácido monocarboxílico fenazina (tempo de retenção 16,14min.; espectro com picos 249nm e 370nm - fig.10a). Os tempos de retenção ficaram em torno de 16.12 a 16.24min (fig.10b), e os espectros eram basicamente o mesmo do PCA. A expressão do gene pode ser constatada, também, pelo aparecimento em placas de meio King B, de pigmento amarelo-esverdeado que pode ser observado no crescimento das estirpes.

As estirpes produziram uma média de 2,5µg/µl de PCA em meio KB. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 16. Cinquenta por cento produziram em torno de 3µg/µl. A estirpe UN443 produziu cerca de 82% a mais de antibiótico que a média das estirpes. A UN4124 produziu quantidade bem inferior as demais, sugerindo que a expressão gênica foi praticamente impedida. Uma série de fatores podem ter impedido a expressão do gene, como o meio de cultivo, ou condições de crescimento.

Tabela 15 - Detecção de genes da produção fenazina por PCR e produção de PCA por HPLC

Estirpes	PCR	HPLC
UN4103	+	+
UN439	+	+
UN4116	+	+
UN443	+	+
UN4122	+	+
UN4118	+	+

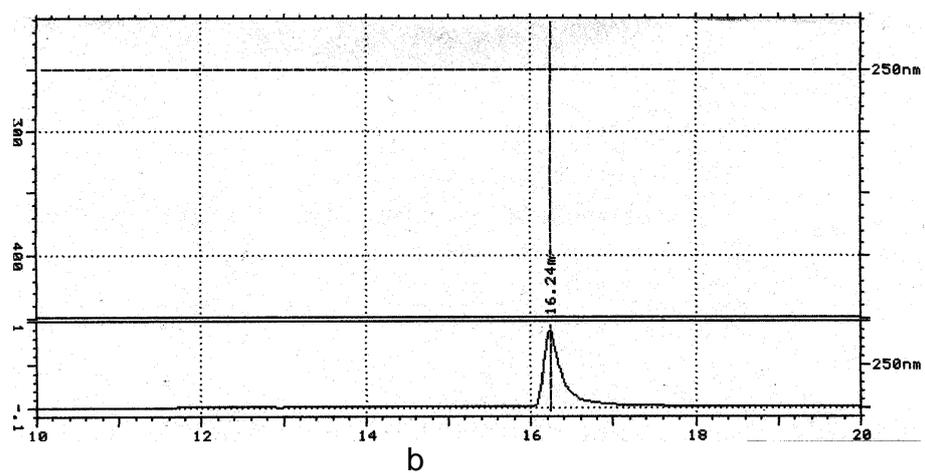
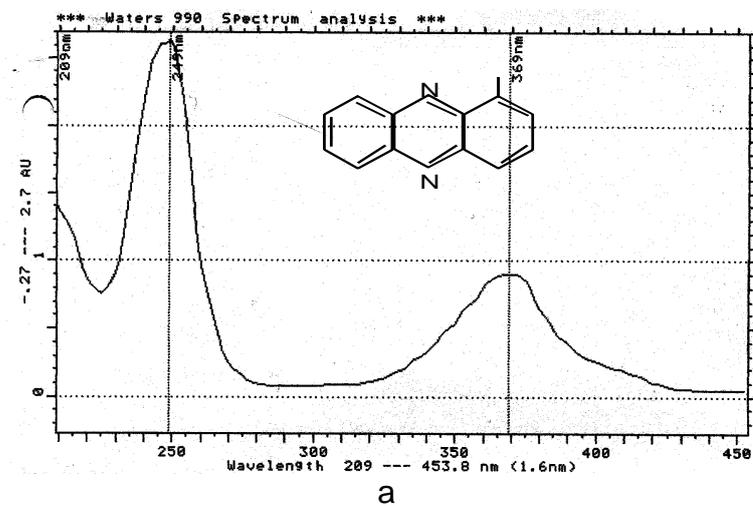


Fig.10 – Espectros obtidos na análise em HPLC: a) Espectro de U.V. de ácido monocarboxílico fenazina (PCA); b) Análise por HPLC do composto excretado pela estirpe de *Pseudomonas* fluorescente UN4118

Tabela 16 – Quantidade de PCA produzida *in vitro*

Estirpes de <i>Pseudomonas</i> fluorescentes	Concentação de PCA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
UN4103	3,84
UN4121	3,00
UN439	3,12
UN4122	1,32
UN4118	2,04
UN443	4,56
UN4124	0,06
UN4116	3,36

4.5. Caracterização genotípica das estirpes de *Pseudomonas*

O perfil genotípico das 82 estirpes produtoras de fenazina (*phz+*) foi traçado, inicialmente, pela técnica de BOX-PCR. O perfil eletroforético de onze das estirpes isoladas está apresentada na fig.11. Utiliza-se nesta técnica, o DNA obtido diretamente pela lise de células, o que facilita o uso para análise de número significativo de indivíduos de uma comunidade, como a comunidade de estudo. É a mais indicada, pois produz perfis genotípicos definidos e constroem um padrão de bandas altamente complexo (Rademakers & De Bruijn, 1997). Observou-se que grande parte da comunidade apresentava semelhança genotípica maior que 70% com a estirpe de referência *P. fluorescens* 2-79. Isto indica pertencerem a esta mesma espécie.

Três padrões de amplificação foram constatados (fig 12a, 12b e 12c). Basicamente, os padrões se assemelham aos da estirpe 2-79. Entretanto, a análise mais detalhada, permite distinguir diferenças nos perfis, o que sugere a existência de três grupos. O primeiro grupo apresentou 72% de similaridade com a estirpe 2-79. O segundo e o terceiro grupos tiveram 70% de similaridade com a estirpe utilizada como padrão, havendo diferenças nos padrões de bandas obtidos nas estirpes pertencentes aos dois agrupamentos.

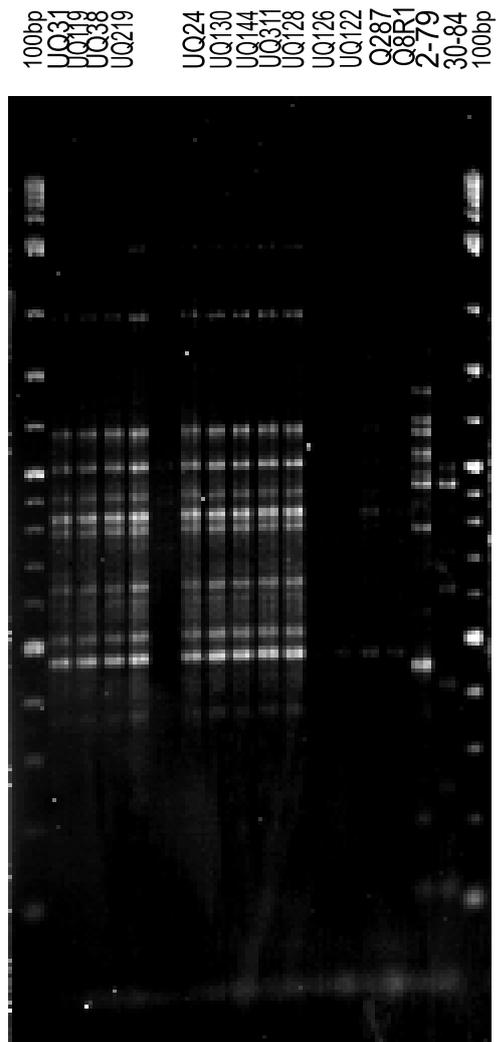


Fig. 11– Caracterização genotípica das estirpes de Cerrado por BOX-PCR (marcador de peso molecular:100bp)

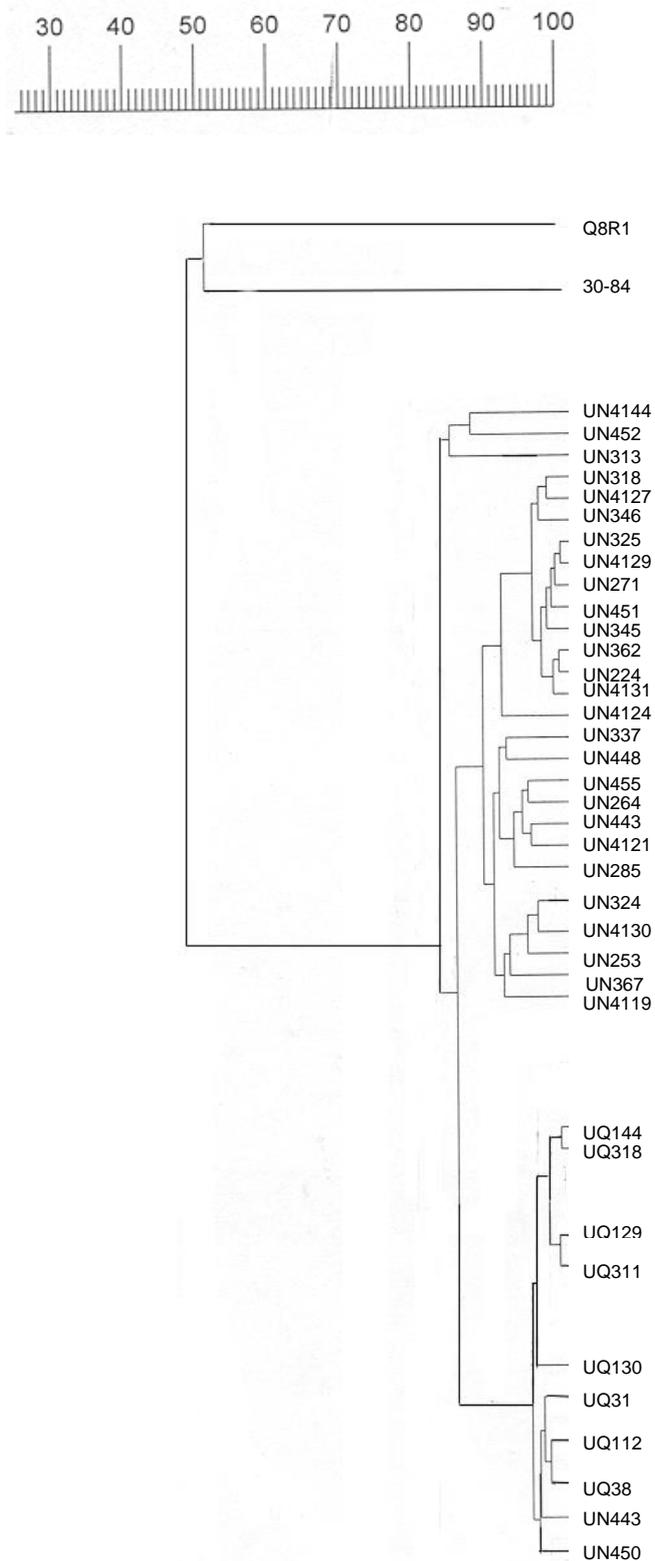


Fig.12a- Dendrograma de agrupamento genômico de estirpes produtoras de fenazina obtido por BOX-PCR (Grupo I)

