

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA NO TRÓPICO
ÚMIDO

ROSINEIDE CARDOSO DE SOUZA

DETECÇÃO QUANTITATIVA DO GENE *phzF* NA BIOSÍNTESE DA
FENAZINA EM SOLOS RIZOSFÉRICOS DE TERRA PRETA DA
AMAZÔNIA

Manaus, Amazonas
Agosto, 2014

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA NO TRÓPICO
ÚMIDO

ROSINEIDE CARDOSO DE SOUZA

DETECCÃO QUANTITATIVA DO GENE *phzF* NA BIOSÍNTESE DA
FENAZINA EM SOLOS RIZOSFÉRICOS DE TERRA PRETA DA
AMAZÔNIA

ORIENTADOR: Prof. Rogério Eiji Hanada
Coorientadora: Prof^a. Dr^a Tsai Siu Mui

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Manaus, Amazonas
Agosto, 2014

S729 Souza, Rosineide Cardoso de
Detecção quantitativa do gene *phzF* na biossíntese da fenazina em solos rizosféricos de terra preta da Amazônia / Rosineide Cardoso de Souza. --- Manaus: [s.n.], 2014.
ix, 64 f.. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2014.
Orientador: Rogério Eiji Hanada.
Coorientador: Tsai Siu Mui.
Área de concentração: Ciências Biológicas, Agrárias e Humanas.

1. Solo tropical. 2. Terra Preta. 3. Gene biossintético. I. Título.

CDD 631.46

Sinopse:

Estudou-se a estrutura das comunidades bacterianas e a quantificação do gene Biossíntese *phzF* em amostras de solos rizosféricos de Terra Preta da Amazônia, buscando o conhecimento e identificação de biomoléculas com potencial biotecnológico.

Palavras chave: solo, compostos secundários, biotecnologia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar o dom da vida, pela infinita misericórdia e pela proteção e força durante essa caminhada.

A minha família, principalmente pelo carinho e torcida!

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido, pela possibilidade de realização deste curso.

À FAPEAM - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pela bolsa concedida.

Ao PROCAD- Programa Nacional de Cooperação Acadêmica que me deu a possibilidade de desenvolver toda pesquisa no Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP.

À Secretaria do curso pelo apoio fornecido.

Ao Dr. Rogério Eiji Hanada pela orientação e auxílio durante e execução do trabalho.

À Dr^a Tsai Siu Mui pela dedicada orientação, pelo incentivo, por ter me recebido em seu laboratório e acreditado em minha capacidade no desenvolvimento deste trabalho.

À Dr^a Fabiana de Souza Cannavan pelo carinho, paciência e dedicação no ensino das técnicas moleculares. Muito obrigada!!!

Aos professores: Dr. Luiz Antônio de Oliveira, Dr. Newton Paulo de Souza Falcão, Dr. Charles Roland Clemente e José Lavres Junior pelo apoio.

A todos os docentes que contribuíram para enriquecer o curso de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido, pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante as disciplinas ministradas e pelo convívio.

Ao técnico do laboratório de solo INPA, Sandoval Moraes, pela parceria nas coletas.

Ao Luiz Alberto (Tirico) e a Sr^a Marilene, do Laboratório de Fitopatologia do INPA, pelo carinho, dedicação e ajuda.

Ao Wagner Piacinni e Fabio Duarte, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular-CENA/USP; Zezo e Joelma Marcon, do Laboratório de Microbiologia e Genética da ESALQ/USP e Cleo, do Laboratório de Nutrição de Plantas CENA/USP.

Aos colegas e parceiros que fiz durante essa caminhada; à equipe do Laboratório de microbiologia de solo do INPA, Dr. Luiz Antônio de Oliveira, Bianca Galúcio Pereira, Francisco Wesen Moreira (Chiquinho o Bulacha); Aldecinei Bastos Siqueira, Isabelle Oliveira da Silva, Luciana Negro, Edilaine D' Avila e Cinara Pires.

Aos colegas do curso ATU, Ariel Dotto Blind, Igor Bahia, Hélio Vilas Boas, Adinã Matos, Camila Nogueira, Danielle oliveira, Poliana Perrut e Marcelo Lima.

Muito obrigada aos colegas de Piracicaba: Fernanda Nakamura, Acácio, Marcela, Aline, Bia Ferrari, Caio, Clovis, Dani, Dennis, Enéas, Fernanda, Camila Heuser, Riviane Donha, Gustavo, Janne, Naíssa, Lucas, Ludmila, Marília, Andressa, por me ensinarem e auxiliarem no trabalho.

DETECÇÃO DO GENE *phzF* NA BIOSÍNTESE DA FENAZINA EM SOLO RIZOSFÉRICO DE TERRA PRETA DA AMAZÔNIA

RESUMO

Os compostos fenazinas encontrados no ambiente podem ser produzidos por diversas espécies de bactérias associadas às plantas, exercendo a atividade de biocontrole contra fitopatógenos do solo. A fenazina é sintetizada por sete genes em seu operon. O gene *phzF* é responsável pela produção de várias fenazinas naturais. No entanto, não há estudos do gene *phzF* em solos rizosféricos de Terra Preta da Amazônia - TPA. Este trabalho foi desenvolvido de acordo como os objetivos propostos e dividido em dois estudos. O primeiro estudo foi acessado a diversidade do gene *phzF* na biossíntese da fenazina nos solos rizosféricos (com influência das raízes) e não rizosféricos (solo bulk) da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. Para acessar esse gene, um experimento de mesocosmo foi estabelecido com amostras de TPA coletadas em dois ambientes (floresta e agrícola) e utilizado como substrato para o crescimento da soja. Após coleta dos solos rizosféricos, o DNA foi extraído e submetido ao sequenciamento em larga escala e à quantificação do número de cópias dos genes por meio do PCR quantitativo. As sequências geradas do metagenoma foram analisadas pelo banco de dados de anotação de proteínas (M5NR), com base nas sequências do domínio *Bactéria*. Os resultados indicaram onze grupos taxonômicos afiliados à sequências do gene *phzF* nas amostras de solos. Na reação de PCR quantitativo, os resultados revelaram que o número de cópias dos genes 16S rRNA bacteriano e da biossíntese *phzF* foram distintos para os solos rizosféricos e não rizosféricos, assim como, para os ambientes dos quais foram coletados. O segundo estudo realizado foi para detectar e estimar a frequência do número de cópias dos genes *phzF* e 16S rRNA bacteriano pela técnica de PCR quantitativo e também a caracterização do perfil da comunidade bacteriana em amostras de solos da cultura do feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Wald]. A análise de PCR quantitativo demonstrou resultados distintos em ambos os solos estudados. Os perfis das comunidades bacterianas das amostras de solos foram acessados, pela técnica de Polimorfismo do Tamanho de Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP). Foi possível observar a partir dos perfis gerados pela análise, subgrupos mais homogêneos, diferenciando significativamente de estruturas das comunidades bacterianas entre a rizosfera do feijão caupi e os solos não rizosféricos (bulk).

Palavras-chave: técnicas moleculares, solo tropical, gene biossintético, metabolismo secundário.

DETECTION OF *phzF* GENE IN THE PHENAZINE BIOSYNTHESIS IN RHIZOSPHERE SOILS FROM AMAZON DARK EARTH

ABSTRACT

The identification of natural antibiotics is of great importance to sustainable agriculture. The phenazine compounds found in the environment may be produced by several species of bacteria that usually are associated with biocontrol activity in plants against phytopathogenic soil organisms. The phenazine is synthesized in seven genes his operon, the gene *phzF* is a key gene for the production of several natural phenazine. However, there is no study of the frequency of the phenazine genes in rhizosphere of Amazon Dark Earth (ADE). This work was developed according to the proposed goals and split in two studies. In the first study, we evaluated the diversity of sequences and the number of copies of *phzF* biosynthetic genes in rhizosphere soils (with influence of the roots) and non-rhizosphere (bulk soil) of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. For comparison, the number of copies of the 16S rRNA gene was also quantified. For this purpose, an experiment in controlled mesocosm was conducted, with ADE under two environmental conditions: secondary forest and pasture. DNA was extracted from the rhizosphere soil samples, and then subjected to high-throughput sequencing and quantification of the number of gene copies by quantitative PCR. The metagenomic sequences generated were analyzed on the MG-RAST server based on the protein database M5NR, considering sequences belonging to Bacteria Domain. The results indicated eleven taxonomic groups affiliated to *phzF* gene in soil samples. The qPCR indicated that the number of 16S rRNA and *phzF* genes was different for rhizosphere and non-rhizosphere soils, as well as for the environments of which were collected. The second study was accomplished to detect and estimate the number of bacterial 16S rRNA and *phzF* genes by quantitative PCR technique and also to characterize the bacterial community profile in soils under cultivation of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Wald]. The quantitative PCR analysis set forth that number of genes was different in both soils. The profile of the bacterial communities of soil samples retrieved by the technique of Polymorphism size of Terminal Restriction Fragment (T-RFLP). It were observed, from the profiles generated by the more homogeneous subgroups analysis, significamemte differentiating structures of bacterial communities between the cowpea rhizosphere and non-rhizosphere soils (bulk).

Key words: molecular techniques, tropical soil, biosynthesis gene, secondary metabolism

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.2 Diversidade bacteriana em solos de terra preta da Amazônia (TPA).....	2
1.3 Micro-organismos habitantes da rizosfera.....	3
1.4 Metabólitos secundários.....	5
1.4.1 Antibióticos.....	5
1.4.2 O composto fenazina.....	5
1.5 Técnicas moleculares em ecologia microbiana.....	7
1.5.1 Método Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP).....	8
1.5.2 A técnica de PCR quantitativo.....	8
1.5.3 Sequenciamento metagenômico por “shotgun”.....	9
1.6 Hipótese científica.....	10
1.7 Objetivos.....	11
1.7.1 Objetivo geral.....	11
1.7.2 Objetivos específicos.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
Capítulo 2: Diversidade do gene <i>phzF</i> na biossíntese de fenazina em solos rizosféricos de <i>Glycine max</i> (L.) Merrill. cultivada em terra preta da Amazônia	
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
2.1 INTRODUÇÃO.....	20
2.2. MATERIAL E MÉTODO.....	22
2.2.1 Área de estudo.....	22
2.2.2 Coleta do solo.....	22
2.2.3 Experimento de mesocosmo em casa de vegetação.....	23
2.2.4 Análises químicas do solo.....	24
2.2.5 Análises moleculares.....	24
2.2.6 Extração de DNA genômico das amostras de solos.....	24
2.2.7 Sequenciamento metagenômico “shotgun”.....	25
2.2.8 PCR quantitativo (qPCR).....	25
2.2.9 Análises estatísticas.....	27
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
2.3.1 Análise química do solo.....	27
2.3.2 Extração de DNA genômico dos solos.....	28
2.3.3 Análises das sequências.....	28
2.3.4 Composição dos grupos taxonômicos.....	289

2.3.5 Abundâncias relativas das sequências para os grupos taxonômicos	32
2.3.6 As reações do PCR quantitativo.....	34
2.3.7 Construção da curva padrão.....	34
2.3.8 PCR quantitativo do gene 16S rRNA das amostras de solos	36
2.3.9 PCR quantitativo do gene <i>phzF</i> da biossíntese	37
2.4 Conclusões.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

Capítulo 3: Detecção do gene *phzF* da biossíntese e estrutura da comunidade bacteriana em solos rizosféricos de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Wald] cultivado em terra preta da Amazônia

RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
443. INTRODUÇÃO.....	45
3.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.2.1 Amostragem do solo.....	46
3.2.2 Experimento de mesocosmo em casa de vegetação	47
3.2.3 Extração de DNA genômico das amostras de solos	48
3.2.4 Amplificação dos genes 16S rRNA e <i>phzF</i> PCR quantitativo	48
3.2.5 Construção da curva padrão.....	49
3.2.6 Amplificação do gene 16S rRNA de bactéria e análise por T-RFLP.....	50
3.2.7 Análises estatísticas.....	51
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.3.1 Análise química do solo	52
3.3.2 Extração de DNA genômico das amostras de solos	53
3.3.3 PCR quantitativo (qPCR)	54
3.3.4 Análise do gene 16S rRNA bacteriano nas amostras de solos	54
3.3.5 Análise do gene <i>phzF</i> da biossíntese	56
3.3.6 Análise de polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição (T-RFLP).....	57
3.3.7 Escala multidimensional (MDS)	57
3.3.8 Análise de Cluster entre as amostras de solos.....	59
3.4 Conclusões.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1- Micro-organismos utilizados como controle positivo para construção da curva padrão do PCR quantitativo.....	26
Tabela 2- <i>Primers</i> utilizados nas reações PCR quantitativo em tempo real na amplificação parcial do gene 16S rRNA bacteriano (U968F e R1387) e do gene fenazina (Ps_up1 e Ps_low1).....	26
Tabela 3 - Análise química dos dois ambientes de terra preta da Amazônia.....	27
Tabela 4 - Abundância das classes bacterianas encontradas nos solos rizosféricos e não rizosféricos, em plantas de soja cultivadas em casa de vegetação, contendo solo coletado dos ambientes: floresta e agrícola em uma área de terra preta da Amazônia.....	33
Tabela 5 - Valores da curva de <i>Melting</i> amplificação dos genes nas amostras de solos obtidos pela análise das reações do PCR quantitativo com os <i>primers</i> para domínio <i>Bactéria</i> e para o gene da <i>phzF</i> na biossíntese da fenazina.....	35

Capítulo 3

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados nas reações PCR quantitativo em tempo real na amplificação parcial do gene 16S rRNA bacteriano (U968F e R1387) e do gene fenazina (Ps_up1 e Ps_low1).....	49
Tabela 2 - <i>Primers</i> da região 16S rRNA utilizados nas reações de T-RFLP.....	50
Tabela 3 - Atributos químicos dos solos rizosféricos e não rizosféricos do feijão caupi	52
Tabela 4. Valores da curva de <i>Melting</i> na amplificação dos genes 16S rRNA bacteriano e <i>phzF</i> nas amostras de solos obtidos pela análise das reações de PCR quantitativo.....	54

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.1- (a) Síntese da fenazina em *Pseudomonas* spp. para fenazinas microbianas.
(b) Biossíntese dos derivados Ácido fenazina -1-carboxílico (PCA)..... 6
- Figura 1.2 - Montagem do genoma de menor tamanho utilizando a estratégia de sequenciamento de genoma por *shotgun*..... 9