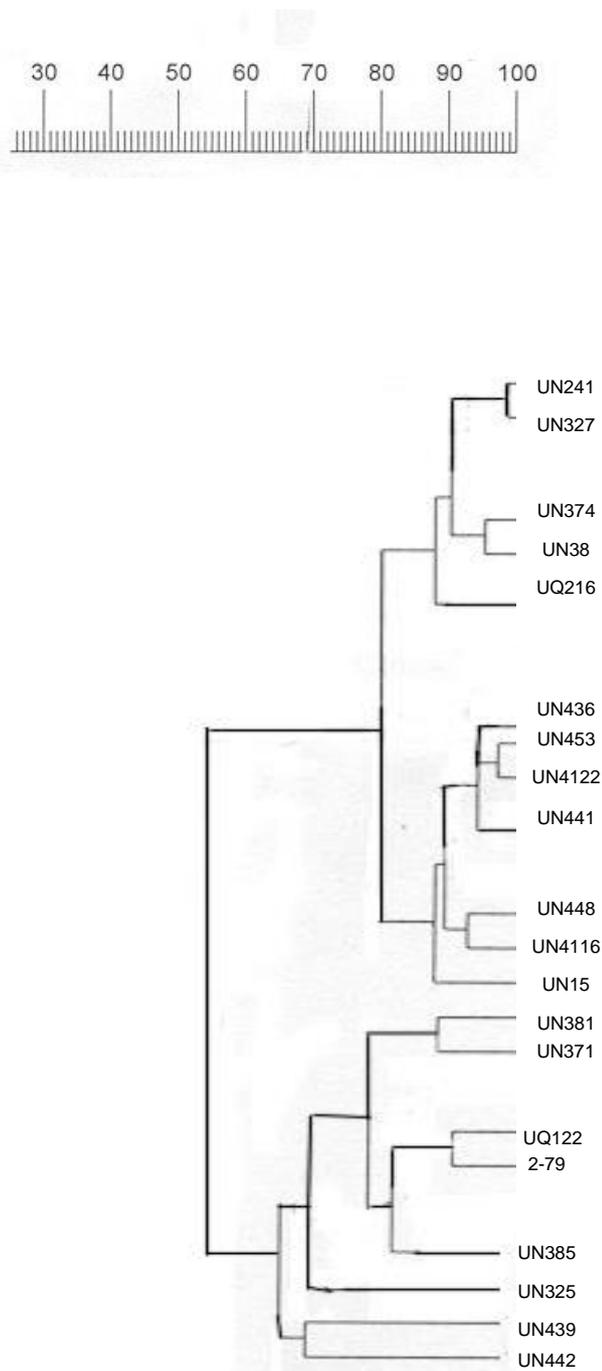


Fig. 12b – Dendrograma de agrupamento genômico de estirpes produtoras de fenazina obtido por BOX-PCR (Grupo II)

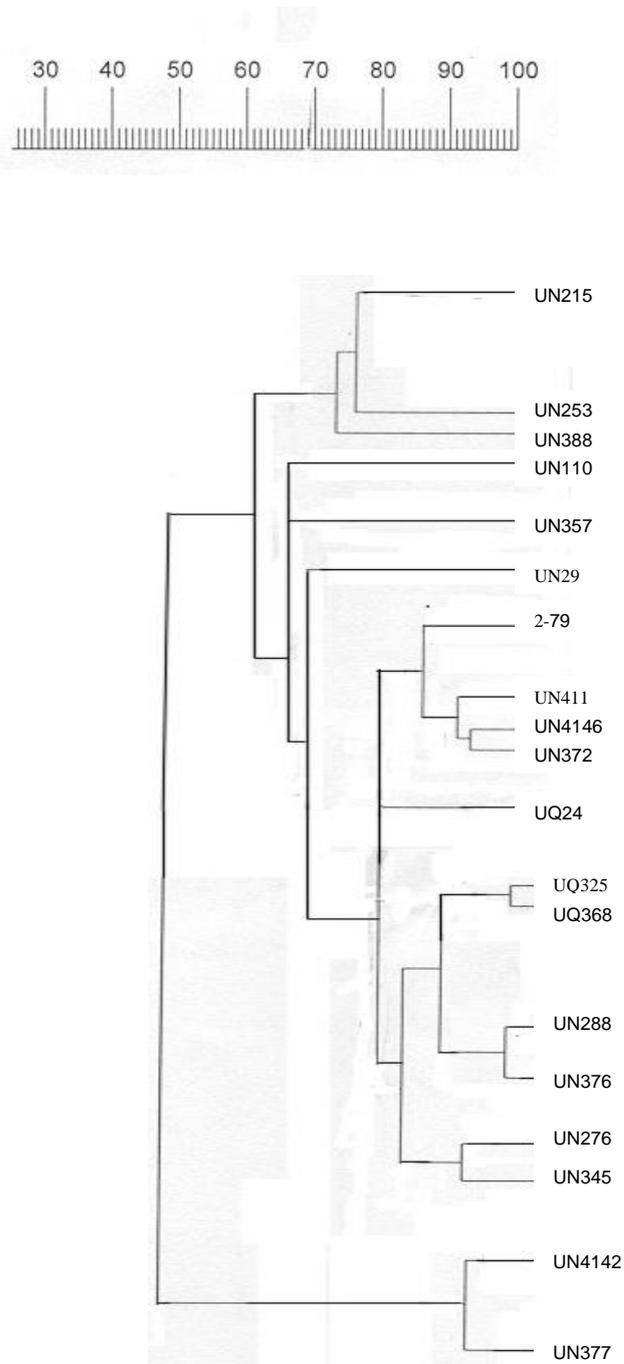


Fig.12c – Dendrograma de agrupamento genômico de estirpes produtoras de fenazina obtido por BOX-PCR (Grupo III)

Duas estirpes apresentaram padrão distinto (similaridade menor que 60%).

Para confirmação dos resultados obtidos por BOX-PCR, efetuou-se a análise por ERIC-PCR, onde foram utilizados 13 estirpes. Esta análise ratificou os resultados obtidos. O grau de similaridade entre as estirpes e a 2-79 foi maior que 90% (Fig. 13).

Observou-se, também, que pelas análises havia grande quantidade de estirpes com o mesmo padrão genotípico, o que poderia significar a existência de clones. Das estirpes testadas, apenas UN110 não apresentou semelhança com nenhum dos padrões utilizados. Entretanto, observou-se que em meio de cultivo produziu o pigmento característico de PCA.

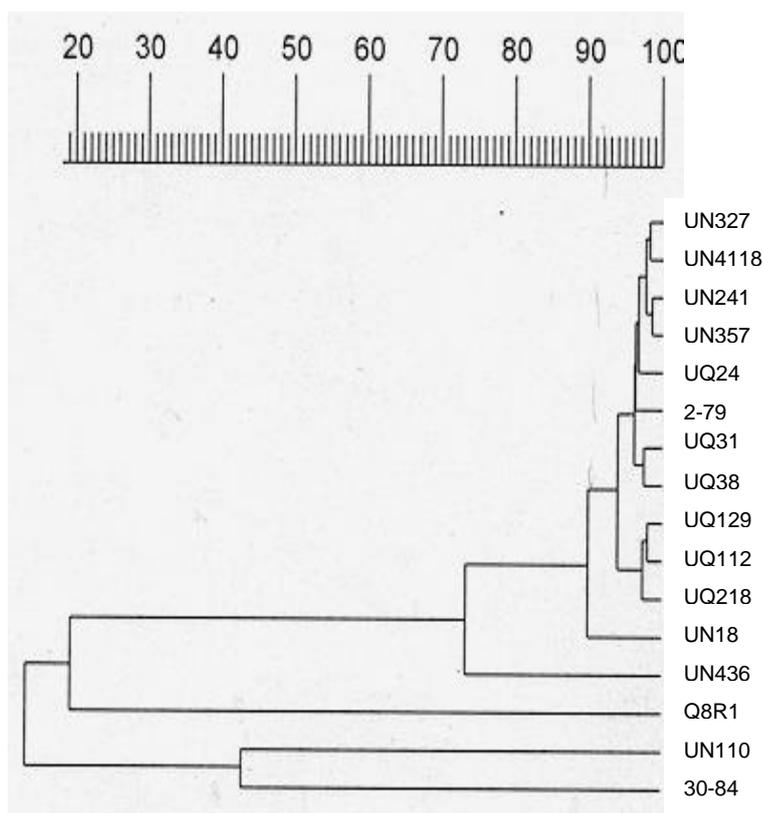


Fig. 13 – Dendrograma de agrupamento genômico de estirpes produtoras de fenazina obtido por ERIC-PCR

4.6. Caracterização fenotípica das estirpes de *Pseudomonas*

Através da análise da assimilação de carbono das vinte estirpes testadas, foi possível observar que a grande maioria destas apresentava perfil de assimilação semelhantes (fig.14a). Este perfil é semelhante ao de *P. fluorescens*. Entretanto, foram observadas algumas diferenças nos perfis de UN110 e UQ122. Enquanto, as estirpes apresentavam homologia de $\approx 97\%$, UQ122 mostrou padrão de utilização de fontes de carbono relativamente distinto em relação aos demais ($\approx 89\%$), e o padrão de UN110 foi significativamente diferente das estirpes testadas (similaridade $< 79\%$). As estirpes foram capazes de metabolizar 63 das 95 fontes de C contidas nas placas de BIOLOG™. Compostos, como D-galactose, α -D-glicose, L-prolina e D-trealose, foram os mais utilizados por todas as estirpes (Densidade Ótica > 0.850). Além das 63 fontes comuns a todos, as estirpes UQ122 e UN110 foram capazes de assimilar outras fontes de C. O UQ122 assimilou, também, dextrina, timidina, L-rhamnose e ácido glicil-L- aspártico. Já o UN110, utilizou melibiose, ácido acético, α -ciclodextrina, β -metil D-glicosídeo, dextrina, glicogênio, gentiobiose, N-acetil-D-galactosamina, sucrose, α -D-lactose, 2,3 – butanediol, lactulose, turanose, maltose, celobiose e mono-metil-succinato.

A estirpe UQ122 se mostrou significativamente distinta, quando, analisada com estirpes da amostra quatro (UQ) e amostra nove (UN) conjuntamente, assim como, quando foram analisadas apenas os UQ. A similaridade na assimilação de C entre estas estirpes foi maior que 96%, e a do UQ122 foi menor que 89% (Fig.14b). Resultados semelhantes foram observados no perfil da estirpe UN110, quando analisada apenas com as estirpes UN. As estirpes apresentaram semelhança em torno de 97%, enquanto, a similaridade de UN110 era menor que 79% (Fig.14c).

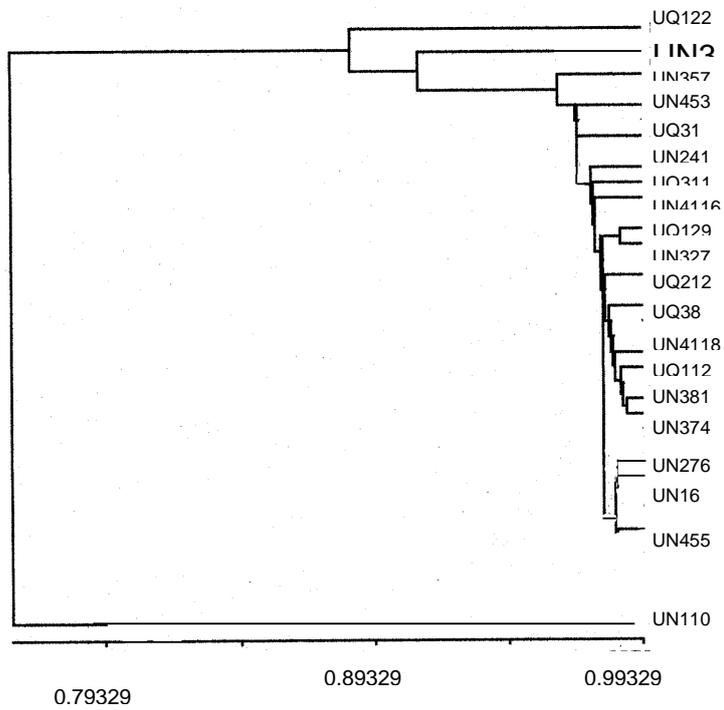


Fig.14a – Dendrograma de agrupamento fenotípico de estirpes produtoras de fenazina obtido pelo sistema BIOLOG™

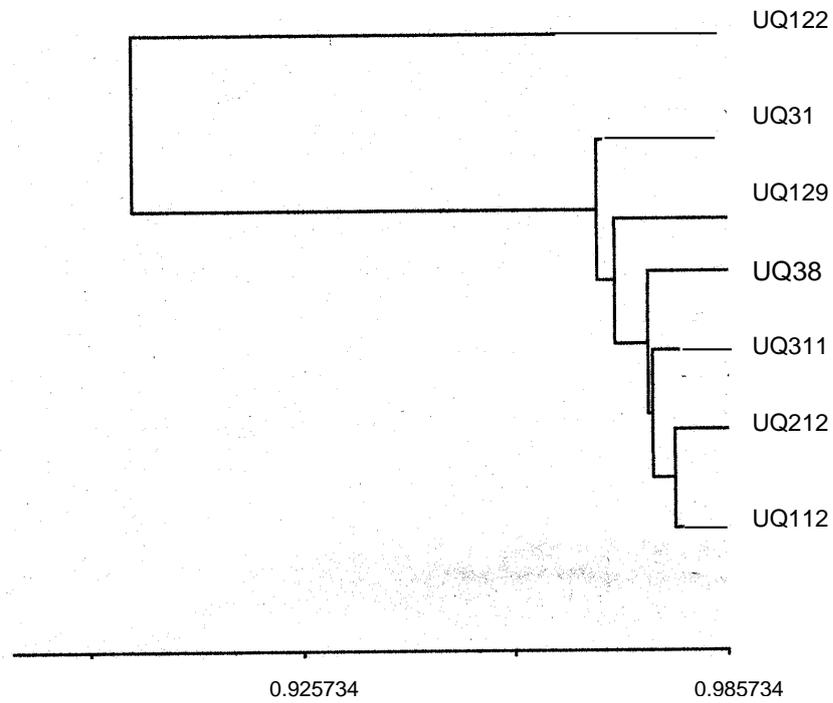


Fig. 14b – Dendrograma de agrupamento fenotípica de estirpes produtoras de fenazina da amostra de solo 4 obtido pelo sistema BIOLOG™



Fig. 14c – Dendrograma de agrupamento fenotípico de estirpes produtoras de fenazina da amostra de solo 9 obtido pelo sistema BIOLOG™

4.7. Sequenciamento do fragmento genômico para síntese de PCA

Os fragmentos dos genes relativos à produção de PCA obtido por PCR de estirpes UN411 e UN4124 foram sequenciados. Através do alinhamento dos fragmentos da estirpe UN411, observou-se que o fragmento possuiam 96% de identidade com o da estirpe 2-79 (Fig.15). Isto indica que trata-se do mesmo gene para produção do antibiótico.

5. Discussão

5.1. Isolamento de *Pseudomonas* e detecção de genes para produção de antibióticos

O sistema utilizado para isolamento de *Pseudomonas* da rizosfera de soja em solos potencialmente supressivos a “Podridão Vermelha da Raiz”, causada por *F. solani*, mostrou-se eficaz na obtenção de bons níveis populacionais de PGPR. Esta comunidade é nitidamente influenciada pelo efeito rizosférico. Este resultado concorda com a observação feita por Weller & Cook (1983). Estes sugeriram que o declínio da “Podridão do Pé” da raiz de trigo ocorria devido ao estabelecimento gradual do antagonismo por *Pseudomonas* em raízes e restos culturais infectados. O monocultivo de trigo estabelecido na região estudada indicou a ocorrência deste fenômeno. Raaijmakers *et al.* (1997), utilizando sistema semelhante, também, observaram aumento significativo nas populações das estirpes de *Pseudomonas fluorescens* testadas, indicando ser este procedimento útil na obtenção de Promotoras de Crescimento Vegetal, e de potenciais Agentes para o Controle Biológico.

Nos testes de pré-avaliação *in vitro*, de todas as estirpes (aproximadamente 600), 25% delas foram capazes de inibir o fungo fitopatogênico *F. solani*, isolado do mesmo local, indicando seus potenciais como Agentes de Controle Biológico. Os resultados mostraram alta frequência de genes da síntese de fenazina (85 estirpes apresentaram reação positiva). Esta frequência do gene foi acima do esperado, pois, até o presente, não há na literatura relatos de frequência tão alta deste gene em comunidades nativas de *Pseudomonas* fluorescentes. Este fato evidenciou a necessidade de confirmação através de outra técnica tão confiável quanto à análise efetuada via PCR. Por este motivo, foi utilizada a Hibridização do DNA de algumas estirpes capazes de produzir fenazina. Esta técnica ratificou os resultados de PCR. Provalvemente, o sistema de ciclagem para formação da coleção induziu o aumento da comunidade na rizosfera, indicando que já havia uma comunidade de *phz*⁺ estabelecida no solo (fig.2). O sistema de plantios sucessivos estimula a comunidade de PGPR e/ou ACB. Este fato foi observado

em solos continuamente cultivados com trigo, e que eram supressivos à “Podridão do pé”, na região noroeste dos E.U.A (Weller & Cook, 1983; Weller, 1988; Thomashow & Weller, 1988; Weller & Thomashow, 1993). Notou-se que nestes solos havia grande comunidade de *Pseudomonas*, da qual parte significativa sintetizava antibióticos, como fenazinas e fluoroglucinol. Os antibióticos PCA e PhI são os mais importantes no Controle Biológico de fitopatógenos de solo produzidos por *Pseudomonas* do grupo fluorescentes (Thomashow & Weller, 1995). A disponibilidade de genes biossintéticos de PCA e PhI clonados e sequenciados permitiu desenvolver “primers” específicos e sondas para detectar *Pseudomonas* spp. que produzem estes antibióticos (Raaijmakers *et al.*, 1997). Os “primers” PhI2a e PhI2b foram desenvolvidos de seqüências de *phlD* responsável pela síntese do precursor do 2,4-diacetilfluoroglucinol (PhI), o monoacetilfluoroglucinol (MAPG) (Thomashow & Weller.,1995). Estes “primers” amplificaram fragmento de 745 bp do DNA de Q2-87 e de grande quantidade de estirpes produtoras de fluoroglucinol de várias partes do mundo (Keel *et al.*, 1996). Estes resultados demonstram que *phlD* é bastante conservado entre as bactérias que produzem PhI.

Os “Primers” PCA2a e PCA3b foram desenvolvidos a partir de seqüências de genes biossintéticos de fenazina *phzC* e *phzD* da estirpe de *P. fluorescens* 2-79. Os “primers” amplificaram o fragmento de 1400bp do DNA da estirpe de 2-79 e permitiram a detecção de várias estirpes que produzem PCA, assim como, outras fenazinas que diferem estruturalmente do PCA. Estes resultados indicam que *phzC* e *phzD* são conservados entre estirpes de *P. fluorescens*, *P. aureofaciens* e *P. chlororaphis* (Weller *et al.*, 1997).

Além da importância para o Controle Biológico, a produção de antibióticos pelas *Pseudomonas* tem, também, função na sobrevivência destes microrganismos. Mazzola *et al.*(1992) observaram que a produção de fenazinas contribui para a sobrevivência da estirpe 2-79 de *P. fluorescens* e da estirpe 30-84 de *P. aureofaciens* pelo aumento na habilidade de competir com a microflora nativa. Observaram, também, que a produção de fenazina parece ser menos crítica para a sobrevivência das bactérias introduzidas quando as raízes de trigo estão infectadas com *G. graminis* var. *tritici* que quando saudas.

Os genes de pioluteorina e pirrolitrina não foram detectados entre as estirpes. Os “primers” para detecção dos genes de pioluteorina e pirrolitrininas

apresentaram inespecificidade. Vários ensaios para detecção destes genes foram realizados, para certificar a ausência destes. As condições para funcionamento das reações, estão em fase de aperfeiçoamento pela equipe dos laboratórios WSU/USDA/ Root Disease and Biological Control Research Unit.

5.2. Análise de compostos excretados *in vitro* através da técnica de HPLC

A estirpe de *P. fluorescens* 2-79 produz, em meio Batata Dextrose, um composto amarelo esverdeado. O composto foi caracterizado por espectroscopias de UV e massa e ressonância magnética, como sendo um dímero de ácido carboxílico fenazina, um antibiótico (Gurusiddaiah *et al.*, 1996). Os aspectos estruturais e propriedades espectrais do antibiótico isolado da 2-79 são similares aos do antibiótico tubercicina B (Ácido monocarboxílico fenazina), isolado de *P. aeruginosa*, apesar de apresentarem várias propriedades químicas e biológicas diferentes. O antibiótico apresentou excelente atividade contra alguns fungos, incluindo *Fusarium* sp.