Capítulo 2

- Figura 2.1 - Fluxogramas das etapas de estudo..... 21
- Figura 2.2 - Localização do município de Iranduba – AM. Fonte: SIGALAB-INPA... 22
- Figura 2.3 - Croqui da disposição das coletas subamostras em cada Ambiente..... 23
- Figura 2.4 - Gel resultante da extração do DNA genômico de amostras de solos da soja PM: padrão de peso molecular 100pb DNA *Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies)..... 28
- Figura 2.5 - Frequências dos grupos taxonômicos de domínio *Bactéria* associadas ao gene na biossíntese da fenazina *phzF*, classificados pelo banco de dados de anotação de proteínas M5NR em amostras e solos rizosféricos e não rizosféricos da soja plantada em solo de terra preta da Amazônia, coletado do ambiente floresta..... 30
- Figura 2.6 - Frequências relativas dos grupos taxonômicos de domínio *Bactérias* associadas ao gene na biossíntese da fenazinas *phzF*, classificados pelo banco de dados de anotação de proteínas M5NR em amostras e solos rizosféricos e não rizosféricos da soja plantada em solo de terra preta da Amazônia, coletado do ambiente agrícola..... 31
- Figura 2.7 - Eletroforese em gel de agarose (1%) com produtos da amplificação do gene dos controles positivos *P. putida* e *P. chlororaphis* utilizando os *primers* (U968F e R1387) e (Ps_up1 e Ps_low1) para os genes 16s rRNA bacteriano (A) e *phzF* (B) estudados, PM: padrão de peso molecular 100 pb DNA *Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies) (B) e *phzF* PM: marcador *Low DNA Mass Ladder* no controle positivo para construção da curva padrão..... 35

Figura 2.8 - Número médio de cópias do gene 16s rRNA bacteriano determinado por PCR quantitativo. As amostras referem-se a solos rizosféricos de soja cultivada em solo de terra preta da Amazônia coletados em dois ambientes (floresta e agrícola). Barras representam erro padrão.....	36
Figura 2.9 - Número médio de cópias do gene <i>phzF</i> determinado por PCR quantitativo. As amostras referem-se a solos rizosféricos de soja cultivada em solo de terra preta da Amazônia coletados em dois ambientes (floresta e agrícola). Barras representam erro padrão.....	38
 Capítulo 3	
Figura 3.1 – Fluxograma das etapas de estudo.....	46
Figura 3.2 – Croqui da coleta das amostras dos solos.....	47
Figura 3.3 - (A) Experimento em casa de vegetação com feijão caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L.) (B) s.....	48
Figura 3.4 - Gel resultante da extração do DNA genômico das amostras de solos rizosféricos e não rizosféricos do feijão caupi PM: padrão de peso molecular 100pb DNA Mass Ladder™ (Invitrogen Life Technologies).....	54
Figura 3.5 - Número médio de cópias do gene 16s rRNA bacteriano determinado por PCR quantitativo. As amostras referem-se a solos rizosféricos de feijão caupi, cultivada em solo de terra preta da Amazônia, coletado em dois ambientes (floresta e agrícola). Barras representam erro padrão.....	55
Figura 3.6 - Número médio de cópias do gene <i>phzF</i> determinado por PCR quantitativo. As amostras referem-se a solos rizosféricos de feijão caupi, cultivadas em solo de terra preta da Amazônia coletado em dois ambientes (floresta e agrícola). Barras representam erro padrão.....	57
Figura 3.7 - Análise sobre a escala multidimensional de feijão caupi e solo bulk (MDS), com base em T-RFs separados pelo rRNA 16S de bactérias entre solos rizosféricos.	59
Figura 3.8 - Agrupamento por similaridade entre as amostras de solos rizosféricos (SR-TPA) e não rizosféricos (SNR-TPA) de terra preta da Amazônia coletadas nos ambientes de floresta e agrícola, obtidas através da segmentação da enzima <i>MspI</i> , a partir da análise de CLUSTER no programa Primer6 (<i>Plymouth Marine Laboratory, Primer, Reino Unido</i>).....	61

1. INTRODUÇÃO

Em comunidades bacterianas que habitam os solos de terra preta da Amazônia (TPA) podem ocorrer genes bacterianos ainda desconhecidos e com importantes contribuições quanto à aplicação biotecnológica. Estudos utilizando técnicas dependentes e independentes de cultivo vêm sendo realizados para identificar e conhecer a diversidade de micro-organismos de solos de TPA (Wong 2011). A caracterização das comunidades bacterianas de TPA cria a possibilidade de utilização das mesmas na maximização das produtividades de culturas comerciais. Além disso, poucos estudos relatam a diversidade de grupos bacterianos funcionais, especialmente na rizosfera de plantas cultivadas em solo de TPA.

A rizosfera é a porção do solo que fica sob influência das raízes e apresenta elevada atividade metabólica decorrente da grande quantidade e diversidade de compostos orgânicos que são liberados pelas raízes das plantas (Hinsinger *et al.* 2005). As bactérias do solo possuem a habilidade de colonizar a região da rizosfera de culturas consideradas importantes na agricultura, ofertando benefícios para as plantas de forma direta e indireta, como: fixação e assimilação de nitrogênio, solubilização de nutrientes e produção de fito-hormônios. Além disso, estas bactérias exercem o papel de antagonistas a fungos patogênicos, enzimas, pigmentos fluorescentes, cianetos e produzem sideróforos e antibióticos (Renwick *et al.* 1991; Rodríguez e Fraga 1999; Donate-Correa *et al.* 2004).

Os antibióticos são substâncias orgânicas de baixo peso molecular e podem ser sintetizados por diversos micro-organismos, incluindo as bactérias. Mavrodi *et al.* (2010) sugerem que os antibióticos naturais podem transitoriamente se acumular na rizosfera de plantas, em quantidades suficientes para inibir o crescimento de organismos sensíveis. Os antibióticos pyoluteorin (plt), pyrrolnitrin (prn), phenazine-1- e 2,4-diacetylphloroglucinol (*phl*) e Ácido Fenazino-1-Carboxílico (PCA) têm sido o foco principal em pesquisas de biocontrole (Thomashow *et al.* 1990; Mavrodi *et al.* 2010).

A fenazina (*phz*) é um antibiótico produzido por eubactérias colonizadoras de rizosfera. Sua produção está relacionada à competitividade e sobrevivência dos micro-organismos em habitat natural. O composto Fenazina-1-ácido carboxílico (PCA) produzido pela espécie *Pseudomonas fluorescens* (2-79), foi encontrado por Mavrodi *et al.* (2010), em concentrações apreciáveis de 27 a 43 nanogramas (ng) por grama (g) de solos rizosféricos, sugerindo que este antibiótico tem grande atividade no nível da raiz. A fenazina é sintetizada

por um operon composto de sete genes (*phzABCDEFG*) biossintético em *Pseudomonas* spp. O gene *phzF* é mais estudado por ser responsável pela síntese do precursor fenazina e além disso, é altamente conservado em seus produtores (Fitzpatrick 2009).

Desse modo, no presente trabalho foram utilizados os métodos de sequenciamento em larga escala, PCR quantitativo (qPCR) e Análise de Polimorfismo dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFLP), para estimar a diversidade funcional, quantificar o número de cópias do gene *phzF* e também caracterizar perfil das comunidades bacterianas diretamente do ambiente rizosférico de plantas de soja e feijão caupi.

1.2 Diversidade bacteriana em solos de terra preta da Amazônia (TPA)

A terra preta da Amazônia (TPA) é um solo antropogênico encontrado em diversos sítios dentro do bioma da Amazônia. As TPAs estão localizadas geralmente nas margens de rios, tanto os de águas brancas como Purus, Madeira, Juruá, Solimões e Amazonas; como os de águas claras, a exemplo do Trombeta, Tapajós e Mapuera; ou ainda nas margens de rios de águas negras como o Rio Negro, Urubu, Caxiuana e Mapuá deduzindo-se que, o homem pré-histórico, que habitavam diversas regiões da Amazônia, era bem adaptado a diversas condições ambientais (Kern *et al.* 2003; Germano 2011). Atualmente devido sua alta fertilidade as áreas com terra preta vêm sendo utilizadas pelos agricultores familiares para cultivo de culturas de subsistência (Germano 2011). Além disso, este tipo de solo tem despertado a curiosidade de pesquisadores e tem sido estudado devido às suas características químicas e à alta diversidade microbológica, incluindo bactérias e fungos.

As bactérias podem ser encontradas em diversos ambientes como lagos, oceanos, solos, em condições extremas de temperaturas e ambientes contaminados com metais pesados (Horner-Divine *et al.* 2004; Drees *et al.* 2006; Yergeau *et al.* 2007, Wang *et al.* 2007). Estudos indicam que existe uma relação direta entre a fertilidade e a diversidade microbológica dos solos de TPA. A elevada taxa de material orgânico encontrada nesse solo favorece uma intensa atividade biológica, sugerindo uma alta diversidade de micro-organismos e, portanto, uma fonte importante de germoplasma microbiano (Tsai *et al.* 2003; Madari *et al.* 2009).

Trabalhos realizados por métodos independentes de cultivo objetivando estudar a diversidade das comunidades bacterianas em TPA identificaram diversos gêneros:

Pseudomonas, *Artróbactéria*, *Bacilos*, *Staphylococcus*; *Janthinobacterium* e *Massilia* (Ferreira 2007), *Protobactéria*; *Firmicutes*; *Acidobactéria*; *Nitrospira*; *Verrucomicrobia*; *Planctomycetes*; (Cannavan 2007), *Omycetales* (Garcia 2006), *Burkholderia* (Medau 2007). Além de uma alta diversidade bacteriana, os autores encontraram alta ocorrência de clones homólogos de bactérias não cultiváveis, quando comparados a solos adjacentes chegando a conter genes de interesse e de aplicabilidade biotecnológica.

A identificação das comunidades bacterianas em TPA pode contribuir para o entendimento do seu papel ecológico, bem como propiciar estudos para suas aplicações nas áreas de interesse ao homem, como fixação biológica de nitrogênio, biorremediação, produção de plásticos biodegradáveis, crescimento de plantas e controle de doenças (Germano 2011). A compreensão da funcionalidade dos grupos presentes nesse solo é de grande relevância, principalmente em ambientes específicos como a região da rizosfera de plantas, onde ocorre a maior parte das interações planta/micro-organismos.

1.3 Micro-organismos habitantes da rizosfera

A rizosfera refere-se à região do solo influenciada pelas raízes e compreende uma distância de 1 a 3 mm da sua superfície. A dispersão das raízes das plantas no solo é mediada principalmente pela interação química com as partículas do solo (Hinsinger *et al.* 2005; Watt *et al.* 2006). A região da rizosfera apresenta elevada estabilidade em suas propriedades físico-químicas que, associadas ao fornecimento constante de substratos orgânicos liberados pelas raízes, favorece uma intensa atividade metabólica dos micro-organismos e também influencia direta e positivamente nas plantas (Moreira e Siqueira 2006).

Nesse sentido, as plantas influenciam a diversidade de micro-organismos em sua rizosfera por meio da liberação de exsudatos pelas raízes, os quais incluem: íons, oxigênio livre, água, mucilagem, aminoácidos, açúcares, vitaminas, ácidos orgânicos, nucleotídeos, enzimas, entre outros (Grupta e Mukerji, 2002; Bais *et al.* 2006). Estas substâncias podem tanto atrair quanto repelir organismos que, por sua vez, podem induzir diferentes repostas da planta (Bais *et al.* 2006). Sendo assim, os exsudatos podem variar de acordo com as espécies de plantas e até mesmo em cultivares de uma espécie (Kowalchuk *et al.* 2002; Ghini 2008). De acordo com Berg e Smalls (2009), diferentes espécies de plantas são capazes de

selecionar, a partir do conjunto total de micro-organismos, comunidades distintas na rizosfera. Este processo é feito de tal maneira que quando as plantas são infectadas por alguns patógenos, elas são capazes de selecionar os organismos de sua rizosfera. Essa seleção ocorre alterando a composição dos exsudatos de suas raízes com o objetivo de atrair micro-organismos que possam protegê-las contra a agressão de determinado fitopatógeno (Rudrapa *et al.* 2008). Assim, estes micro-organismos atuam como agentes protetores contra patógenos (Melo 1991; Raaijmakers *et al.* 1997). Além disto, interações entre plantas e organismos possibilitam a sobrevivência com sucesso no sistema radicular (Cardoso e Nogueira, 2007; Dini-Andreote e van Elsas 2013).

Grupos específicos de micro-organismos são capazes de migrar para a superfície da raiz onde os níveis de nutrientes são maiores. Espécies do gênero *Pseudomonas* conhecidas pela capacidade de associar-se com as raízes por meio de sinais químicos são favorecidas na formação de sítios de colonização (Zago 2000; Hardoim *et al.* 2008; 2011; Neal *et al.* 2012; Dini-Andreote e Van Elsas 2013).

Portanto, na região da rizosfera os micro-organismos predominantes são as bactérias de vida livre e associativa. Estas podem realizar funções benéficas, neutras ou deletérias para os hospedeiros. Além disso, em ambiente competitivo, as bactérias passam a produzir metabólitos secundários, enzimas extracelulares e antibióticos a fim de competir por espaço e nutrientes, com os outros micro-organismos presentes na rizosfera (Schippers *et al.* 1987).

Dentre as espécies mais estudadas de bactérias habitantes da rizosfera podemos citar: *P. fluorescens*, *P. putida*, *Azospirillum brasilense*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, e os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, entre outras. Estas informações possibilitam direcionar estudos com possíveis grupos de bactérias produtoras de compostos secundários (Melo 1991; Raaijmakers *et al.* 1997).

1.4 Metabólitos secundários

Metabólitos secundários são produtos que não são essenciais para a sobrevivência da célula produtora. São gerados a partir de um metabolismo, mas sua produção provavelmente confere vantagens competitivas nos ambientes onde o seu produtor vive (Martin e Demain 1980).

1.4.1 Antibióticos

Os antibióticos são produzidos por micro-organismos como resultados do seu metabolismo secundário. Muitas vezes as bactérias têm a capacidade de produzir antibióticos quando em interações biológicas no ambiente. Estudos demonstram que estes antibióticos são produzidos principalmente na rizosfera e atuam na supressão de patógenos de solo (Georgakopoulos *et al.* 1994; Kraus *et al.* 1995; Shanahan *et al.* 1992).