As estirpes testadas produziram o mesmo antibiótico da estirpe 2-79, como observado por HPLC. As análises de espectros e os tempos de retenção são semelhantes. Entre as estirpes testadas, foi observada variação na concentração do composto excretado. A média de concentração ficou em torno de 2,5µg/µl. Esta concentração é, em média, 200 vezes maior que os valores encontrados nas avaliações da capacidade da estirpe 2-79 para inibir o crescimento de alguns fungos e bactérias *in vitro* (Gurusiddaiah *et al.*, 1996). O antibiótico produzido apresentou excelente atividade contra vários fungos, como *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani* e *Pythium* sp., e uma atividade moderada contra algumas bactérias, como *Bacillus subtilis* e *Erwinia amylovora*.

A estirpe UN4124 praticamente não produziu PCA, ou seja, não houve expressão do gene. A regulação da biossíntese de fenazina é feita por dois genes adicionais denominados *phzR* e *phzI*. Estes se localizam acima do grupo de genes *phzABCDEFG* (Mavrodi *et al.*, 1998). Os *phzR* e *phzI* são membros da família de genes *luxI/luxR* responsáveis pelo controle da bioluminescência em *Vibrio fischeri*, através do sistema regulatório envolvendo a N-acil-homoserina lactona (N-acil-HSL) (Fuqua *et al.*, 1994). Dois operons adjacentes controlam a bioluminescência. Um operon codifica o ativador transcricional LuxR e, o segundo consiste do gene *luxI* (N-acil-HSL sintase) e seis genes estruturais (*luxCDABEG*). *luxA* e *luxB* codificam as subunidades da enzima luciferase que é responsável pela produção da luz. Lux I é responsável

pela síntese de *N*-3-oxohexanoil-L-homoserina lactona (OHHL), provavelmente produzida por precursores celulares S-adenil-metionina e proteína carreadoras de acil-acil (More *et al.*, 1996). OHHL é livremente difundido através da membrana celular. Após suficiente OHHL ter sido acumulado intracelularmente, este interage com LuxR resultando na ativação do operon *lux*. A ativação do operon *lux* por LuxR e OHHL aumenta a expressão de *luxI* produzindo aumento exponencial de bioluminescência. A regulação mediada *N*-acil-HSL foi originalmente denominada “autoindução” e mais recentemente “quorum-sensing” (Fuqua *et al.*, 1994).

Comparando-se o sistema regulatório da fenazina ao *luxI/luxR*, dois genes estão distintamente envolvidos na regulação de operon biossintético de fenazina. *PhzR* codifica um ativador transcricional semelhante ao LuxR, enquanto *phzI* codifica uma *N*-acil-HSL sintase similar ao LuxI. PhzI é responsável pela produção de hexanoil-L-homoserina lactona (HHL). Quando a HHL se acumula a uma determinada concentração, provavelmente interage com PhzR, permitindo que este se ligue às sequências específicas, presente nas regiões biossintéticas de *phz* e promotoras de *phzI*. A ligação ativa a expressão de genes biossintéticos de *phz* e, também, aumenta a expressão de *phzI*.

Estudos recentes demonstraram que o autoindutor sintetizado na direção de *phzI*, é produzido na rizosfera pela bactéria em concentrações adequadas para ativar a transcrição dos genes da biossíntese de fenazina nas células vizinhas. Estes resultados são particularmente importantes, pois demonstram que a expressão de genes relevantes para o controle biológico é influenciada pela comunidade bacteriana na rizosfera (Loper *et al.*, 1997; Pierson III *et al.*, 1997). Desta maneira, a comunidade regula a concentração do antibiótico a níveis que garantam sua sobrevivência naquele *habitat*.

Durante as pré avaliações para a escolha do meio mais apropriado para a extração do antibiótico para análise, foi observado que a adição de glicose aumentou em dez vezes a produção do antibiótico, indicando que este composto estimula sua síntese. Isto sugere a possível utilização de fonte de C nas formulações de inoculantes para Agentes do Controle Biológico que possuam o mecanismo de antibiose para inibição de doenças.

Entretanto, a adição da glicose foi evitada para não superestimar a capacidade da estirpe, pois o objetivo deste estudo era avaliar o real potencial de produção de fenazinas. As quantidades produzidas foram suficientes para inibir em 50% o crescimento do *F. solani*, o que foi observado durante a pré-avaliação. Esta constatação sugere que algumas estirpes apresentam potencial para utilização como Agentes do Controle Biológico, necessitando de avaliações *in situ*, preferencialmente, no campo.

Vários modos de ação das fenazinas são propostos, dentre eles estão a intercalação do DNA, inibição da síntese do RNA e, pela habilidade destes compostos em tolerar reações de oxi-redução, a geração de peróxidos e superóxidos citotóxicos ou a parada de processos metabólicos associados à membrana, como o transporte ativo (Pierson III & Thomashow, 1992). É o mecanismo proposto para a piocianina (5-metil-1-hidroxifenazina) e, provavelmente, do PCA. A piocianina inibe a respiração bacteriana e ativa o transporte de solutos, o que sugere que o antibiótico interage com a cadeia respiratória e interfere na habilidade da célula em produzir energia e em processos metabólicos, como o transporte ativo (Ownley *et al.*, 1992).

5.3. Caracterização genotípica de estirpes de *Pseudomonas*

O estudo da relação entre a rizosfera e a diversidade genética das populações microbianas locais é necessário para avaliar o efeito da inoculação de microrganismos no equilíbrio pré-existente das populações nativas. Na prática, os resultados destes estudos podem estimar o destino das estirpes introduzidas e seus impactos nas comunidades patogênicas, quando se avalia a produção de antibióticos.

Muitas vezes, a caracterização mais detalhada de estirpes pode ser obtida utilizando-se um único “primer”. O “primer” para BOX-PCR é, geralmente, recomendado, pois gera perfis genotípicos robustos e constrói um padrão de bandas altamente complexo (de Bruijn *et al.*, 1996). Além disto, a facilidade da técnica (não há a necessidade de extração do DNA), permite trabalhar com maior número de amostras. Estas duas características da técnica levaram a sua escolha para a análise genotípica de *Pseudomonas phz⁺*. As análises mostraram que a maioria das estirpes possuía perfil genotípico semelhante ao da estirpe de *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (similaridade > 70%). A análise de BOX-PCR permite agrupar a nível de espécie/estirpe. Os resultados obtidos indicam que as estirpes pertencem à espécie de *P. fluorescens*. Este resultado sugere, mais uma vez, que o sistema de ciclagem incrementou a comunidade de PGPR, especialmente *Pseudomonas* do grupo fluorescentes. Estudos para classificação e identificação de 19 estirpes de *Xanthomonas* spp. foram determinados utilizando rep-PCR. As estirpes foram analisadas em duplicata. Os resultados mostraram que a similaridade nos perfis de bandas das estirpes da mesma espécie foi superior a 70%. Foi observado, também que mesmo estirpes extremamente correlatas podem ser distinguidas pela metodologia de rep-PCR (de Bruijn *et al.*, 1996).

Na avaliação dos perfis de bandas geradas pela análise das estirpes, foram notados três padrões diferentes, sendo, contudo, classificados como da espécie *P. fluorescens*. Por este motivo, foram divididos em três grupos, sugerindo que estes grupos foram os mais adaptados à rizosfera de soja cultivada sob solo de cerrado. Di Giovanni *et al.* (1999) observaram, utilizando ERIC-PCR, diferenças nas comunidades das rizosferas de alfafas analisadas, sendo estas específicas para cada uma, e que eram compostas de poucos

tipos de bactérias. Estes sugeriram, também, que a especificidade na utilização de fontes Carbono, observada nos teste de BIOLOG™, seria um fator importante na seleção destes organismos. Os exsudatos das raízes selecionam as bactérias capazes de assimilar os compostos excretados.

Entretanto, os poucos perfis encontrados na rizosfera da soja não indicam, necessariamente, que haja baixa diversidade bacteriana no local, pois analisou-se uma comunidade selecionada pela própria rizosfera e, também, pelo tratamento utilizado para incrementar a comunidade de PGPR na rizosfera (ciclagem).

Várias repetições para análise por BOX-PCR foram processadas. Algumas estirpes apresentaram diferentes perfis, sugerindo que o “primer” não foi capaz de agrupá-los, provavelmente, por inespecificidade. Esta inespecificidade pode ter sido causada por alguns fatores, como presença de contaminantes na preparação do DNA. A técnica de BOX-PCR utiliza o DNA de células rompidas, o que aumentaria a probabilidade de interferência de contaminantes na reação de polimerização.

Para uma análise mais detalhada, foi utilizada a técnica de ERIC-PCR. Esta técnica utiliza o DNA bacteriano purificado. Os “primers” para ERIC são mais sensíveis, e, também, geram padrões altamente discriminatórios. Assim como REP-PCR e BOX-PCR, o ERIC-PCR permite agrupar as estirpes a nível de espécie/estirpe. A similaridade entre os três grupos formados, assim como, a grande similaridade entre as estirpes dentro de cada grupo sugeriram a análise por ERIC-PCR (de Bruijn *et al.*, 1996). Todas as estirpes testadas, exceto a UN110 e UN436, apresentaram similaridade com a estirpe 2-79 maior que 90%, sugerindo estreito agrupamento a nível de subespécie/estirpe e, mesmo, a ocorrência de alguns clones, devido ao sistema de ciclagem utilizado para formação da coleção de culturas. Foram utilizados representantes de cada um dos grupos obtidos por BOX-PCR. A estirpe UN436 pode ser classificada a nível de espécie/estirpe, apresentando perfil genotípico relativamente distinto. A estirpe UN110 apresentou-se bem distinta da estirpe de *P. fluorescens* 2-79 (menor que 20%), aproximando-se mais da estirpe de *P. aureofaciens* 30-84 (44%), também produtora de fenazinas. Este resultado indica que a referida estirpe não pode ser classificada como pertencente às espécies *P. fluorescens*

e *P. aureofaciens*, pois para isto deveria apresentar índice de similaridade maior que 70%.

Os resultados, também, ratificam a necessidade de utilização de mais de uma técnica de análise de ácidos nucléicos quando se classifica uma comunidade microbiana, pois cada técnica tem vantagens e desvantagens, com relação à facilidade de aplicação, reproducibilidade, necessidade de equipamentos e nível de resolução. A combinação de técnicas permite agrupar melhor os indivíduos tanto a nível de gênero/espécie, quanto a nível de espécie/estirpe. Esta combinação permitiu comparações entre gêneros, quando perfis genotípicos obtidos por rep-PCR e por ARDRA de estirpes endêmicas de *Bradyrhizobium* que nodulam leguminosas das Ilhas Canárias foram avaliados, concomitantemente, com os resultados obtidos pelas análises de 16S rDNA PCR/RFLP (Vinuesa-Fleischmann *et al.*, 1998).