Os antibióticos pyoluteorina (*Plt*), Pyrrolnitrina (*Prn*), 2,4-diacetyl phloroglucinol (*Phl*) e Ácido fenazina -1-carboxílico (PCA) são atualmente os mais pesquisados (Bagnasco *et al.* 1998; Mavrodi *et al.* 2007). Bactérias produtoras desses antibióticos foram isoladas de amostras de solos com características supressivas de diversas regiões geográficas, passaram a ser o foco das pesquisas para controle de fitopatógenos (Rosales *et al.* 1995).

1.4.2 O composto fenazina

Os antibióticos Fenazinas se incluem em uma larga família de compostos nitrogenados heterocíclicos derivados da via do ácido shikimico. As fenazinas que ocorrem naturalmente são produzidas por bactérias de vários gêneros e também apresentam propriedades antimicrobianas quando associadas às plantas (Mavrodi *et al.* 2006; 2012). Análises demonstraram que durante o processo de crescimento bacteriano *in vitro*, elevados níveis destas substâncias são excretadas. Normalmente, são pigmentos com diferentes aspectos de absorção. A diversidade biológica da fenazina pode variar de acordo com a natureza e a posição dos substituintes no anel heterocíclico dos grupos funcionais, levando a diferenças nas propriedades químicas das fenazinas individuais (Laursen e Nielsen 2004).

A via biossintética dos compostos fenazina vem sendo bastante estudada principalmente de alguns grupos de bactérias como a do gênero *Pseudomonas*, onde são conservados sete genes em seu operon (*phzABCDEFG*), sendo estes, necessários para a conversão do Ácido Shikimico no antibiótico Ácido Fenazina-1- carboxílico (PCA) e outras fenazinas. Análises moleculares de genes envolvidos na produção da fenazina em espécies de *Pseudomonas* spp. apresentaram um elevado grau de similaridade de sequências homólogas. Os produtos de genes *phzC*, *phzD* e *phzE*, são similares às enzimas do metabolismo de ácido shikimico e,

juntamente com o *phzF* são necessários para a síntese de várias fenazinas (Mavrodi *et al.* 2004; Parsons 2004; Fitzpatrick 2009).

Experimentos *in vitro*, utilizando uma mistura dos genes *phzF*, -A, -B e G purificados confirmaram que o Ácido Fenazino-1-Carboxílico (PCA) é prontamente produzido a partir de 2,3-di-hidro-3-hidroxi-antranico (DHHA) sem auxílio de outros fatores celulares. Os genes *phzA*, -B e G não possuem nenhuma atividade para DHHA. No entanto, a presença de *phzF* individualmente ou em companhia com estes, passam a produzir o PCA. Uma vez formado, o PCA pode ser modificado por uma variedade de enzimas, resultando numa diversidade de fenazinas produzidas (Blankenfeldt *et al.* 2004; Weller *et al.* 2007) (Figura 1).

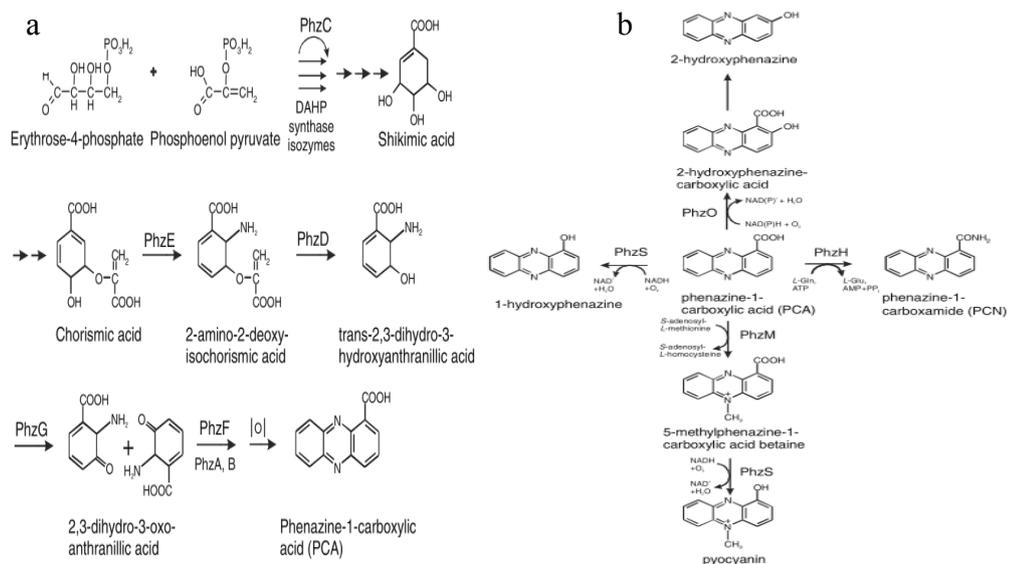


Figura 1.1 Biossíntese da fenazina: (a) Síntese da fenazina em *Pseudomonas* spp. para fenazinas microbianas. (b) Biossíntese dos derivados Ácido fenazina -1-carboxílico (PCA). Fonte: Chin-a-Woeng *et al.* 2002

De acordo com Fitzpatrick (2009) e Mavrodi *et al.* (2006), as semelhanças de sequências gênicas e filogenéticas de *Pseudomonas* spp. *Streptomyces cinnamomensis*, *Pantoea agglomerans*, *Burkholderia cepacia*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Brevibacterium linens*, e *Mycobacterium abscessus* evidenciam que contém um operon fenazina e que, provavelmente foi transferido entre essas espécies através de transferência horizontal de genes (THG). A aquisição de um operon associada a antibióticos é de grande interesse, uma vez que pode aumentar a competitividade das espécies receptoras.

A compreensão da diversidade e dinâmica dos genes envolvidos na síntese do antibiótico fenazina e a descoberta das vias biossintéticas em bactérias proporcionam oportunidades para explorar e obter uma maior compreensão sobre a evolução deste antibiótico (Ferreira 2007). Isso aumentou as possibilidades de identificação de novas fenazinas com potencial de uso no biocontrole de fitopatógenos e a sua exploração em um sistema de agricultura sustentável.

1.5 Técnicas moleculares em ecologia microbiana

Nos últimos anos as técnicas moleculares tiveram um papel fundamental na determinação da diversidade de micro-organismos do solo. Para Germano (2011) as técnicas modernas de ecologia microbiana podem oferecer ferramentas eficientes para monitorar processos biológicos em solos, onde as atividades antrópicas de manejo agrícola e depósito de material orgânico, provavelmente foram determinantes para a diversificação metabólica das comunidades bacterianas. Estas ferramentas moleculares também se apresentam como uma alternativa rápida e eficiente na determinação de algumas características como estruturas e riquezas taxonômicas das comunidades bacterianas também em solo de TPA.

De acordo com Mavrodi *et al.* (2007), os métodos independentes de cultivo, baseado na extração e análise de DNA de amostras de ambientes naturais, estão se tornando cada vez mais populares para avaliar a estrutura da população nativa de bactérias ou de comunidades introduzidas. A técnica de hibridização seguida da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) com sondas específicas tem sido utilizada extensivamente para a quantificação de micro-organismos que produzem antibióticos *in situ*. A antibiose é amplamente estudada como um dos mecanismos de inibição mais importante no controle biológico dos patógenos de plantas (Weller *et al.* 2002).

1.5.1 Método Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)

A técnica de T-RFLP é utilizada em análises comparativas de comunidades microbianas em amostras ambientais com base na amplificação por PCR do gene em estudo

utilizando *primers* marcados com fluorescência. Os fragmentos obtidos são tratados com enzimas de restrição e o comprimento dos fragmentos terminais marcados é determinado em sequenciador automático. Durante a leitura, a fluorescência dos T-RFs (fragmentos de restrição terminal) é convertida em um eletroferograma, sendo que cada pico representa um T-RF. Os resultados da leitura das T-RFs, são exportados por um *software* para calcular o tamanho do fragmento de restrição terminal e a intensidade do pico de fluorescência.

Os dados de comprimento dos fragmentos terminais são comparados entre as amostras, podendo ser usado para matrizes de similaridade e análise de componentes principais. Apesar de a técnica necessitar de padronização é altamente eficiente, produtiva e muito sensível na detecção das mudanças na estrutura de comunidades bacterianas no ambiente (Mendes 2011).

1.5.2 A técnica de PCR quantitativo

Quantificar micro-organismos é importante porque proporciona um melhor entendimento da influência de diferentes ambientes. A maior vantagem desta técnica é que ela é independente de cultivo, o que permite determinar de forma direta a densidade das comunidades em amostras de rizosfera de plantas e do solo, sobretudo, a composição genotípica (Mavrodi *et al.* 2004). Estudos recentes com quantificação de estirpes de *P. fluorescentes* foram precisos na detecção de produtoras do antibiótico 2, 4 Diacetylphzoronglucinol (2,4-DAPG) em solos supressivos utilizando o método PCR quantitativo (Mavrodi *et al.* 2007).

A PCR quantitativo ou PCR em tempo real é baseada na detecção da concentração de ácidos nucléicos no qual a fluorescência aumenta conforme o acúmulo de produtos durante cada ciclo de amplificação (Raeymaekers 2000). Durante a utilização desta técnica, uma fase logo pode ser identificada facilmente e comparada com as curvas padrões. Também é possível o uso de diferentes reagentes, tais como: SYBR *green*, TaqMan e FREAT. Além disso, a PCR em tempo real tem capacidade de suportar grande quantidade de amostras reduzindo o tempo de análise (Hermansson e Lindgren 2001; Madani *et al.* 2005). Pela técnica de PCR quantitativo é possível utilizar dois métodos de quantificação, a reativa e a absoluta. Nesta última, o número de cópias do gene de interesse é determinado, relacionando o sinal da PCR

como uma curva-padrão que pode ser construída utilizando diluições seriadas de uma amostra de concentrações conhecidas (Wong e Medrano 2005).

1.5.3 Sequenciamento metagenômico por “*shotgun*”

Metagenoma pode ser definido como o genoma encontrado em um determinado habitat. Para obtenção da sequência dos genomas, os fragmentos de DNA são gerados após fragmentação química, física ou enzimática. Estes novos métodos permitem a obtenção de *reads* de maneira muito mais rápida (Staats *et al.* 2014) (Figura 1.2). Entretanto, o tamanho dos *reads* é menor, variando de algumas dezenas a poucas centenas de pares de base, dependendo da metodologia. Esta estratégia, denominada sequenciamento *shotgun*, é baseada na fragmentação aleatória dos cromossomos em fragmentos de DNA com tamanho relativamente pequeno (Staats *et al.* 2014).

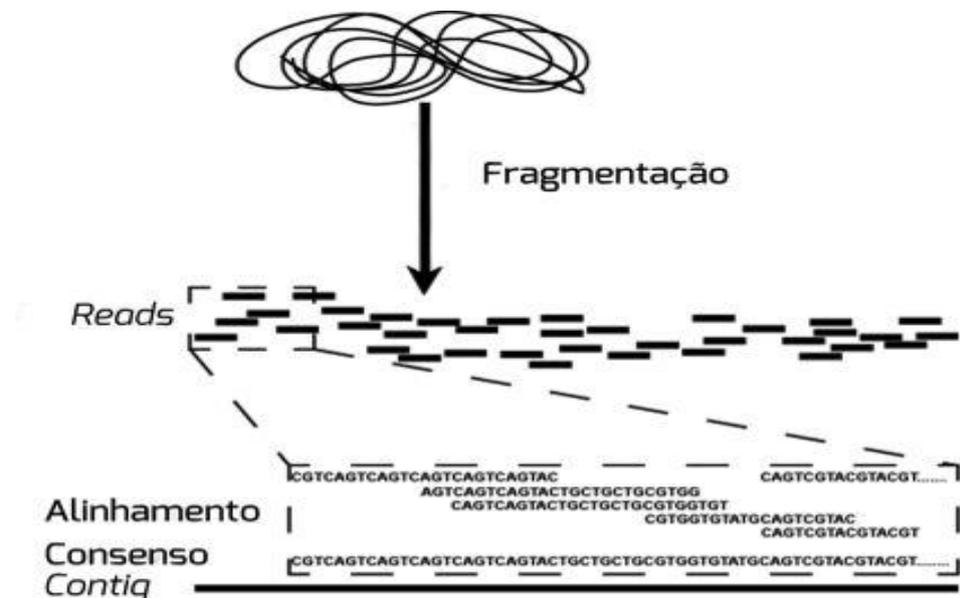


Figura 1.2 Montagem do genoma de menor tamanho utilizando a estratégia de sequenciamento de genoma por *shotgun* Fonte: Staats *et al.* 2014.

O sequenciamento vem sendo utilizado nas pesquisas com comunidades funcionais do ecossistema do solo. Estudos realizados por Rondon *et al.* (2000) evidenciaram que o DNA extraído diretamente do solo é uma valiosa fonte de novas informações genéticas e podem ser acessadas utilizando bibliotecas metagenômicas, sendo um progresso significativo para a compreensão dos grupos funcionais de micro-organismos por meio da abordagem das sequências genéticas.

Por meio da técnica de sequenciamento é possível ter acesso à sequência de nucleotídeos de operons e genes que codificam vias metabólicas completas (Daniel 2004). Os genes de interesse passaram a ser clonados superexpressos, e a enzima pura utilizada no lugar do micro-organismo original (Faoro 2010). Segundo Loman *et al.* (2013), sequências curtas de DNA que contêm genes no todo ou em parte, podem ser usados para identificar e caracterizar os organismos e suas funções nos sistemas. Portanto, a análise feita por metagenoma do ambiente solo favorece o estudo da diversidade de genes responsáveis pela biossíntese de antibióticos.

1.6 Hipótese científica

a. Se através das técnicas de sequenciamento genômico e PCR quantitativo é possível determinar a quantidade dos grupos taxonômicos de bactérias com sequências homologas ao do gene *phzF* na biossíntese da fenazina nas amostras de solos rizosféricos.

b. Se alguns grupos de bactérias sendo estimuladas pelas raízes das plantas (soja e feijão) em solos TPA, apresentam maior quantidade do gene na biossíntese (*phzF*) do composto fenazina.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo detectar quantitativamente o gene *phzF* na biossíntese do composto fenazina em amostras de solos rizosférico e não rizosférico de plantas de soja e feijão caupi cultivadas em solos de terra preta da Amazônia.