De Bruijn *et al.* (1996) compararam os resultados obtidos das análises de perfis genotípicos obtidos por rep-PCR com aqueles obtidos por outras técnicas comumente utilizadas para identificação de estirpes ou para avaliação da diversidade das comunidades bacterianas. Observaram que rep-PCR é comparável aos protocolos baseados na serologia, RFLP, MLEE e características bioquímicas. Estudos sobre a diversidade genética de *X. oryzae* pv. *oryzae* mostraram que os dendogramas derivados de rep-PCR correspondiam exatamente aos dados obtidos por RFLP. Isto indicou que os padrões de perfis genotípicos obtidos por rep-PCR refletem a organização do cromossoma bacteriano e a utilidade da técnica para estudos de diversidade microbiana e classificação/identificação de grupos bacterianos intimamente relacionados.

5.4. Caracterização fenotípica de estirpes de *Pseudomonas*

A análise de utilização de carbono em placas de BIOLOG™ mostrou que a maioria das estirpes testadas apresentou, basicamente, o mesmo perfil de assimilação de fontes de C, com exceção das estirpes UN110 e UQ122. Este perfil corresponde ao de *P. fluorescens*. Foram capazes de assimilar 63 das 95 fontes de C, ou seja, 66% das fontes testadas. Isto sugere significativa capacidade adaptativa, devido à versatilidade metabólica das estirpes. Esta

versatilidade é uma característica marcante de bactérias do gênero *Pseudomonas*, sendo, por isto, encontradas nos mais variados habitats, como solos, plantas, águas, sedimentos (Lynch, 1990)

O perfil metabólico da estirpe UN110 foi significativamente distinto das demais estirpes testadas. Foi observado que este foi capaz de assimilar grande parte das fontes de C utilizadas para identificação nas placas BIOLOG™: 78 das 95 fontes de C, cerca de 82% das fontes testadas. Este fato ratifica o que foi observado na caracterização genotípica discutida acima. A estirpe apresentou baixa homologia com as estirpes de *P. fluorescens* 2-79 e de *P. aeruginosa* 30-84. Sua identificação depende de avaliações metabólicas e genéticas mais detalhadas. Entretanto, quando é feita a identificação de *Pseudomonas* fluorescentes, é necessário saber que a diversidade nutricional das espécies faz com que sejam subgrupadas em biotipos, dos quais já surgiram novas espécies (Palleroni, 1984). Os biotipos D e E de *P. fluorescens* foram classificados como espécies *P. chlororaphis* e *P. aureofaciens*, respectivamente.

A versatilidade metabólica da estirpe é maior quando se compara com os demais estirpes testadas. Esta característica é importante, para um ACB, pois este deve ser capaz de colonizar diferentes rizosferas, utilizando diferentes fontes de C contidas nos exsudatos radiculares.

Com relação à estirpe UQ122, a diferença na utilização de C, pode ser devido à adaptação ao ambiente do qual foi isolada. É comum que estirpes da mesma espécie apresentem vias metabólicas diferentes como forma de adaptação ao ambiente. Reconhecidamente, os exsudatos de raízes e lisados de diferentes plantas hospedeiras podem influenciar, a curto prazo, na estrutura das populações de rizobactérias (Ross *et al*, 2000). A longo prazo, entretanto, a influência dos diferentes compostos de C derivados da raiz pode influenciar as características genotípicas de cada espécie. Outra explicação para esta observação, é que diferentes exsudatos radiculares de distintos vegetais exercem pressão seletiva na rizosfera, favorecendo estirpes com vias específicas de utilização de carbono que são capazes de assimilar amplo espectro de exsudatos e lisados (Ross *et al.*, 2000).

A utilização da diversidade de fenótipos existentes na rizosfera é importante para melhorar a performance de Agentes do Controle Biológico (ACB).

Baseado neste fato alguns autores têm estudado a combinação de ACB nas formulações de inoculantes. Pierson & Weller (1994) testaram a combinação de estirpes de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Observaram que num ensaio de campo desenvolvido em campos de trigo nos E.U.A, a mistura de quatro estirpes foi a que aumentou significativamente a produção do trigo em comparação ao tratamento controle, enquanto cada estirpe individualmente não produziu efeito significativo. Maior diversidade de fenótipos associada às combinações de inoculantes de ACB resulta numa comunidade diversa e potencialmente mais estável que é capaz de colonizar melhor a raiz e/ou sobreviver às mudanças físicas, químicas e biológicas que ocorrem na rizosfera ao longo do desenvolvimento da planta (Weller & Thomashow, 1994).

5.5. Sequenciamento genômico do fragmento para síntese de PCA

Os fragmentos extraídos das estirpes foram sequenciados e apresentaram alta homologia (>96%) com o fragmento encontrado em 2-79 responsável pela síntese de PCA. Isto reforça a hipótese que os genes *phz* são conservados entre as estirpes de *P. fluorescens*, *P. aureofaciens* e *P. chlororaphis* (Weller *et al.*, 1997). O mesmo ocorre com a região biossintética de fluoroglucinol (Phl). Esta região mostrou ser altamente conservada entre estirpes de coleções provenientes de várias partes do mundo, porque uma região do DNA cromossômico da estirpe Q2-87, codifica sequências do DNA das quais fazem parte a síntese de Phl (Keel *et al.*, 1996; Bangera & Thomashow, 1997; Bonsall *et al.*, 1997).

Os primeiros estudos sugeriram que os genes para a síntese de antibióticos poderiam estar espalhados no genoma, porém análises mais aprofundadas, mostraram que *loci* biossintéticos eram grandes e funcionalmente completos (Thomashow & Weller, 1995). Thomashow & Weller (1988) observaram que a complementação de mutantes com sequências homólogas clonadas da biblioteca genômica da estirpe de 2-79 de *P. fluorescens* restaurou a síntese de fenazina, a inibição do fungo *in vitro* e o controle da “Podridão do Pé” em trigo. Pierson III & Thomashow (1992) estudaram o locus de fenazina da estirpe 30-84 de *P. aureofaciens*. Observaram que culturas de *Escherichia coli* que continham um fragmento *EcoRI* de 9,2kb da estirpe 30-84 produziam PCA, 2-OH-PCA e 2- hidroxifenazina. Esta observação sugeriu que as sequências clonadas codificam um locus estrutural para uma grande parte da via biossintética da fenazina. A mutagênese e análise de deleção identificaram um segmento de aproximadamente 2,8kb que foi essencial para a produção das três fenazinas, do qual 0,9kb foi necessário especificamente para a síntese de hidroxifenazina na estirpe 30-84 e em *E. coli*.

Mavrodi *et al.* (1998) analisaram a organização e função do locus para biossíntese de ácido monocarboxílico fenazina da estirpe 2-79 de *P. fluorescens*. Observaram, também, dois novos genes do locus homólogo da estirpe 30-84 de *P. aureofaciens* (atualmente *P. chlororaphis*). Este genes foram descritos, assim como a estrutura e função dos grupos de genes

biossintéticos das duas estirpes foram comparadas. Os resultados sugeriram que o mecanismo de síntese de fenazina é bastante conservado entre as espécies de *Pseudomonas* fluorescentes. A alta homologia dos fragmentos genômicos extraídos das estirpes testadas com a estirpe 2-79 ratifica o observado pelos autores.

O produto do gene *phzC* apresenta alto grau de similaridade com a DAHP sintase de plantas que catalizam o primeiro passo na via do chiquimato. Em bactérias, isoenzimas DAHP sintase são reguladas por transcrição, ou mesmo, através da inibição retroativa por aminoácidos ou caminhos intermediários e, portanto, representam um ponto de regulação do fluxo de carbono na via do chiquimato. Todas as DAHP sintases foram agrupadas em duas classes baseada na similaridade na sequências das proteínas. A proteína codificada por *phzC* (PhzC) da estirpe 2-79 de *P. fluorescens* é uma típica enzima do tipo II. Quando expressa na fase mais tardia do crescimento, PhzC pode funcionar como desvio de carbonos na via do chiquimato, fornecendo altos níveis de ácido corísmico, necessários para a síntese de PCA (Mavrodi *et al.*, 1998).

Os produtos dos genes *phzD* e *phzE* agem para modificar o corismato antes da reação de condensação, resultando na formação do núcleo de fenazina. O produto de *phzD* apresenta alto grau de similaridade com 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato sintases (isocorismatases) bacterianas. A presença de isocorismatase análoga no locus *phz* ocasiona a modificação do precursor imediato do núcleo de fenazina. De acordo com estas observações, os autores concluíram que diferentes espécies de *Pseudomonas* fluorescentes devem possuir uma via comum que confere a habilidade de sintetizar o núcleo de fenazina.

Apesar do interesse mundial no uso de PGPRs como sistema para liberação de produtos de genes importantes para proteção vegetal e, mesmo sendo o Controle Biológico considerado a melhor alternativa ao uso de pesticidas, existem preocupações referentes aos possíveis efeitos adversos da introdução de grandes populações de Agentes do Controle Biológico nos agroecossistemas. A preocupação é maior quando os agentes não são nativos ou são geneticamente modificados. Entretanto, genes de importância para o controle biológico, especialmente os que resultam na produção de antibióticos,

amplamente distribuídos entre *Pseudomonas* associadas às raízes de plantas em solos de diferentes continentes podem minimizar as preocupações sobre a liberação de agentes não nativos ou, mesmo, transgênicos (Keel *et al.*, 1996).

6. Conclusões

- ✓ O sistema de ciclagem ou plantio contínuo foi bastante eficaz na formação e seleção de coleção de culturas de *Pseudomonas* fluorescentes, por incrementar esta comunidade com ação de promotoras de crescimento vegetal.
- ✓ Cerca de 25% das estirpes inibiram o crescimento do *Fusarium solani in vitro*, sugerindo capacidade de utilização destas estirpes como Agentes do Controle Biológico.
- ✓ Pouco mais de 50% das estirpes selecionadas *in vitro* apresentaram os genes da síntese de fenazina, indicando que a comunidade de produtores de antibióticos no local é abundante.
- ✓ As estirpes de *P. fluorescens* produziram ácido monocarboxílico fenazina (PCA) *in vitro*.
- ✓ O perfil genotípico e fenotípico das estirpes produtoras de fenazina, de maneira geral, agrupa-se à nível de gênero/espécie com a estirpe de *P. fluorescens* 2-79, portanto correspondendo ao biotipo da referida espécie.
- ✓ De modo geral, as estirpes testadas apresentaram perfil de assimilação de fontes de C semelhante entre si. Foram capazes de assimilar 63 das 95 fontes de C, indicando significativo potencial de adaptação e versatilidade metabólica.

- ✓ O sequenciamento genômico dos fragmentos de genes da síntese de fenazina das estirpes mostrou alta identidade entre os genes contidos nestas e na estirpe de *P. fluorescens* 2-79, capaz de sintetizar PCA.

Do exposto, conclui-se que a comunidade de *Pseudomonas* estabelecida na rizosfera de soja, cultivada em solo de Cerrado, foi capaz de produzir antibióticos, especialmente PCA. Esta comunidade era genética e fenotipicamente semelhante a estirpe de *P. fluorescens* 2-79, oriunda de campos de cultivo de trigo do noroeste dos Estados Unidos da América. Esta similaridade sugere que os genes *phzC* e *phzD* são conservados.

Foi observado, também, que as estirpes apresentavam significativo potencial para utilização como Agente do Controle Biológico, necessitando de experimentos *in situ*, especialmente em campo de produção de soja para comprovar sua aplicabilidade na agricultura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALABOUVETTE, C. Biological control of *Fusarium* wilt pathogens in suppressive soils.
In: HORNY, D. Biological control of soil-borne plant pathogens. Wallingford, Eds CAB International, 1990. p. 27-43
- ALEXANDER, M. Ecological interrelationships: Microbiology of rhizosphere.
In: _____.
Soil microbiology. Nova York, ed. Wiley Eastern Limited, 2ª ed., 1977.p.423-437.
- ANDRADE, D.E.G.T.; GOMES, A.M.A.; SILVA, E.B.; PEIXOTO, A.R., FERREIRA, A.S.; MICHEREFF, S.J. & MARIANO, R.L.R. Bean seed bacterization with *Bacillus* spp. and fluorescent pseudomonads for *Rhizoctonia solani* biocontrol.
In: STEPHENS, M.H. & BOWEN, G.D. Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. Dordrecht, Ed. Kluwer, 1994.p.77-79.
- ARAÚJO, M.A.V.; HAGLER, L.C.M.; HAGLER, A.N. & van ELSAS, J.D. Survival and root colonization by modified *Pseudomonas fluorescens* introduced into two different subtropical soils microcosms. FEMS Microbiol. Ecology 1-12, 1993.
- ARAÚJO, M.A.V.; HAGLER, L.C.M.; HAGLER, A.N. & van ELSAS, J.D. Survival, of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* introduced into subtropical soil microcosms. FEMS Microbiol. Ecology: 205-216, 1994.

- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A. & STRUHL, K. Short protocols in molecular biology. Nova York, Ed. John Wiley & Sons, 1995.
- BAKKER, A.W. & SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in the relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp. mediated plant growth stimulation. Soil Biol. Biochemistry, 19: 451- 457, 1987.
- BANGERA, M.G. & THOMASHOW, L.S. Characterization of a genomic locus required for synthesis of antibiotic 2,4 diacetylphloroglucinol by biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. Mol. Plant-Microbe Interaction, 9:83-90, 1996.
- BANGERA, M.G. & THOMASHOW, L.S. Identificação and characterization of a novel locus containing 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis genes *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. J. Bacteriology, 1997
- BARBOSA, M.A.G.; MICHEREFF, S.J.; MARIANO, R.L.R. & MARANHÃO, E. Biocontrole de *Rhizoctonia solani* em caupi pelo tratamento de sementes com *Pseudomonas* spp. fluorescens. Grupo Paulista de Fitopatologia, 21(2):151-157, 1995.
- BETTIOL, W.; BRANDÃO, M.S.B., & SAITO, M.L. Controle de ferrugem do feijoeiro com extratos e células formuladas de *Bacillus subtilis*. Summa Phytopathologica, 18: 153-159, 1992.
- BINNERUP, S.J.; JENSEN, D.F.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. & SØRENSEN, J. Detection of viable, but non-culturable *Pseudomonas fluorescens* DF57 in soil using a microcolony epifluorescence technique. FEMS Microbiol. Ecology, 12:97-105, 1993.
- BONSALL, R.F.; WELLER, D.M. & THOMASHOW, L.S. Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. In vitro and in the rhizosphere of wheat. Appl. Environ. Microbiology, 63(3):951- 955, 1997.
- BOSSIS, E.; LEMANCEAU, P.; LATOUR, X. & GARDAN, L. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. Agronomie, 20:51-63, 2000.
- BOTELHO, G.R.; GUIMARÃES, V.; De BONIS, M.; FONSECA, M.E.F.; HAGLER, A.N. & HAGLER, L.C.M. Ecology of a plant growth-promoting strain of *Pseudomonas fluorescens* colonizing the maize endorhizosphere in tropical soil. W. J. Microbiol. and Biotechnology, 14:499-504, 1998.
- BOWDEN, K.; BROADBENT, J.L. & ROSS, W.J. Some simple antihelmintics. Br. J. Pharmacology, 24: 714-724, 1965.
- BURR, T.J. & CAESAR, A. Beneficial plant bacteria. Crit. Rev. Plant Science., 2:1-20,

- 1984.
- BUYER, J.S. & LEONG, J. Iron transport-mediated antagonism between plant growth-promoting and plant deleterious *Pseudomonas* strains. J. Biol. Chemistry, 261:791-794, 1986.
 - CATTELAN, A.J. Antagonismo de *Pseudomonas* do grupo fluorescente a fungos fitopatogênicos de solo e sementes de soja. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 18: 37-42, 1994.
 - CENTURION, M.A.P.C. Seleção e identificação de microrganismos antagônicos à ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli*). Summa Phytopathologica, 20: 174-178, 1994
 - CENTURION, M.A.P.C. & KIMATI, H. Controle biológico da ferrugem do feijoeiro com bactérias antagônicas. Summa Phytopathologica, 20:179-183, 1994.

 - COOK, R.J.; THOMSHOW, L.S.; WELLER, D.M.; FUJIMOTO, D.; MAZZOLA, M. & BANGERA, G. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 92: 4197- 4201, 1995.
 - CORBELL, N.A.; KRAUS, J.; LOPER, J.E. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. J. Bacteriology, 177: 6230-6236, 1995
 - CURL, E.A. & TRUELOVE, B. The rhizosphere. Nova York, Ed. Springer-Verlag, 1986.
 - De BRUIJN, F.J. Use of repetitive(repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and polymerase chain reaction to fingerprinting the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. App. Environ. Microbiology, 58:2180-2187, 1992.
 - De BRUIJN, F.J.; SCHNEIDER, M.; ROSSBACH, U. & LOUWS, F.J. Automated Fluorescent and Conventional Rep-PCR genomic fingerprinting and multiplex PCR to classify bacteria and track genes. In: MARTINS, M.T.; SATO, M.I.Z.; TIEDJE, J.M.; HAGLER, L.C.M. & SANCHEZ, P.S. Progress in microbial ecology. São Paulo, Ed. SBM/ICOME, 1997.p. 197-205.
 - De BRUIJN, F.J.; RADEMAKERS, J.; SCHNEIDER, M.; ROSSBACH, U. & LOUWS, F.J. Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-

- assisted phylogenetic analyses. In: STACEY, G.; MULLIN, B. & GRESSHOFF, P.
- Biology of plant-microbe interaction; Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant Microbe Interactions. , Ed. APS Press, 1996, p.497-502.
- Di GIOVANNI; WATRUD, L.S.; SEIDLER, R.J. & WIDMER, F. Comparison of parental and transgenic alfafa rhizosphere bacterial communities using Biolog GN metabolic fingerprinting and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence-PCR (ERIC-PCR). *Microbial Ecology*, 37:129-139, 1999.
 - DIMRI, G.P.; RUDD, K.E.; MORGAN, M.K.; BAYATT, H. & AMES, G.F.L. Physical mapping of repetitive extragenic palindromic sequences in *Escherichia coli* and phylogenetic distribution among *Escherichia coli* strains and others enteri bacteria.
J. Bacteriology, 174: 4583-4593, 1992.
 - EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Recomendações técnicas para a cultura na região Central do Brasil. Londrina, EMBRAPA-Soja, 1996:
 - FENTON, A.M., STEPHENS, P.M.; CROWLEY, J.; O'CALLAGHAN, M. & O'GARA, F. Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol byosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *App. Environ.Microbiology*, 58: 3873-3878, 1992
 - FREITAS, S.S. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp. *Revista Brasileira de Ciências do solo*, 13: 31-34, 1989.
 - FRIGHETTO, R.T.S. & De MELO, I.S. Produção de antibióticos por microrganismos. In: De MELO, I.S. & SANHUEZA, R.M.V. Métodos de seleção de microrganismos antagonicos a fitopatógenos. Jaguariúna, Ed. Hortograf, 1995.p.40-46.
 - FUQUA, C.;WINANS, S.C. & GREENBERG, E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology*, *J. Bacteriology*, 176: 269-275, 1994.
 - GARLAND, J.L. Patterns potential C source utilization by rhizosphere communities. *Soil Biol. Biochemistry*, 28:223-230, 1996.
 - GARLAND, J.L. & MILLS, A.L. Characterization and classification of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *App. Environ. Microbiology*, 57: 2351-2359, 1991.
 - GEORGAKOPOULOS, D.; HENDSON, M.; PANOPOULOS, N.J. & SCHROTH, M.N. Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens*

- and analysis of its expression in vitro with the ice nucleation reporter gene. *App. Environ. Microbiology*, 60:2931-2938, 1994a.
- GEORGAKOPOULOS, D.; HENDSON, M.; PANOPOULOS, N.J. & SCHROTH, M.N. Analysis of expression of a phenazine biosynthesis locus from *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 on seeds with a mutant carrying a phenazine biosynthesis locus-ice nucleation reporter gene fusion. *App. Environ. Microbiology*, 60:4573-4579, 1994b.
 - GURUSIDDIAH, S.; WELLER, D.M.; SARKAR, A. & COOK, R.J. Characterization of an antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 29(3): 488-495, 1996.
 - HAAS, S.K.; GARCHOW, H.; KLUG, M.J. & FORNEY, L.J. Analysis of factors affecting the accuracy, reproducibility and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *App. Environ. Microbiology*, 61:1458-1468, 1995
 - HAMMER, P.E., HILL, D.S. & LIGON, J. Characterization of genes from *Pseudomonas fluorescens* involved in synthesis of pyrrolnitrin. *Phytopathology*, 85:1162, 1995.
 - HAMMER, P.E.; HILL, D.S.; LAM, S.T.; Van PÉE, K.H. & LIGON, J.M. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *App. Environ. Microbiology*, 63: 2147-2154, 1997.
 - HILL, D.S.; STEIN, J.I.; TORKEWITZ, N.R.; MORSE, A.M.; HOWELL, C.R.; PACHLATKO, J.P.; BECKER, J.O & LIGON, J.M. Cloning of genes involved in the synthesis in biological control of plant disease. *Appl. Environ. Microbiology*, 60(1): 78-85, 1994.
 - HOLBEN, W.E.; JANSSON, J.K.; CHELM, B.K. & TIEDJE, J.M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *App. Environ. Microbiology*, 54: 703-711, 1988.
 - HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. & WILLIAMS, S.T. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1994.
 - HOMMA, Y. Mechanisms in biological control – focused on the antibiotic pyrrolnitrin. In: RYDER, M.H.; STEPHENS, P.M. & BOWEN, G.D. *Improving plant productivity*