1.7.2 Objetivos específicos

1) Determinar a quantidade de sequências relacionadas ao gene *phzF* dos compostos fenazinas em amostras de solos rizosféricos e não rizosféricos na cultura da soja em solos de terra preta da Amazônia por meio do sequenciamento metagenômico e PCR quantitativo (Capítulo 2).

2) Detectar o número de cópias dos genes 16S rRNA bacteriano e *phzF* e avaliar a estrutura das comunidades bacterianas em solos rizosféricos e não rizosféricos na cultura do feijão caupi em terra preta da Amazônia (Capítulo 3).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bais, H. P. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interaction with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, Palo Alto, 57: 233-266.
- Bagnasco, P.; De La Fuente L.; Gualtieri, G.; Noya, F.; Arias, A. 1998. Fluorescent *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 1317-1322.
- Blankenfeldt, W.; Kuzin.; A.P.; Skarina. T.; Korniyenko.; T. Tong.; Bayer , L.; Janning P.; Thomashow, L.S and DV Mavrodi. 2004. Structure and function of the phenazine biosynthetic protein *phzF* from *Pseudomonas fluorescens*. *Proceedings National Academy of Sciences*, 101:16431-16436.

- Berg, G; Smalla K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 68:1–13.
- Cannavan, F. S. 2007. *Diversidade das comunidades bacterianas em solos de terra preta antropogênica da Amazônia central e oriental*. Dissertação de mestrado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, São Paulo. 115 pp.
- Cardoso, E.J.B.N.; Nogueira, M.A. A 2007. Rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. In: Silveira, A.P.D.; Freitas, S.S. *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Campinas, Instituto Agrônômico de Capinas. p. 79-9.
- Chin-a-Woeng, T. F. C.; Thomas-Oates, J. E.; Lugtenberg, B. J. J.; Bloemberg, G. V. 2002. Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14: 1006–1015.
- Daniel, R. 2004. The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. *Current Opinion Biotechnology*, 15: 199-204.
- Dini-Andreote, F; van Elsas, J.D. 2013. Back to the basics: The need for ecophysiological insights to enhance our understanding of microbial behavior in the rhizosphere. *Plant soil*, 373:1-15
- Donate-Correa, J.; Leon-Barrios, M.; Perez-Galdona R. 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Island. *Plant and Soil*, 266: 261-272.
- Drees, K.P.; Neilson, J.W.; Betancourt, J.L.; Quade, J.; Henderson, D.A.; Pryor, B.M.; Maier, R.M. 2006. Bacterial Community Structure in the Hyperarid Core of the Atacama Desert, Chile. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7902-7908.
- Faoro H. 2010. *Prospecção metagenômica de biocatalizadores da microbiota de solos da floresta atlântica paranaense*. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná. Universidade de São Paulo. 234pp.
- Ferreira, L.C.,. *Aspectos bioquímicos e moleculares de bactérias isoladas de Terra Preta Antropogênica (TPA) na região da Amazônia brasileira* Dissertação de Mestrado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2007.
- Fitzpatrick, D. A. 2009. Lines of evidence for horizontal gene transfer of a phenazine producing operon into multiple bacterial species. *Journal Molecular Evolution*, 68: 171–185.

- Garcia, C. E. 2006. *Isolamento e identificação de actinobactérias em solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) da Amazônia Central por ARDRA e sequenciamento do gene 16S rRNA*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas. 127pp.
- Georgakopoulos, D.; Hendson, M.; Panopoulos, N. J.; Schroth, M. N. 1994. Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression in vitro with the ice nucleation reporter gene. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 60: 2931–2938.
- Germano, M.G.G. 2011. *Diversidade funcional em solos de Terra Preta de Índio da Amazônia e carvão pirogênico*. Tese de doutorado do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, São Paulo. 187pp.
- Ghini, R. 2008. *Impacto de mudanças climáticas globais sobre a microbiota terrestre*, 1-15. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (Eds.) *Microbiologia Ambiental*. EMBRAPA, São Paulo, 476p.
- Grupta, R.; Mukerji, K. G.; 2002. *Root exudate biology*. (Ed.). Mukerji, K. G. *Techniques in mycorrhizal studies*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 103-131.
- Hardoim, P.R.; Van Overbeek L.S.; van Elsas J.D. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiology*, 16: 463–471.
- Hardoim, P.R.; Andreote F.D.; Reinhold-Hurek B.; Sessitsch A.; van Overbeek L.S.; van Elsas J.D. 2011. Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS Microbiology Ecology*, 77: 154–164.
- Hermansson, A.; Lindgren, P.E. 2001. Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable soil by Real-Time-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 67: (9): 72-976.
- Horner-Devine, M.C.; Carney, K.M.; Bohannon, B.J.M. 2004. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 271: 113-122.
- Hinsinger, P.; Gobran. G.R.; Gregory. P.J.; Wenzel, W.W. 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytologist*, 168: 293–303.
- Kraus, J.; Loper. J. E. 1995. Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 849–854.

- Kern, D. C.; D'aquino, G.; Rodrigues, T. E.; Franzão, F. J. L.; Sombroek, W.; Meyers, T. M.; Neves, E. G. 2003. Distribution of Amazonian Dark Earth in the Brazilian Amazon. In: Lehmann, J.; Kern, D. C.; Glaser, B.; Woods, W. I. (Eds.). *Amazonian dark earths: Origin, properties, management*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p 1-57.
- Kowalchuk, G.A.; Buma, D.S.; Boer, W.; Klinkhamer, P.G.L.; van Veen J.A. 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 509–520.
- Laursen, J.B.; Nielsen, J. 2004. Ladies Natural products: Biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *American Chemical Society*, 104: 1663-1685.
- Loman, N.J.; Constantinidou, C.; Christner, M.; Rohde, H; Chan, J.Z; Quick, J; Weir J.C.; Quince, C.; Smith, G. P.; Betley, J.R.; Aepfelbacher, M.; Pallen, M.J. 2013. A Culture-Independent Sequence-Based Metagenomics Approach to the Investigation of an Outbreak of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* O104:H4. *JAMA, American Medical Association, United Kingdom*, 309:1502-1510.
- Madari, B.E.; Cunha, T.J.F.; Novotny, E.H.; Milori, D.M.B.P.; Neto, L.M.; Benites, V.M.; Coelho, M.R.; Santos, G.A. 2009. Matéria orgânica dos solos antrópicos da Amazônia (Terra Preta de Índio): suas características e papel na sustentabilidade da fertilidade do solo. In: Teixeira, W.G.; Kern, D.C.; Madari, B.E.; Lima, H.N.; Woods, W. (Ed.). *As terras pretas de índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas*. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. 420p.
- Madani, M.; Subbtin, S.A.; Moens, M. 2005. Quantitative detection of the potato cyst Nematode, *Globodera pallida*, and the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, using Real-Time PCR with SYBRgreen I dye. *Molecular and Cellular Probes*, London, 19: 8186.
- Martin, J.F.; Demain, A.L. 1980. Control of Antibiotic Biosynthesis. *Microbiological Reviews*, 44: 230-251.
- Mavrodi, D.V.; Bleimling, N.; Thomashow, L.S.; Blankenfeldt, W. 2004. The purification crystallisation and preliminary structural characterisation of PhzF, a key enzyme in the phenazine biosynthesis pathway from *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Acta Crystallographica*, 60: 184–186.
- Mavrodi, D.V.; Blankenfeldt, W.; Thomashow, L.S. 2006. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 417–445.

- Mavrodi, O.V.; Mavrodi, D. V.; Thomashow, L.S.; Weller, D.M. 2007. Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains in the rhizosphere by Real Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 5531-5538.
- Mavrodi, D.V.; Peever, T.L.; Mavrodi, O.V.; Parejko, J.A.; Raaijmakers, J.M.; Lemanceau, P.S.; Mazurier, Heide L.; Blankenfeldt. W.; Weller, D.M.; Thomashow, L.S. 2010. Diversity and Evolution of phenazine biosynthesis *Applied Environmental Microbiology Path.* 76. (3): 886-879.
- Mavrodi, O.V.; Mavrodi, D. V.; Parejko, J. A.; Thomashow, L. S.; Weller, D. M. 2012. Irrigation differentially impacts populations of indigenous antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 3214–3220.
- Medau, R. 2007. *Diversidade de bactérias Burkholderia em solos de terra preta arqueológica da Amazônia por análise em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE) e sequenciamento*. Dissertação de mestrado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, São Paulo. 71pp.
- Mendes, L.W. 2011. *Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbiana em solos de manguezal preservado na Ilha do Cardoso-SP*. Dissertação de mestrado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, São Paulo. 141p.
- Melo, I.S. 1991. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (Ed.) *Controle Biológico de Doenças de Plantas*. Campinas: EMBRAPA/CNPDA p.135-156.
- Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. 2006. *Microbiologia e bioquímica do solo*, Lavras, UFLA. 17p.
- Neal, AL; Ahmad, S; Gordon-Weeks, R; Ton, J. 2012. Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the rhizosphere. *PLoS One* 7: 1-10.
- Parsons, J.F.; Song, F.; Parsons, L.; Calabrese, K.; Eisenstein, E.; Ladner, J.E.; 2004. Structure and function of the phenazine biosynthesis protein *phzF* from *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Biochemistry*, 43; 12427–12435.
- Raaijmakers, J.M.; Weller, D. M.; Thomashow, L. S. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 881–887.

- Renwick, A.; Campbell, R.; Coe, S. 1991. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology*, 40: 524-532.
- Rosales, A. M.; Thomashow, L.; Cook, R.J.; Mew, T.W. 1995. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice-associated antagonistic *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 85: 1082-1032.
- Rodriguez, H.; Fraga. R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17: 319-339.
- Rondon, M.; August, P.; Bettermann, A. D.; Brady, S. F.; Grossman, T. H.; Liles, M. R.; Loiacono, K. A.; Lynch, B. A.; Macneili. A.; Minor, C.; Tiong, C. L.; Gilman, M.; Osburne, M. S.; Clardy, J.; Handelsman, J.; Goodman, R. M. 2000. Cloning the Soil etagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. *Applied Environmental. Microbiology*, 66: 2541-2547.
- Rudrappa, T.; Czymmek, K.J.; Paré PW.; Bais HP. 2008. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiology*, 14: 1547–1556.
- Shanahan, P. Daniel, J.; O’sullivan, Simpson, P.; Glennon, J. D.; O’gara, F. 1992. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a *Pseudomonad fluorescent* and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied Environmental Microbiology*, 58: 353–358.
- Shippers, B.; Bakker, A.W.; Bakker, A.H.M. 1987. Interactions of deletions and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, 25: 339-358.
- Staats, C.C.; Morais, G.L.; Margis, R. 2014. Projetos Genoma. (Ed) Verli, H. *Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular*. Porto Alegre 62p.
- Tsai, S.M.; Cannavan, F.S.; Silva J.J.P.; Chaves, M.G.; Passianoto, C.C.; Borges, C.P. 2003. Diversidade bacteriana em terra preta de índio baseada em sequenciamento do gene 16S rRNA, In: *Congresso Brasileiro de Ciência do Solo*, 29: Ribeirão Preto Resumos. Ribeirão Preto: SBCS, 1 CD-ROOM.
- Thomashow, L.S. Weller D.M.; Bonsall R.F.; Pierson III L.S. 1990. Production of the antibiotic Phenazine-1-carboxylic acid by *florescent Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Applied Environmental Microbiology*, 56: 908-912.

- Wang, Y, Shi, J.; Wang, H.; Lin, Q.; Chen, X.; Chen, Y. 2007. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 75-81.
- Watt, M.; Silk, WK.; Passioura, J.B. 2006. Rates of root and organism growth, soil conditions, and temporal and spatial development of the rhizosphere. *Annals of Botany*, 97: 839–855.
- Weller, D. M.; Raaijmakers, J. M.; Mespadden-Gardener B. B.; Thomashow, L. S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 309–348.
- Weller, D.M.; Landa, B.B.; Mavrodi, O.V. 2007. Role of 2-4 diacetylphloroglucinol-production florescente *Pseudomonas* spp. in plant defense, *Plant biology*, 9: 4-20.
- Wong, L. C. 2011. *Identificação e quantificação do gene pirrolnitrina (prnD) em Terra Preta Antropogênica da Amazônia por PCR em tempo real*. Dissertação de Mestrado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, da Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 115pp.
- Wong, M.L.V.; Medrona, J.F. Real Time PCR for mRNA quantification. *BiTechniques*, 39 75-85.
- Yergeau, E.; Bokhorst, S.; Huiskes, A.H.L.; Boschker, H.T.S.; Aerts, R.; Kowalchuk, G.A. 2007. Size and structure of bacterial, fungal and nematode communities along an Antarctic environmental gradient. *FEMS Microbiology Ecology*, 59: 436-451.
- Zago, V.C.P.; De-Polli, H.; Rumjanek, N.G. 2000. *Pseudomonas* spp. *Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 32pp.

Capítulo 2: Diversidade do gene *phzF* na biossíntese de fenazina em solos rizosféricos de *Glycine max* (L.) Merrill. cultivada em terra preta da Amazônia

RESUMO

Atualmente há um grande interesse em conhecer a diversidade dos grupos funcionais bacterianos da rizosfera, devido ao seu papel chave nesse ambiente em associação com as plantas hospedeiras. Este trabalho apresenta a diversidade de grupos bacterianos, afiliados a sequências do gene *phzF* na síntese do composto do Ácido Fenazino-1-Carboxílico (PCA), conhecido por possuir uma larga atividade de antibiótico. As amostras de solos estudadas foram provenientes da rizosfera da soja e seu solo não rizosférico (bulk soil), após cultivo em terra preta da Amazônia (TPA) coletadas em dois ambientes: floresta e solo agrícola. As análises foram realizadas por sequenciamento em larga escala e PCR quantitativo. Este foi realizado para quantificar o número de cópias do gene *phzF* utilizando o gene 16S rRNA como padrão de comparação. As anotações metagenômicas foram realizadas para cada tipo de solo, considerando os ambientes dos quais foram coletados (floresta e solo agrícola). As sequências foram anotadas no banco de dados de proteínas (M5NR) do programa (*MG-RAST Metagenome Analysis*), com base nas sequências do domínio *Bactéria*. Os resultados indicaram um total de onze grupos bacterianos afiliados a sequências do gene *phzF*, sendo que a diversidade foi maior para os solos coletados em ambiente de floresta. As análises também revelaram que, a abundância das sequências do gene proveniente do ambiente floresta, foram maiores nos solos não rizosféricos para os grupos taxonômicos: *Alphaproteobactéria*, *Actinobactéria* e *Gammaproteobactéria*. Nas amostras de solos rizosféricos, a abundância das sequências foram maiores para os grupos *Deltaproteobactéria*, *Betaproteobactéria* e *Thermomicrobia*. No solo agrícola a diversidade dos grupos *Alphaproteobactéria* e *Gammaproteobactéria* foram maiores nas amostras rizosféricas. Evidenciou-se também que, algumas classes de bactérias foram exclusivas para determinadas amostra de solo como, *Opitutae* para o Solos rizosféricos, *Bacilli* e *Chloroflexi* para solo bulk (floresta secundária). O emprego da técnica do sequenciamento metagenômico revelou que, a ação das raízes das plantas de soja tem efeito sobre grupos taxonômicos afiliados ao gene *phzF* assim como, influência nos ambientes estudados. Na reação de PCR quantitativo a abundância do número de cópias dos genes estudados apresentaram resultados distintos para ambos os solos.