- with rhizobacteria. Adelaide, Ed.CSIRO Division of Soils, 1994.p. 100-103.
- HUANG, Y.H. Reaction of selected soybean genotypes to isolates of *Fusarium solani* f.sp.*glycines* and their culture filtrates. Plant Disease, 82(9):999-1002, 1998.
 - HOWELL, C.R. & STIPANOVIC, R.D. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings
with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium.
Phytopathology, 69: 480-482, 1979.
 - HOWELL, C.R. & STIPANOVIC, R.D. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. Phytopathology, 70:712-715, 1980.
 - KANNER, D.; GERBER, N.N & BARTHA, R. Pattern of phenazine pigment production by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriology, 134(2): 690-692, 1978.
 - KEEL, C.; SCHNIDER, U.; MAURHOFER, M.; VOISARD, J.; LAVILLE, P.; BURGER, P.; WIRTHNER, P.; HAAS, D. & DÉFAGO, G. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: importance of the secondary metabolite ,2-4-diacetylphloroglucinol. Mol. Plant- Microbe Interactions., 5:4-13, 1992.
 - KEEL, C.; WELLER, D.M.; NATSCH, A.; DEFAGO, G.; COOK, R.J. & THOMASHOW, L.S. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. App. Environ. Microbiology, 62(2): 552-563, 1996
 - KING, E.O., WARD, M.K.; & RANEY, D.E. Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med., 44:301-307, 1954.
 - KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N.. & MILLER, T.D. Effect of rhizosphere colonization
by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield.
Phytopathology, 70(7):1078-1082, 1980.
 - KLOEPPER, J.W.; SCHIPPERS, B. & BAKKER, P.A.H.M. Proposed elimination of the term **endorhizosphere**. Phytopathology, 82(7):726-727, 1992.
 - KOGURE, K.; SIMIDU, U. & TAGA, N. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. Can. J. Microbiology, 25:415-420, 1979.
 - KRAUS, J. & LOPER, J.E. Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium ultimum* damping-off of cucumber. Phytopathology, 82: 264-271, 1992.

- KRAUS, J. & LOPER, J.E. Characterization of a genomic region required for production of the pyoluteorin by biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *App. Environ. Microbiology*, 61(3): 849-854, 1995.
- LARKIN, R.P. & FRAVEL, D.R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Disease*, 82: 1022-1028, 1998.
- LEMANCEAU, P.; CORBERAND, T.; GARDAN, L.; LATOUR, X.; LAGUERRE, G.; BOEUFGRAS, J.M. & ALABOUVETTE, C. Effect of two plant species, flax (*Linum Usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *App. Environ. Microbiology*, 61(3): 1004-1012, 1995.
- LEE, D.H.; ZO, Y.G. & KIM, S.J. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand conformation polymorphism. *App. Environ. Microbiology*, 62:3112-3120, 1996.
- LEVY, E.; GOUGH, F.J.; BERLIN, K.D.; GUIANA, P.W. & SMITH, J.T. Inhibition of *Septoria tritici* and other phytopathogenic fungi and bacteria by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics. *Plant Pathology*, 41:335-341, 1992.
- LI, S. Chlamydospore formation, production and nuclear status in *Fusarium solani* f.sp. *glycines* soybean sudden death syndrome-causing isolates. *Mycologia*, 90(3):414-421, 1998.
- LIESACK, W.; JANSSEN, P.H.; RAINEY, F.A.; WARD-RAINEY, N.L. & STACKEBRANDT, E. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: Van ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T. & WELLINGTON, E.M.H. *Modern soil microbiology*. Nova York, Ed. Marcel Dekker, 1997.p.375-439.
- LOPER, J.E. & BUYER, J.S. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, 4:5-13, 1991
- LOPER, J.E.; NOWAK-THOMPSON, B.; WHISTLER, C.A.; HAGEN, M.J.; CORBELL, N.A.; HENKELS, M.D. & STOCKWELL, V.O. Biological control mediated by antifungal metabolite production and resource competition: an overview. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, K.; HOMMA, F.; KONDO, N. & AKINO, S. *Plant growth-promoting rhizobacteria – Present status and future prospects*. Paris, Ed.

- OECD/OCDE, 1997.p. 73-79.
- LUGTENBERG, B.J.J.; De WEGER, A.L. & BENNET, J.W. Microbial stimulation of plant growth and protection from disease. *Curr. Op.Biotechnology*, 2:457-464, 1991.
 - LUPSKI, J.R. & WEINSTOCK, G.M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J. Bacteriology*, 174:4525-4529, 1992.
 - LUZ, W.C. Controle microbiológico do mal-do-pé do trigo pelo tratamento de sementes
Fitopatologia Brasileira, 19:144-148, 1993.
 - LUZ, W.C. Rhizobactérias promotoras de crescimento em plantas e bioproteção.
Revisão Anual de Patologia de Plantas, 4:1-49, 1996.
 - LYNCH, J.M. *The rhizosphere*. Nova york, Wiley Interscience, 1990.
 - MANIATIS, T., FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Nova York, Ed. Cold Spring Harbor, 1982.
 - MANARA, N.T.F. Origem e Expansão. In: dos SANTOS, S. O. *A cultura da soja*, 1: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná. Rio de Janeiro, Ed. Globo,1988.p. 15-23.
 - MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; SILVEIRA, E.B.; ASSIS, S.M.P. & REIS, A. Plant growth-promoting rhizobacteria in Brazil. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, K.; HOMMA, F.; KONDO, N. & AKINO, S. *Plant growth-promoting rhizobacteria – Present status and future prospects*. Paris, Ed. OECD/OCDE,1997.p. 22-29.
 - MARTINS, E.M.F.; BERETTA, M.J.G.; ROVERATTI, D.S. & MORAES, W.B.C. Comparative induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants by non-specific inducers from different fungal and bacterial origins. *Fitopatologia Brasileira*, 10:521-529, 1985.
 - MASCHER, F.; HASE, C.; MOËNNE-LOCCOZ & DÉFAGO, G. The viable-but-nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHAO does not promote strain persistence in soil. *App. Environ. Microbiology*, 66(4):1662-1667, 2000.
 - MAURHOFER, M.; KEEL, C.; SCHNIDER, U.; VOISARD, C.; HAAS, D. & DÉFAGO, G. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO on its disease suppressive capacity. *Phytopathology*, 82:190-195, 1992.
 - MAVRODI, D.V.; KSENZENKO, V.N.; BONSALE, R.F.; COOK, R.J.; BORONIN, A.M. & THOMASHOW, L.S. A seven –gene locus for synthesis of phenazine –1 carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J. Bacteriology*, 180(9): 2541-2548, 1998.

- MAZZOLA, M.; COOK, J.; THOMAS, L.S.; WELLER, D.M. & PIERSON III, L.S. contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *App. Environ. Microbiology*, 58(8):2616-2624, 1992.
- MIZUBUTI, E.S.G.; MAFIA, L.A.; MUCHOVEJ, J.J., ROMEIRO, R.S. & BATISTA, U.G. Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust. *Fitopatologia Brasileira*, 20:540-544, 1995.
- MORE, M.I.; FINGER, D.; STRYKER, J.L.; FUQUA, C.; EBERHARD, A. & WINANS, S.C. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science*, 272: 1655-1658, 1996.
- MUYZER, G.; De WAAL, E.C. & UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16s rRNA. *App. Environ. Microbiology* 59: 695-700, 1993.
- NASEBY, D.C. & LYNCH, J.M. Effects of *Pseudomonas fluorescens* F113 on ecological functions in the pea rhizosphere are dependent on pH. *Microbial Ecology*, 37:248-256, 1999.
- NORMANDER, B.; HENDRIKSEN, N.B. & NYBROE, O. Green fluorescent protein-marked *Pseudomonas fluorescens*: localization, viability and activity in the natural barley rhizosphere. *App. Environ. Microbiology*, 65(10): 4646-4651, 1999.
- NORONHA, M.A.; MICHEREFF, S.J. & MARIANO, R.L.R. Efeito do tratamento de sementes de caupi com *Bacillus subtilis* no controle *Rhizoctonia solani*. *Fitopatologia*, 20: 174-178, 1995.
- O'DONNELL, K. & GRAY, L.E. Phylogenetic relationships of the soybean sudden death syndrome pathogen *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* inferred from rDNA sequence data and PCR primers for its identification. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, 8(5): 709-716, 1995.
- OGRAM, A.; SAYLER, G.S. & BARKAY, T.J. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods*, 7:57-66, 1987.
- O'SULLIVAN, D. & O'GARA, F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Review.*, 56(4): 662-674, 1992.

- OWNLEY, B.H.; WELLER, D.M. & THOMASHOW, L.S. Influence of *in situ* and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathology*, 82: 178-184, 1992.
- PALLERONI, N.J. Genus I *Pseudomonas*. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore, Ed. Williams and Wilkins Co., 1984. V. 1, p. 141-168.
- PAULITZ, T.C. Effect of *Pseudomonas putida* on stimulation of *Pythium ultimum* by seed volatile of pea and soybean. *Phytopathology*, 81:1282-1287, 1991.
- PICARD, C.; Di CELLO, F.; VENTURA, M., FANI, R. & GUCKERT, A. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol- producing bacteria isolated from maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3): 948-955, 2000
- PERONDI, N.L.; Da LUZ, W.C.; THOMAS, R. Controle microbiológico da giberela do trigo. *Fitopatologia Brasileira*, 21:243-249, 1996.
- PFENDER, W. F., KRAUS, J. & LOPER, J.E. A genomic region from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 required for pyrrolnitrin production and inhibition of *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat straw. *Phytopathology*, 83:1223-1228, 1993.
- PIERSON III, L.S. & THOMASHOW, L.S. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, 5(4): 330-339, 1992.
- PIERSON , L.S. & WELLER, D.M. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology*, 84:940-947, 1994
- PIERSON III, L.S.; GAFFNEY, T.; LAM, S. & GONG, F. Molecular analysis of gene encoding phenazine biosynthesis in the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *FEMS Microbiol. Letters*, 134:299-307, 1995.
- PIERSON III, L.S.; PIERSON, E.A.; WOOD, D.W.; CHANCEY, S.T. & HARVEY, D.E. Recent advances in genetic regulation of activity of plant growth-promoting rhizobacteria. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, K.; HOMMA, F.; KONDO, N. & AKINO, S. *Plant growth-promoting rhizobacteria – Present status and future prospects*. Paris, Ed. OECD/OCDE, 1997. p.94-101
- RAAIJMAKERS, J.M. & WELLER, D.M. Natural plant protection by 2,4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas* spp. in Take-all decline soils. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, 11(2):144-152, 1997.