Palavras-chave: antibiótico, biossíntese, sequenciamento metagenômico, PCR quantitativo.

Chapter 2: Diversity of *phzF* gene in rhizosphere soils of *Glycine max* (L.) Merrill. cultivated in Amazon Dark Earth

ABSTRACT

Currently there is great interest in learning about the diversity of functional bacterial groups in the rhizosphere due to its key role in this environment in association with host plants. This work presents the diversity of bacterial groups affiliated to sequences of the *phzF* gene, related to the synthesis of the compound phenazine-1-carboxylic acid (PCA), known to have a broad antibiotic activity. Rhizosphere and non-rhizosphere (bulk soils) samples were studied from soybean harvesting in Amazon Dark Earth (ADE), which were collected in two environments: secondary forest and pasture-agriculture. High-throughput sequencing and quantitative PCR were used to study the diversity and frequency of the *phzF* gene, using the bacterial 16S rRNA as a standard for comparison. The metagenomic annotation were performed for each soil type, considering the environments of which were collected (secondary forest and pasture-agriculture). The sequences were analyzed in the MG-RAST server based on the M5NR protein database. The results indicated a total of eleven bacterial groups affiliated to *phzF* gene, and the diversity was higher in soils collected in forest. The analysis also revealed that the *phzF* gene abundance in forest was higher in non-rhizosphere soils for the following taxonomic groups: *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* and *Gammaproteobacteria*. For the rhizosphere samples, the abundance of the sequences was higher for *Deltaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* and *Thermomicrobia* groups. In pasture-agriculture soil, the diversity was higher in rhizosphere for *Alphaproteobacteria* and *Gammaproteobacteria*, both when compared with samples from non-rhizosphere soil of each environment. It was evident also that some classes were unique for each soil type, such as *Opitute* for rhizosphere, *Bacilli* and *Chloroflexi* for non-rhizosphere soil (secondary forest). The use of metagenomic sequencing revealed that the action of the soybean roots has an effect on the *phzF* gene community structure, as well as influence in the studied area. The quantitative PCR showed that the number of the genes studied was different in for both soils.

Key-words: antibiotic biosynthesis, large scale sequencing, quantitative PCR

2.1 INTRODUÇÃO

As comunidades bacterianas de solos rizosféricos vêm sendo bastante estudadas, assim como, sua funcionalidade nesse ambiente. Muitos grupos bacterianos possibilitam suas aplicações como fornecedores de produtos naturais e material genético. No entanto, a descoberta de novas funções e produtos derivados de culturas puras, vem diminuindo significativamente devido a uma alta taxa de reisolamento de espécies já conhecidas e está diretamente relacionada com a diminuição do número de novos organismos descritos (Faoro 2010).

As novas técnicas de sequenciamento genômico vêm sendo utilizadas para analisar as comunidades funcionais do ecossistema do solo. Sendo possível acessar operons e genes que codificam vias metabólicas completas (Daniel 2004). Segundo Loman *et al.* (2013), sequências curtas de DNA que contêm genes no todo ou em parte, podem ser usadas para identificar e caracterizar os organismos de que são originários e suas funções nos sistemas. Os genes de interesse passaram a ser clonados superexpressos e a enzima pura, utilizada no lugar do micro-organismo original (Faoro 2010). Portanto, as análises feitas por metagenoma do ambiente solo, favorece o estudo da diversidade de genes responsáveis pela biossíntese de antibióticos, assim como suas funções e interações com os processos no ambiente da rizosfera de planta.

Os compostos fenazinas são de origem natural e têm sido identificados em diversos ambientes provenientes do metabolismo secundário de vários grupos bacterianos (Laursen 2004). Esses são biologicamente ativos e sintetizados principalmente por determinados grupos bacterianos do solo. Dentro deste contexto, o presente trabalho estudou a diversidade espacial do gene *phzF* sobre a influência das raízes de soja, utilizando a estratégia de sequenciamento em larga escala e PCR quantitativo, relatando pela primeira vez a detecção do gene *phzF* em amostras de solos rizosféricos associados à rica diversidade do solo de terra preta da Amazônia.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus - AM e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA) – USP. O fluxograma descreve as etapas realizadas nesse primeiro estudo (Figura 2.1).

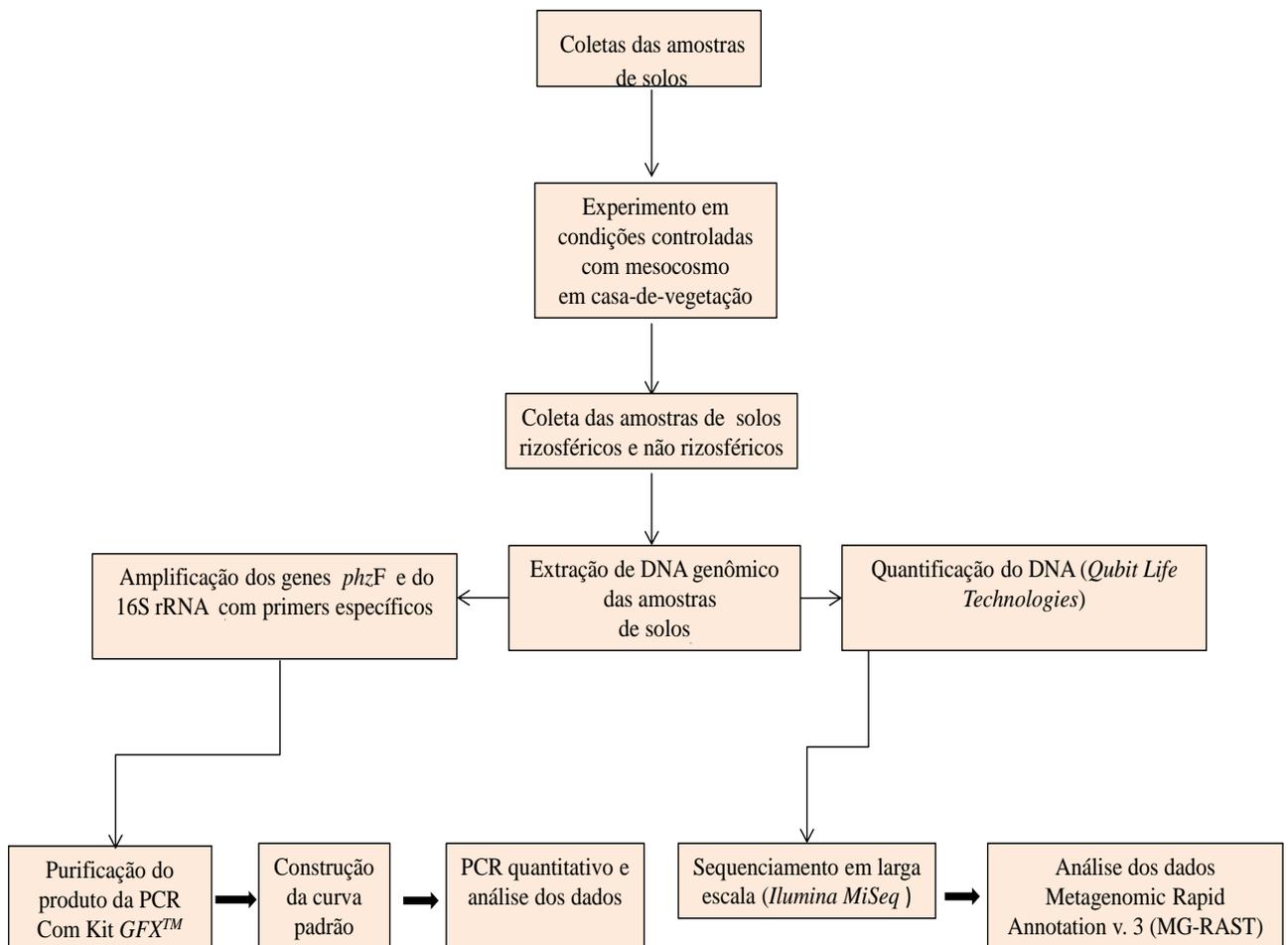


Figura 2.1 – Fluxogramas das etapas desse estudo

2.2.1 Área de estudo

A área de coleta está localizada no município de Iranduba – AM (Figura 2.2), a área com terra preta está no sítio Hatahara com localização geográfica $03^{\circ}16'516''\text{S}$ e $60^{\circ}12'275''\text{O}$.

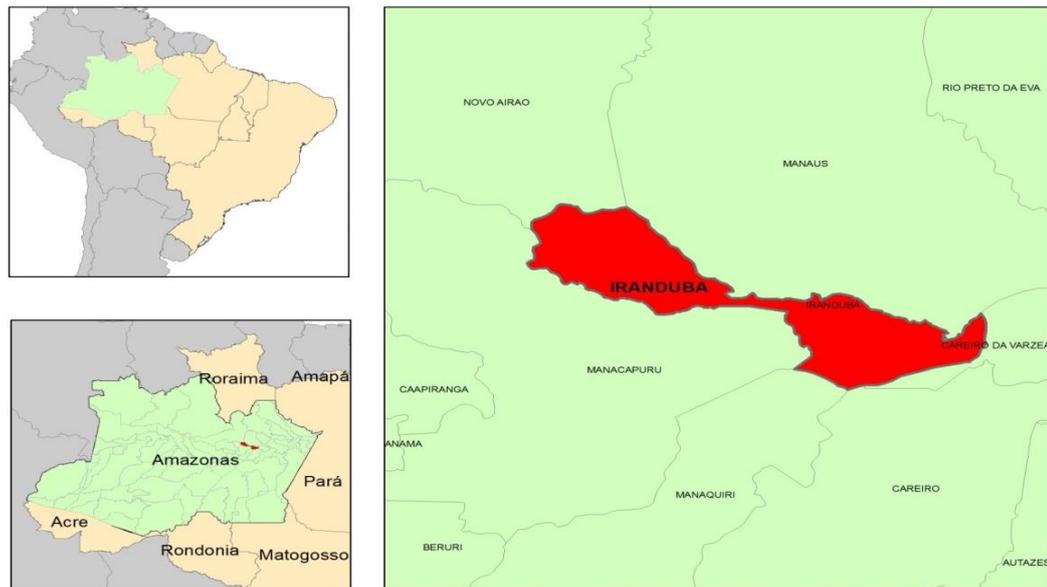


Figura 2.2 – Localização do município de Iranduba – AM. Fonte: SIGALAB-INPA

2.2.2 Coleta do solo

As coletas foram realizadas no ano de 2013 no Município do Iranduba – AM em dois ambientes: floresta agrícola sob uma única mancha de solo de TPA. Para cada ambiente foram realizadas coletas em três pontos com distâncias de 15 m entre eles. De cada ponto foram coletadas seis subamostras dos primeiros 20 cm do perfil do solo, utilizando tubos PVC de 20 cm de comprimento e 50 cm de diâmetro com capacidade de 600 gramas (g) de solo distanciado 1 m cada (Figura 2.3).

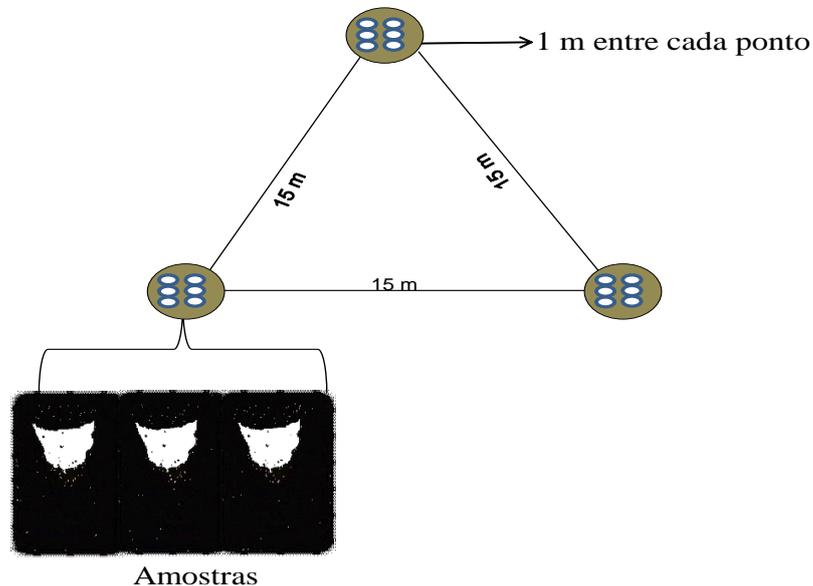


Figura 2.3. Croqui da disposição da coleta das subamostras em cada ambiente

Desses mesmos pontos, também foram coletados três amostras de 300 g em sacos plásticos para análise química. As amostras foram transportadas em caixas térmicas com gelo para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular onde foram mantidos em câmara fria.

2.2.3 Experimento de mesocosmo em casa de vegetação

O experimento foi conduzido no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA-USP, Piracicaba, SP. As seis subamostras de solo referentes aos pontos de cada área foram homogeneizadas em amostra composta e distribuída em cinco vasos com capacidade de 1 kg cada, contendo uma camada de seixo no fundo para facilitar a drenagem da água. Para o solo não rizosférico (solo bulk) foram preparados seis vasos também com TPA. As sementes de soja *Glycine max* (L.) Merrill (variedade BR 394) foram cedidas pela Embrapa Dourados – MS e passaram por assepsia por imersão total em álcool 70% durante 10 minutos. Em seguida, foram lavadas com água *milliQ* e secas sobre papel toalha. Para cada vaso foram semeadas cinco sementes e aos 18 dias após a germinação foi realizado desbaste deixando apenas duas plantas por vaso. Os vasos contendo o solo controle foram mantidos sem planta. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos e seis

repetições; o experimento foi mantido em casa de vegetação e diariamente foi irrigado com água deionizada.

Aos 45 dias após a semeadura, procedeu-se a coleta dos solos rizosféricos das plantas e de amostras dos vasos, controle não rizosférico (solo bulk) da seguinte maneira: a parte aérea das plantas foram excisadas e as raízes retiradas e batidas em sacos plásticos para retirar o excesso de solo. Em seguida, com o auxílio de um pincel de cerdas firmes e previamente autoclavado, o solo aderido à raiz foi retirado cuidadosamente e pesado; 0,25 g de solo foi armazenado em tubos *eppendorf* de 2 ml e mantidos à -20 °C em freezer até o momento da extração do DNA.

2.2.4 Análises químicas do solo

As análises dos atributos químicos dos solos sob os diferentes ambientes estudados foram analisadas anteriormente à instalação do experimento com mesocosmo. Foram coletadas três amostras de cada área (floresta e solo agrícola) e encaminhadas ao laboratório do Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ, Piracicaba-SP.

As amostras foram analisadas em triplicata, em relação a teores de Fósforo (P), cálcio (Ca), alumínio (Al), potencial de acidez (H+Al) matéria orgânica (MO) e soma de bases trocáveis (SB), de acordo com métodos descritos no Manual de análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais, (IAC, 2001 e Manual de métodos de análise de solo EMBRAPA. 2ª edição, 1997).

2.2.5 Análises moleculares

As análises moleculares do presente trabalho foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, CENA/USP, Piracicaba-SP.

2.2.6 Extração de DNA genômico das amostras de solos

Para extração do DNA foram escolhidos de forma aleatória três vasos com solo dos ambientes floresta e solo agrícola, sendo três com plantas (Solos rizosféricos) e três sem

plantas (solo não rizosférico) dos quais foram extraídas as amostras em triplicata, utilizando-se o *Kit Power lyzie DNA ExtractionTM* (MoBio, Carlsbad, CA). Em microtubo com esferas de vidro foi adicionado 0,25 g de solo, agitado levemente no vórtex para homogeneização das amostras. Em seguida, o DNA foi extraído de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A qualidade da extração e integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% (p.v) em tampão TSB 1x (Brody e Kern 2004), corado com GelRedTM (Biotium) (1,5 µL 50 mL⁻¹ de gel), carregado com 1µL do DNA adicionado de 1 µL de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicose). Como padrão de tamanhos de banda de DNA utilizou-se *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen). Após 30 minutos de eletroforese a 80 Volts, os géis foram observados sob luz ultravioleta e registrados em transiluminador L.PIX (*Loccus Biotecnologia*, São Paulo – SP).

2.2.7 Sequenciamento metagenômico “shotgun”

As amostras de DNA extraídas foram quantificadas no fluorímetro Qubit (*Life Technologies*). Assim, foram preparadas três amostras de solo para cada tipo de ambiente: rizosférico, não rizosférico, floresta, e agrícola, totalizando doze amostras. Para o preparo das amostras foi utilizado o *Kit Nextera® XT DNA V2 Sample Preparation* que foram sequenciadas no *Illumina MiSeq* (500 × 250 pb). As sequências obtidas foram anotadas utilizando o software *Metagenomic Rapid Annotation v.3* (MG-RAST) (Meyer *et al.* 2008). Os perfis taxonômicos e metabólicos foram gerados utilizando uma matriz normalizada das sequências, que obtiveram afiliação com o banco de dados de anotação de proteínas M5NR. Uma tabela de frequência de *hits* filogenéticos relativo ao gene *phzF* na biossíntese das fenazinas foi gerada para cada amostra.

2.2.8 PCR quantitativo (qPCR)

As análises de PCR quantitativo foram realizadas com o objetivo de quantificar o número de cópias do gene 16S rRNA bacteriano e do gene *phzF* da via biossintética do Ácido Fenazino-1-Carboxílico (PCA) presente nas amostras de solos dos ambientes floresta e solo

agrícola de terra preta da Amazônia. As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus™ Real Time PCR System (*Applied Biosystems*) utilizando o sistema SYBR® Green-Based TR-PCR Systems Reagentes Kit (Fermentas Brasil). Para a construção da curva padrão foram utilizados DNAs genômicos das bactérias padrões descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Micro-organismos utilizados como controle positivo para construção da curva padrão.

Isolado	Origem/hospedeiro	Descrição	Referência
99	DSMZ	<i>Pseudomonas putida</i>	Trevisan (1889); Migula (1895)
PHZ24	Tomate-França	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Schoonbeek <i>et al.</i> (2002)

O produto de PCR do controle positivo foi purificado com Kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e quantificado no espectrofotômetro modelo ND-2000 (Nanodrop Technologies, Waltham, EUA) para calcular o número de cópias de genes em μL^{-1} com base no número de pares de bases. As curvas padrão foram construídas com 10 diluições em série 10^1 a 10^{10} . Os pontos utilizados para reação foram 10^2 ; 10^3 ; 10^4 ; 10^5 e 10^6 . A amplificação das amostras de solos e da curva padrão foi ampliada por PCR quantitativo em triplicatas (réplicas técnicas) para avaliar a confiabilidade da quantificação.

A reação de amplificação para o gene 16S rRNA bacteriano foi realizada utilizando os *primers* universais para o domínio Bactéria U968F e R1387, os quais, geram um fragmento de aproximadamente 400 pb (Heuer *et al.* 1997). E para amplificação do gene *PhzF* utilizou-se os *primers* Ps_up1 e Ps_low1, os quais geram um fragmento de 427 pb (Tabela 2). As reações de PCR quantitativo foram realizadas em um volume total de 10 μL , contendo 5 μL Kit SYBR Green Rox qPCR (Fermentas Brasil), 1,0 μL de cada *primer* a (5 pmol) 2 μL de água do Kit SYBR Green e 1 μL do produto purificado 50 ng e o DNA total do solo. As condições de amplificação do gene 16S rRNA foram 5 minutos a 95 °C, 30 segundos a 95 °C, 45 segundos a 56 °C, 1 minuto a 72 °C e 35 ciclos de 72 °C por 7 minutos. Para o gene *phzF* foram otimizadas as seguintes condições: 4 minutos a 94 °C, 1 minuto a 94 °C, 30 segundo a 62 °C, 45 segundos a 72 °C, 10 minutos a 72 °C.

Tabela 2- *Primers* utilizados nas reações PCR quantitativo em tempo real na amplificação parcial do gene 16S rRNA bacteriano (U968F e R1387) e do gene fenazina (Ps_up1 e Ps_low1).

<i>Primers</i>	Sequências (5' - 3')	Fragmento (pb)	Temperatura de <i>Melting</i> (°C)	Referência
U968F	AACGCGAAGAACCTTAC			
R1387	CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACG	-400	56	Heuer <i>et al</i> (1997)
Ps_up1	ATCTTCACCCCGGTCAACG			
Ps_low1	CCRTAGGCCGGTGAGAAC	-427	62	Mavrodi <i>et al</i> (2010)

2.2.9 Análises estatísticas

Foram realizadas análises de variância (ANOVA) dos atributos químicos e moleculares do solo através do software ASSISTAT 7.6 (Silva 1996). A análise de comparação de médias foi pelo Teste de Tukey. Para os dados de PCR quantitativo quando necessário foram transformados para \log^{10} e as sequências geradas pelo sequenciamento foram transformadas em abundância relativa.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Análise química do solo

Os resultados das análises químicas dos solos de floresta e solo agrícola mostraram que não diferiram estatisticamente entre si em nenhum dos atributos químicos.

Tabela 3. Análise química dos solos de dois ambientes de Terra Preta da Amazônia – TPA.

Ambientes	Atributos químicos							
	pH	MO	P	Ca	Al	H+Al	SB	CTC
Floresta secundária	5,5±0,7 ^a (*1,04%)	37,5±1a (*6,13%)	456,6±60a (*7,22%)	83,1±11.8a (*4,83%)	1±1 a (*0,00%)	32±1 a (*5,41%)	94,7±7,2 a (*5,55%)	126,6±1,7a (*2,80%)
Solo agrícola	5,2±0,26 a (*1,92%)	41,6±2,5a (*7,71%)	318±1,5a (*31,86%)	61,3±2,0a (*15,50%)	1±1 a (*0,00%)	47±1,7a (*10,64%)	73±0.53a (*13,25%)	120±2,3a (*10,69%)

Cálcio (Ca), Alumínio (Al), Potencial de acidez (H+Al), soma de bases (SB) e capacidade de troca catiônica (CTC) são representados em mmolc dm⁻³; matéria orgânica (MO) em g dm⁻³; o fósforo (P) em mg dm⁻³. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) com desvio padrão e *coeficiente de variância.

O pH do solo do ambiente floresta foi ligeiramente mais elevado em relação ao solo do ambiente agrícola, isso pode estar relacionado à queima da vegetação florestal original realizada pelas comunidades antigas para viabilizar a atividade agrícola realizada anteriormente. O processo de queima, promove a entrada de cátions permutáveis das cinzas para o solo elevando o aumento dos níveis de pH como citado por Cenciani *et al.* (2009).

2.3.2 Extração de DNA genômico dos solos

As extrações de DNA genômico das amostras de solos foram realizadas e sua qualidade foi verificada em gel de agarose 1%, apresentando boa qualidade. Foi utilizado como padrão de peso molecular o total de 2 μ L de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen, Brasil) (Figura 2.4).

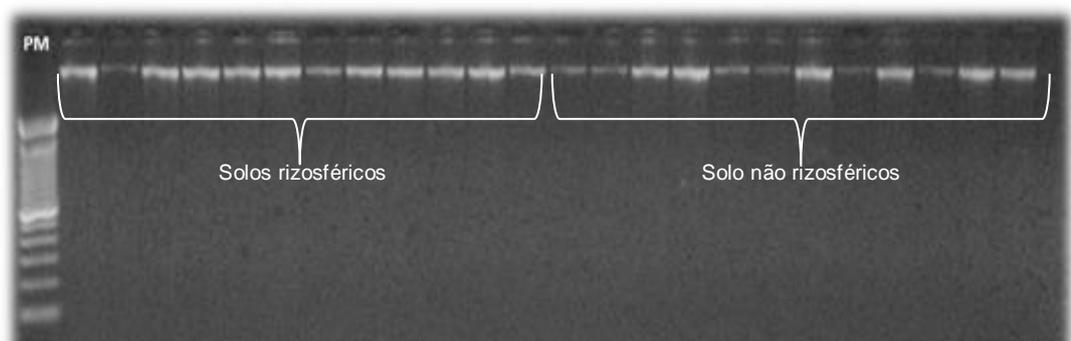


Figura 2.4 - Gel resultante da extração do DNA genômico de amostras de solos da soja PM: padrão de peso molecular 100 pb DNA *Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies)

2.3.3 Análises das sequências

Os resultados deste estudo foram baseados em seguimentos gerados pelo sequenciamento do DNA extraído de amostras de solos da rizosfera de plantas de soja cultivadas em TPA e de solo bulk coletado em vasos-testemunha sem o cultivo de plantas. A finalidade foi estudar a diversidade do gene *phzF* a partir de anotação do banco de dados de proteínas. A abordagem das análises filogenéticas das bibliotecas demonstraram que todas as sequências foram afiliadas ao domínio *Bactéria*, determinando grupos predominantes para cada tipo de solo.

Os resultados apresentaram 12 milhões de sequências, dos quais aproximadamente 42% anotadas no banco de dados do *MG-RAST*, sendo classificadas para o domínio *Bactéria* (95%), *Eukarya* (3%) e *Archaea* (2%). Quando utilizado o *software do MG-RAST* para análises taxonômicas do domínio *Bactéria* no banco de proteínas, a análise revelou 17% de bactérias com a presença do gene *phzF*. Observou-se um total de 283.112 de sequências para as amostras de solos rizosféricos e 469.317 sequências para não rizosféricos, provenientes do ambiente floresta secundária. Para o ambiente solo agrícola, os números de sequências foram de 61.119 para solos rizosféricos e 20.672 para os solos não rizosféricos.

2.3.4 Composição dos grupos taxonômicos

Comparando a diversidade dos grupos bacterianos associados ao gene *phzF* da biossíntese entre as duas áreas de coleta, observou-se que o ambiente floresta foi mais diverso que o solo agrícola, caracterizando uma maior estabilidade desse ambiente. Nas amostras de solos da floresta os grupos taxonômicos foram diferentes para as duas amostras de solos (rizosféricos e não rizosféricos). As sequências do gene *phzF* da biossíntese nos solos rizosféricos foram maiores para os grupos, *Actinobactéria*, *Flavobactéria*, *Deltaproteobactéria*, *Betaproteobactéria*, *Thermomicrobia*, *Unassigned* e *Opitutae*. Nos solos não rizosféricos foram maiores nos grupos *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacilli* e *Chloroflexi* (Figura 2.5). Observou-se também que alguns grupos foram exclusivos para cada amostra de solo tais como, *Opitute* para os solos rizosféricos, *Bacilli* e *Chloroflexi* para os solos não rizosféricos.

Para amostras do ambiente solo agrícola as sequências do gene *phzF* foram maiores nas amostras de solos rizosféricos para os grupos *Actinobactéria*, *Flavobactéria*, *Alphaproteobactéria*, *Gammaproteobactéria*, *Betaproteobactéria* e no não rizosférico para os grupos *Thermomicrobia*, *Deltaproteobactéria* e *Actinobactéria* (Figura 2.6).

De modo geral, os solos provenientes dos ambientes floresta e agrícola, e o manejo destes com cultivo de soja influenciaram na composição da comunidade bacteriana dos solos de TPA. De acordo com Nüsslein e Tiedje (1999); Buckley *et al.* (2006); Cenciana *et al.* (2009) o tipo de solo, o manejo e as espécies de plantas alteram as comunidades bacterianas no solo.