- RAAIJMAKERS, J.M.; WELLER, D.M. & THOMASHOW, L.S. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *App. Environ. Microbiology*, 63(3): 881-887, 1997.
- RADEMAKER, J.L.W. & De BRUIJN, F.J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: CAETANO-ANOLLÉS, G. & GRESSHOFF, P.M. DNA markers: protocols, applications and overviews., Ed. Wiley & Sons, 1997.p.
- RAYMOND, R.N.; MULLER, G. & MATZANKE, F. Complexation of iron by siderophores. A review of their solution and structural chemistry and biological function. *Top. Curr. Chemistry*, 123:49-102, 1984.

- ROSADO, A. S.; DUARTE, G.F. & MENDONÇA – HAGLER, L.C. A moderna microbiologia do solo: Aplicação de técnicas de biologia molecular. In: SIQUEIRA, J. Soil fertility and microbiology, FERTBIO. Lavras, Ed. UFLA, 2000.p. 429-448
- ROSENBAUM, V. & RIESNER, D. Temperature –gradient gel electrophoresis: thermodynamic analyses of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys. Chemistry.*, 26: 235-246, 1987.
- ROSS, I.L.; ALAMI, Y.; HARVEY, P.R.; ACHOUAK, W. & RYDER, M.H. Genetic diversity and biological control activity of novel species of closely related *Pseudomonads* isolated from wheat fields soils in south Australia. *App. Environ. Microbiology*, 66(4):1609-1616, 2000.
- ROY, K.W. *Fusarium solani* on soybean roots: Nomenclature of the causal agent of sudden death syndrome and identity and relevance of *F. solani* form B. *Plant Disease*, 81(3):259-266, 1997.
- SCHER, F.M. & BAKER, B. Effects of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology*, 72: 1567-1573, 1982.
- SCHROTH, M.N. & HANCOCK, J.G. Disease suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science*, 216(25): 1376-1381, 1982.
- SHANAHAN, P.; O’SULLIVAN, D.J.; SIMPSON, P., GLENNON & O’GARA. Isolation of
2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonads and investigation of physiological parameters influencing its production. *App. Environ. Microbiology*, 58: 353-358, 1992.

- SILVA, J.B.; MATOS, J.A.R.; MICHEREFF, S.J., & MARIANO, R.L.R. Efeito da bacterização de sementes de algodoeiro no controle de *Rhizoctonia solani*. Fitopatologia Brasileira 21: 342-348, 1996.
- SIQUEIRA, J.O. & FRANCO, A.A. Biotecnologia do solo: Fundamentos e perspectivas. São Paulo, Ed. Gráfica Nagy Ltda, 1988. 235p.
- SMALLA, K.; CRESWELL, L.C.; MENDONÇA-HAGLER, L.C; WOLTERS, A. & ELSAS, J.D. van. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. J. Appl. Bacteriol., 74: 78-85, 1993.
- STUTZ, E.; DÉFAGO, G. & KERN, H. Naturally occurring fluorescent pseudomonads Involved in suppression of black root rot of tobacco. Phytopathology, 76: 181-185, 1986
- TADA, M.; TAKAKUWA, T.; NAGAI, M. & YOSHII, T. Antiviral and antimicrobial activity of 2,4- diacetylphloroglucinols, 2-acylcyclohexane-1,3-diones and 2-carboxamidocyclohexane-1,3-diones. Agr. Biol. Biochemistry., 54:3061-3063, 1990.
- THOMASHOW, L.S. Biological control of plant root pathogens. Current. Opinion In Biotechnology, 7:343-347, 1996
- THOMASHOW, L.S. & MAVRODI, D.V. The genetics and regulation of antibiotic production by PGPR. , In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, K.; HOMMA, F.; KONDO; N. & AKINO, S. Plant growth-promoting rhizobacteria – Present status and future prospects. Paris, Ed. OECD/OCDE ,1997.p. 108-114.
- THOMASHOW, L.S. & WELLER, D.M. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in Biological Control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* . J. Bacteriology, 170(8): 3499-3508, 1988.
- THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M.; BONSALL, R.F. & PIERSON III, L.S. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. App. Environ. Microbiology, 56:908-912, 1990.
- THOMASHOW, L.S. & WELLER, D.M. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: STACEY, G & KEEN, N Plant-Microbes Interactions. Nova York, Ed. Chapman & Hall,1995.vol.1, .p. 187-235.

- TURNER, J.M. & MESSENGER, A.J. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Adv. Microb. Physiology.*, 27: 211-275, 1986.
- Van ELSAS, J.D.; Van OVERBEEK, L.S.; FELDMANN, A.M.; DULLEMANS, A.M. & De LEEUW, O. Survival of genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* in soil in competition with the parent strain. *FEMS Microbiol. Ecology*, 85:53-64, 1991.
- Van PEER, R.; NIEMANN, G.J. & SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology*, 81: 728-734, 1991.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T. & LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting to bacterial genomes. *Nucl. Acids Res.* 19:6823-6831, 1991.

- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; De BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR. *Meth. Cell. Mol. Biology.*, 5:25-40, 1994
- VOISARD, C.; KEEL, C.; HAAS, D. & DÉFAGO, G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO Journal*, 8: 358-361, 1989.
- VOISARD, C.; BULL, C.T; KEEL, C.; LAVILLE, J.; MAURHOFER, M.; SCHNIDER, U.; DÉFAGO, G. & HAAS, D. Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHAO: current concepts and experimental approaches. In: O'GARA, F.; DOWLING, D.N. & BOESTEN, B. *Molecular ecology of rhizosphere microorganisms: Biotechnology and the release of GMOs*, VCH Verlagsgesellschaft mbH. Weinheim, Ed. Weinheim, 1994.p. 67-89.
- WELSH, J. & McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 7213-7219, 1990.
- WELSH, J. & McCLELLAND, M. Genomic fingerprintings produced by PCR with consensus t-RNA gene primers. *Nucleic Acids Res.*, 19: 861-866, 1991.
- WELLER, D.M. & COOK, R.J. Suppression of take-all of wheat by seed-treatment with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 73:463-469, 1983.
- WELLER, D.M. Biological control o soil borne plant pathogens in the rhizosphere wilt

- bacteria. *Ann. Rev. Phytopathology*, 26: 378, 1988.
- WELLER, D.M. & THOMASHOW, L.S. Use of rhizobacteria for biocontrol. *Curr. Opin. Biotechnology*, 4:306-311, 1993.
 - WELLER, D.M. & THOMASHOW, L.S. Current challenges in introducing beneficial microorganisms in to the rhizosphere. In: O'GARA; F.; DOWLING, D.N. & BOESTEN, B. *Molecular Ecology of Rhizosphere microorganisms*. Weinheim, Ed.VCH, 1994, p. 1-17.
 - WELLER, D.M.; RAAIJMAKERS, J.M. & THOMASHOW, L.S. The rhizosphere ecology of antibiotic-producing pseudomonads and their role in take-all decline. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, K.; HOMMA, F.; KONDO; N. & AKINO, S. *Plant growth-promoting rhizobacteria – Present status and future prospects*. Paris, Ed. OECD/OCDE, 1997.p. 58-65.
 - WOLLUM II, A.G. Cultural methods for soil microorganisms. In: MILLER, R.H. & KENEEY, D.R. *Methods of soil analysis*. Madison, Ed. American Society of Agronomy, 1982.p. 781-801.
 - WOOD, C.; VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T. & LUPSKI, J.R. Whole-cell repetitive element sequence- based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. *J. Clin. Microbiology*, 31: 1921-1931, 1993.
 - WOOD, D.W. & PIERSON III, L.S. The *phzI* gene of *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is responsible for production of a diffusible signal required for phenazine antibiotic production. *Gene*, 49-53, 1996.
 - WYMAN, A.R. & WHITE, R. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77: 6754-6758, 1980.
 - YANO, D.M.Y. & VALARINI. Métodos de identificação de bactérias. In: DE MELO, I.S. & DE AZEVEDO, J.L. *Ecologia microbiana*. Jaguariúna, Ed. EMBRAPA/CNPMA, 1998.p.369-390.

Apêndice

1. Meios

1.1. Meio Lurian Bertani (LB) (g/100ml)

Triptona	1%
Extrato de levedura	0,5%
NaCl	0,5%
Agar	1,7%

1.2. Meio King B (1000ml)

Peptona	20g
K ₂ HPO ₄ ou KH ₂ PO ₄	1,5g ou 1,2g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5g
Glicerol	10ml
Agar	17g

2. Tampões

2.1. Para eletroforese

Solução estoque de tampão TBE – Tris-Borato-EDTA(5x)

54,0g Tris Base
 27,5g Ácido bórico
 3,72g Na₂EDTA.2H₂O
 Ajustar para 1l de água destilada

2.2. Para rep- PCR

- Solução estoque de tampão de Gitschier (5x – V=200ml)

16,6ml 1M (NH₄)₂SO₄
 67ml 1M Tris-HCl (pH 8,8)
 6,7ml 1M MgCl₂
 1,3ml de um diluição de 1:100 de 0,5M EDTA (pH 8,8)
 2,08ml de estoque de β-mercapto-etanol 14,4M
 Ajustar o volume para 200ml com água destilada e estocar a -20°C.

3. Soluções

3.1. de hibridização

3.1.1. Solução estoque SSC (20x)

175,3g NaCl

88,2g Na₃ citrato.2H₂O

Ajustar o pH para 7,0 com 1M HCl, e completar para 1l com água destilada

3.1.2. Solução estoque de Denhart's (100x)

10g Ficol

10g Polivinilpirrolidona

10g BSA

500ml de água destilada

3.1.3. Solução de 10% SDS

100g/l Larilsulfato de sódio