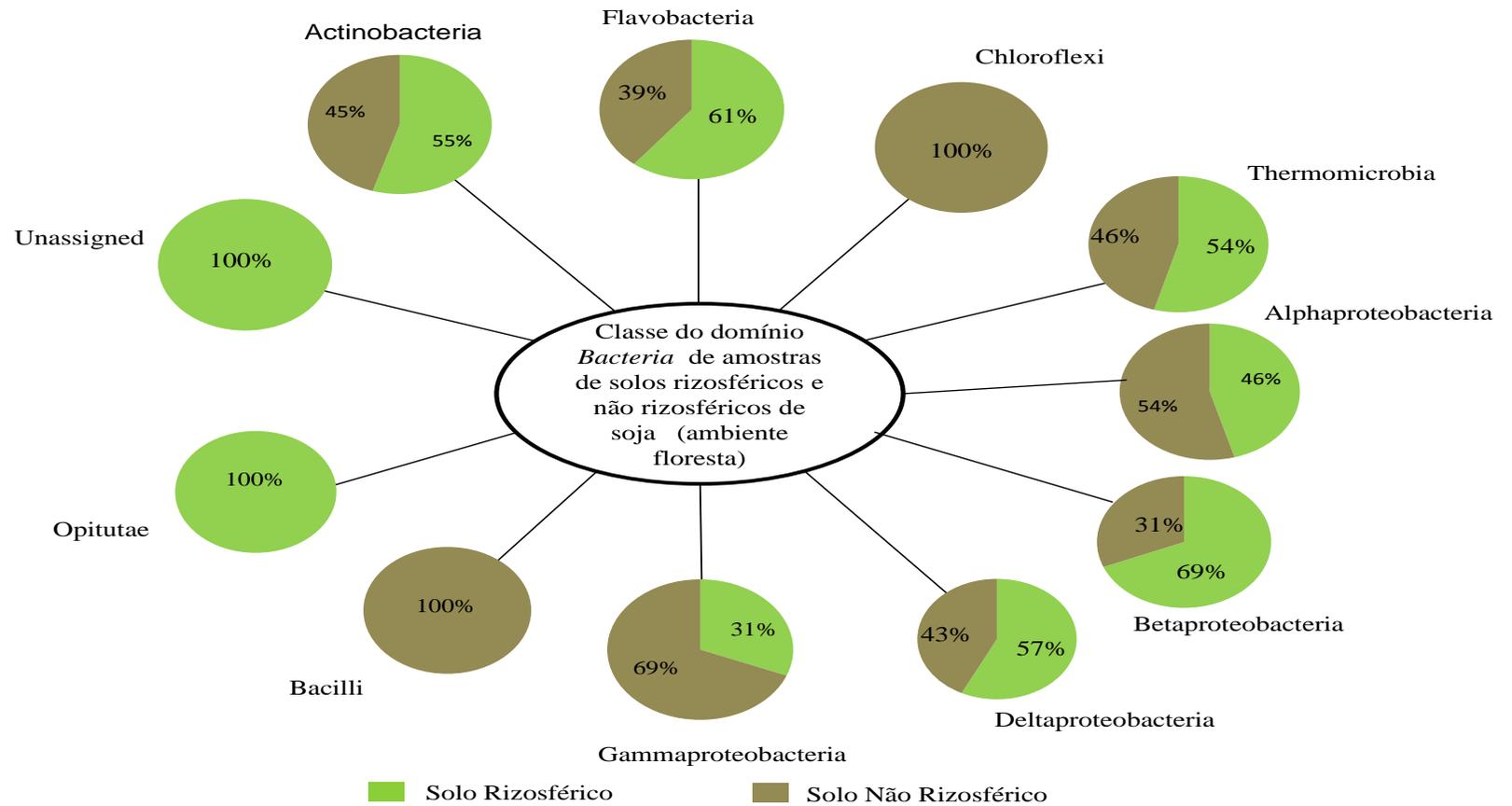


Figura 2.5 - Frequências dos grupos taxonômicos de domínio *Bactéria* associadas ao gene da biossíntese da fenazinas *phzF* classificados pelo banco de dados de anotação de proteínas M5NR em amostras e solos rizosféricos e não rizosféricos da soja do ambiente floresta

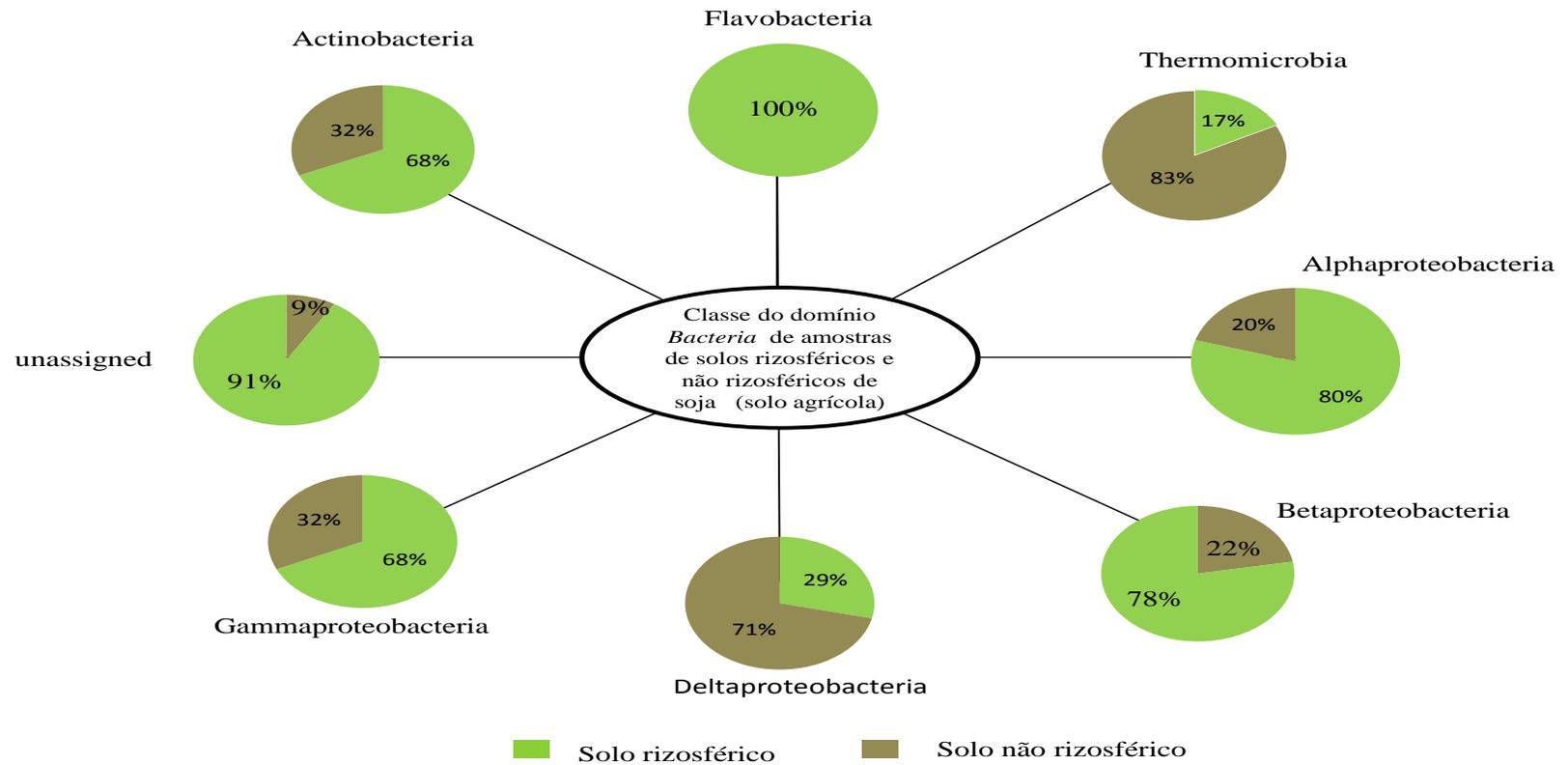


Figura 2.6 - Frequências dos grupos taxonômicos de domínio *Bactéria* associadas ao gene da biossíntese da fenazinas *phzF*, classificadas pelo banco de dados de anotação de proteínas M5NR em amostras e solos rizosféricos e não rizosféricos da soja do ambiente agrícola.

2.3.5 Abundâncias relativas às sequências para os grupos taxonômicos

O resultado da análise de sequenciamento identificou um total de 11 grupos do domínio *Bactéria*, os quais foram anotados a partir de sequências do banco de dados de proteínas M5NR (<http://www.metagenomics.anl.gov/metagenomics.cgi?page=Analysis>), para o gene *phzF* (Tabela 4). Os grupos dominantes em todas as amostras analisadas foram: *Actinobactéria*, *Alphaproteobactéria*, *Thermomicrobia*, *Alphaproteobactéria*, *Betaproteobactéria*, *Deltaproteobactéria* e *Gammaproteobactéria*. Os grupos *Flavobactéria*, *Chloroflexi*, *Opiritae* e *Bacilli* foram também associados ao gene biossíntese *phzF* nas amostras analisadas. Os grupos taxonômicos não diferiram estatisticamente entre si.

Em relação à diversidade dos grupos bacterianos, os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os encontrados pelos autores Kim *et al.* (2007); Navarrete *et al.* (2010) e Cannavan (2011). Estes autores estudaram amostras de solos de TPA e observaram que o filo *Proteobactéria* representou dominância, incluindo as classes *Alphaproteobactéria*, *Betaproteobactéria*, *Deltaproteobactéria* e *Gammaproteobactéria*. Segundo eles, esses grupos podem ser encontrados tanto nos solos como em associação com as raízes das plantas. Estudo realizado por Mendes *et al.* (2014), através de sequenciamento genômico de amostras de solos rizosféricos da planta soja, evidenciaram um elevado número das sequências para o filo *Proteobactéria* seguido de *Actinobactéria*, representando maior percentual de sequências analisadas. As frequências destes grupos taxonômicos também foram encontradas em solos rizosféricos de arroz como as *Proteobactérias*, representando 44% e 50%, *Actinobactéria* e *Betaproteobactéria* maior do que 4% (Spence *et al.* 2014), levando a sugerir que estes grupos possam ser mais abundantes na rizosfera.

As *Proteobactérias* de modo geral, apresentam crescimento rápido e utilizam uma gama de substratos derivados de carbono para seu metabolismo (Philippot *et al.* 2013). Outro fator a ser considerado é que o ambiente da rizosfera apresenta-se com características químicas adequadas para o crescimento destes grupos de micro-organismos. Além do mais, alguns gêneros bacterianos pertencentes ao filo *Proteobactéria* estão intimamente relacionados com as leguminosas e algumas espécies com potencial de fixar nitrogênio, degradar compostos aromáticos, reciclar matéria orgânica e produzir metabólitos secundários (Sprent 2001; Anderson *et al.* 2011).

Por isso, estudos evidenciam uma maior frequência desse grupo nos solos agriculturáveis (Raaijmakers *et al.* 1997; Rodriguez e Fraga 1999; Malboobi *et al.* 2009; Kuramae *et al.* 2011). Neste sentido, a diversidade de bactérias capazes de sintetizar fenazina tem sido documentada em diversos trabalhos, principalmente entre as linhagens Gram-positivas e em *Proteobacteria* Gram-negativa (Chin-A-Woeng *et al.* 1998; Beiffus e Tietze 2005; Pricee e Dietrich 2006; Mavrodi *et al.* 2006). Portanto, os grupos do filo *Proteobactéria* têm uma ampla diversidade de bactérias incluindo espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* com grande potencial para uso benéfico na agricultura, principalmente, para biocontrole de fitopatógenos (Rudramurthy *et al.* 2011).

Tabela 4 Abundância das classes bacterianas encontradas em solos rizosféricos e não rizosféricos em plantas de soja cultivadas em casa de vegetação em vasos contendo solo coletado dos ambientes: floresta e solo agrícola em uma área de terra preta da Amazônia. As sequências obtidas foram classificadas pelo banco de proteínas M5NR

Grupos afiliados ao gene <i>phzF</i> da biossíntese	Floresta		Solo agrícola	
	Solos rizosféricos	Solos não rizosféricos	Solos rizosféricos	Solos não rizosféricos
<i>Actinobactéria</i>	18,36±16,2a	22,76±20,13a	13,6±9,5a	29,51±26,5a
<i>Flavobactéria</i>	0,56±0,31a	0,24±0,17a	1,09±0,75	-
<i>Chloroflexi</i>	-	0,64±0,55a	-	-
<i>Thermomicrobia</i>	6,52±2,24a	5,4±1,95a	5,49±3,18a	2,91±1,34a
<i>Alphaproteobactéria</i>	27,88±13,4a	33,3±6,27a	23,1±20,2a	5,9±1,78a
<i>Betaproteobactéria</i>	6,45±1,88a	2,9±1,34a	1,34±0,78a	4,7±2,3a
<i>Deltaproteobactéria</i>	7,09±3,81a	5,2±0,84a	1,0±0,69a	2,7±1,8a
<i>Gammaproteobactéria</i>	1,47±0,97a	3,2±1,64a	2,7±1,02a	1,3±0,69a
<i>Opitutae</i>	0,56±0,31a	-	-	-
<i>Unassigned</i>	3,14±1,59a	-	0,2±0,3	2,1±3,73
<i>Bacilli</i>	-	0,01±0,03a	-	-

As análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada grupo taxonômico entre as médias de cada solo (rizosférico e não rizosférico), considerando cada ambiente. Os valores nas colunas seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$) com desvio padrão.

Estudos demonstram que a classe *Actinobactéria*, e as classes do filo *Proteobactéria*: *Betaproteobactéria* e *Gammaproteobactéria* apresentam espécies com potencial para produzir fenazinas e outros compostos em ambientes naturais. Dentre estas, espécies do gênero *Streptomyces* produzem fenazinas não citotóxicas com potencial para compostos anticancerígenos e anti-inflamatórios (Laursen e Nielsen 2004).

Os gêneros *Pseudomonas* produzem o PCA e outras fenazinas com potencial de biocontrole (Turner e Messenger 1986; Mavrodi *et al.* 2006; Mendes 2011). A afiliação das sequências do gene *phzF* para estas classes oportuniza estudos específicos para identificar espécies produtoras do antibiótico fenazinas, até o momento não identificadas em amostras de solos rizosféricos de TPA.

De modo geral, foi possível detectar a dinâmica da frequência do gene biossíntese *phzF* do composto fenazina nos grupos taxonômicos nas amostras de solos no ambiente da rizosfera de plantas cultivadas em solo de TPA. A abordagem genética da frequência do gene *phzF* em amostras de solos rizosféricos, possibilita condições de estudar grupos bacterianos produtores de fenazinas por meio da otimização de técnicas para identificar e isolar produtores *phz+* da fenazina. Além disto, genes da biossíntese de compostos naturais podem ser utilizados na clonagem e expressão gênica. Levando em consideração que há grande atividade metabólica dos grupos bacterianos presentes nas raízes das plantas a intensificação dos estudos faz-se necessário.

2.3.6 As reações do PCR quantitativo

A utilização da técnica de PCR quantitativo foi bastante precisa permitindo quantificar número de cópias do gene *phzF* na biossíntese da fenazina nas amostras de solos analisadas (rizosféricos e não rizosféricos); além disso, foi possível comparar a comunidade bacteriana total, por meio da quantificação do gene 16S rRNA bacteriano.

2.3.7 Construção da curva padrão

As reações de PCR realizadas com os *primers* do gene 16S rRNA bacteriano (U968F e R1387) e do gene fenazina (Ps_up1 e Ps_low1) X e Y dos controles positivos *P. putida* e *P. chlororaphis* resultaram em fragmentos de tamanho 400 e 427 pb conforme o esperado (Heuer *et al.* 1997; Mavrodi *et al.* 2010) (Figura 2.7).

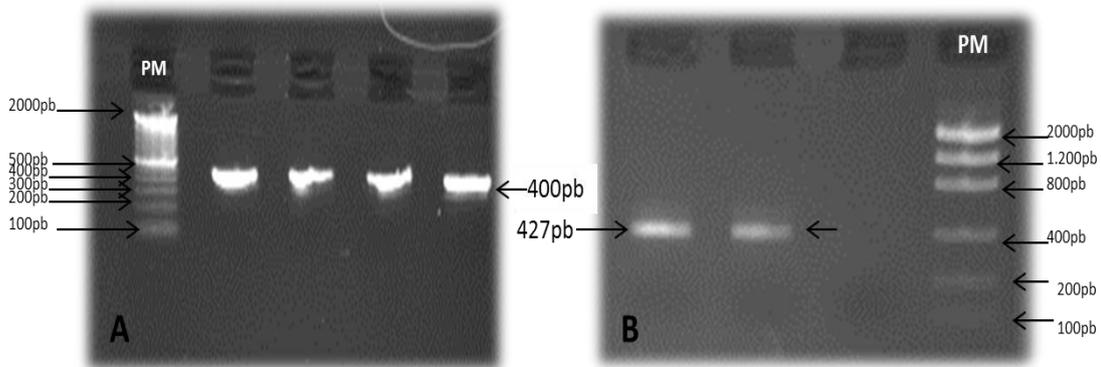


Figura 2.7 – Eletroforese em gel de agarose (1%) com produtos da amplificação do gene dos controles positivos *Pseudomonas putida* e *P. chlororaphis* utilizando os *primers* (U968F e R1387) e (Ps_up1 e Ps_low1) para os genes 16s rRNA bacteriano (A) e *phzF* (B) estudados, PM: padrão de peso molecular 100 pb DNA Mass Ladder™ (Invitrogen Life Technologies) (B) e *phzF* PM: marcador *Low DNA Mass Ladder* no controle positivo para construção da curva padrão.

Para a quantificação dos genes *phzF* e 16S rRNA nas amostras de solos, as diluições da curva padrão e a temperatura de desnaturação *Melting* apresentaram o coeficiente de correlação adequada ao uso para curva de calibração, os valores estão descritos na (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores da curva de *Melting* amplificação dos genes nas amostras de solos obtidos pela análise das reações do PCR quantitativo com os *primers* para domínio *Bactéria* e o gene da *phzF* da biossíntese da fenazina.

Gene	Correlação (R ²)	Eficiência (%)	TM (°C) da curva padrão (média)
16S rRNA	0,994	91	94,49
<i>phzF</i>	0,991	92	89,49

As análises de amplificação das amostras foram verificadas por meio de avaliação da curva de *melting*. Segundo Ririe *et al.* (1997), a curva de *melting* é capaz de diferenciar fragmentos do mesmo tamanho, contudo com formação de bases nucleotídicas diversas. Para as reações desse estudo, foram feitas diluições seriadas 10^{10} a 10^1 cópias do gene μL^{-1} , entretanto, foram utilizadas as diluições de 10^6 a 10^2 nas reações, utilizando três repetições para cada ponto da curva (réplicas técnicas). É possível notar que a otimização parâmetro da técnica de PCR quantitativo foi eficiente, permitindo discriminar a abundância dos genes 16S rRNA bacteriano e do *phzF* entre as amostras.

2.3.8 PCR quantitativa do gene 16S rRNA das amostras de solos

O número médio de cópias do gene 16S rRNA encontrado no solo da rizosfera de soja cultivada em solos coletados do ambiente de floresta foi de 1,43 vezes maior ($2,57 \times 10^9$ cópias.g solo⁻¹) que o encontrado no solo bulk dos vasos sem a soja ($1,8 \times 10^9$ cópias.g de solo⁻¹) (Figura 2.8) não sendo estatisticamente significativa pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). Os resultados indicam também que, o ambiente floresta quanto comparado com o de agrícola, apresentou maior número de cópias do gene 16s rRNA bacteriano para os dois tratamentos (Solos rizoféricos e não rizoférico). Sugerindo que, a diversidade vegetal do ambiente floresta proporcionou a abundância de bactérias.

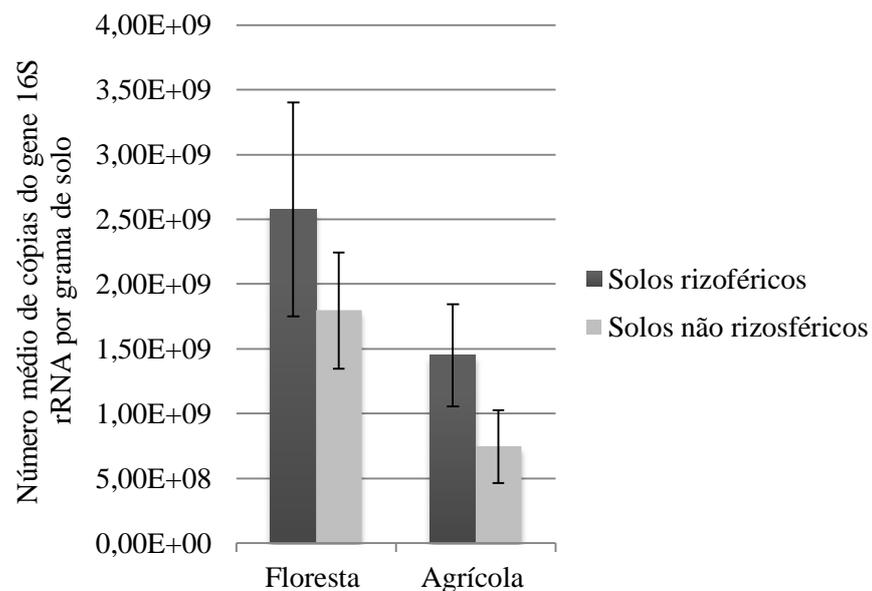


Figura 2.8. Número médio de cópias do gene 16s rRNA bacteriano determinado por PCR quantitativo. As amostras referem-se a solos rizoféricos de soja cultivada em solos de terra preta da Amazônia coletado em área de (floresta e agrícola). Barras na vertical representam erro padrão.

Para o solo coletado em área agrícola, apesar do número de cópias do gene 16S rRNA ter sido 1,95 vezes maior no rizoférico ($1,45 \times 10^9$ cópias.g de solo⁻¹) comparando-se com o não rizoférico ($7,45 \times 10^8$ cópias.g de solo⁻¹), eles não diferiram estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). Observa-se que, para os solos dos dois ambientes (floresta e agrícola), após cultivo da soja, houve maior número de cópias do gene bacteriano nas amostras de solos rizoféricos, visto que, essa abundância esteja relacionada a determinados

grupos associados com as raízes da soja. Além disso, a rizosfera é um microambiente favorável para determinados grupos bacterianos presentes no solo. Também, bactérias gram-positivas e gram-negativas que estão associadas às raízes têm o papel de decompor matéria orgânica complexa e moléculas orgânicas de baixo peso molecular (Kramer *et al.* 2006). Segundo (Lange *et al.* 2014), quanto maior a diversidade de plantas maior a diversidade de grupos bacterianos funcionais. Muitos desses grupos, presentes na rizosfera exercem um papel primordial nesse ambiente, como os que atuam na defesa das plantas.

2.3.9 PCR quantitativo do gene *phzF* na biossíntese

As análises de PCR quantitativo para o gene na biossíntese do antibiótico fenazina *phzF* das amostras de solo coletado da rizosfera de soja cultivada em solo coletado na área de floresta resultou 1,02 vezes mais ($2,39 \times 10^4$ cópias.g solo⁻¹) em relação ao solo bulk ($2,33 \times 10^4$ cópias.g solo⁻¹). Ambos os dados não apresentaram diferença estatística entre si, porém é possível observar um maior número de cópias do gene no ambiente da rizosfera, sugerindo estar relacionados com a diversidade de espécies dos grupos bacterianos presentes no solo sob a influência das raízes. Para as amostras coletadas em áreas de solo agrícola, apesar dos solos não rizosféricos (solo bulk) ter apresentado 2,32 vezes mais cópias do gene fenazina ($1,79 \times 10^5$ cópias.g solo⁻¹) em relação aos solos rizosféricos ($7,73 \times 10^4$ cópias.g solo⁻¹) (Figura 2.9), a análise da variância mostrou que os dois não diferiram estatisticamente entre si. Considera-se que o elevado número de cópias do gene nos solos não rizosféricos possa estar relacionado a um determinado grupo bacteriano presente nesse ambiente.

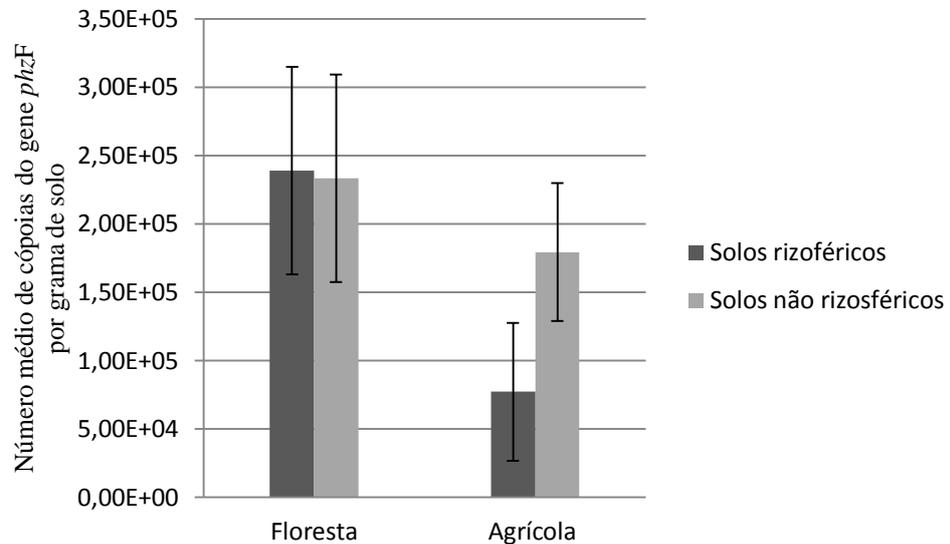


Figura 2.9. Número médio de cópias do gene *phzF* determinado por PCR quantitativo. As amostras referem-se a solos rizoféricos e não rizoféricos de soja cultivada em solo de terra preta da Amazônia coletado em área de (floresta e agrícola). Barras na vertical representam erro padrão.

O solo de TPA tem sido material de estudo dos pesquisadores pela sua elevada diversidade microbiana. Os resultados deste estudo demonstraram a diversidade de grupos bacterianos presente nos solos dos ambientes tanto de floresta como de agrícola. Esta diversidade também se apresenta na rizosfera da planta soja, sugerindo que estes grupos possam ser estudados com o objetivo de isolar espécies bacterianas com potencial para produção do composto fenazina. Este trabalho tem sua importância na caracterização da dinâmica e distribuição espacial do gene *phzF* entre os solos rizoféricos e não rizoféricos de ambientes distintos.

2.4 Conclusões

Os resultados desse estudo demonstraram o potencial das análises moleculares, uma abordagem independente de cultivo para a detecção de biomoléculas de ambientes naturais com potencial biotecnológico. Com base na caracterização dos atributos químicos, não foram observadas alterações nos solos dos ambientes: floresta e agrícola. A análise metagenômica revelou que, a afiliação das sequências do gene biossíntese *phzF* foram distintas entre os grupos taxonômicos para os solos rizoféricos e não rizoféricos da soja para ambos

ambientes estudados (floresta e agrícola). Pela análise do PCR quantitativo foi possível detectar e determinar o número de cópias dos genes 16S rRNA bacteriano e *phzF*, permitindo observar diferenças numéricas entres os solos. Os resultados obtidos pelas técnicas de sequenciamento metagenômico e PCR quantitativo revelaram que a presença do cultivo de soja e os ambientes estudados influenciaram na composição dos grupos taxonômicos de bactérias e na presença do gene *phzF*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, C.R.; Condon, T.M.; Clough, T.J.; Friers, M.; Stewart, A.; Hill, R.A.; Sherlock, R.R. 2011. Biochar induced soil microbial community change: implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus. *Pedobiologia*, Jena, 54: 309–320.
- Beifuss, U.; Tietze, M. 2005. Methanophenazine and other natural biologically active phenazines. In: MULZER, J.H (Ed.) Natural products synthesis II: targets, Methods, concepts. Berlin: *Springer*, 244: 77-113.
- Buckley, D.H.; Huangyutitham, V.; Nelson, T.A.; Rumberger, A.; Thies, J.E. 2006. Diversity Planctomycetes soil in relation to soil history and environmental heterogeneity, *Applied Environmental Microbiology*, 72: 4522-4531.
- Cannavan, F. S. 2012. *O carvão pirogênico favorece a diversidade de filos bacterianos em terra preta de índio*. Tese de doutorado do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, São Paulo, 115pp.
- Cenciani, K.; Lambais, M.R.; Cerri, C.C.; Azevedo, L.C.B.; Feigl, B.J. 2009. Bacteria diversity and microbial biomass in forest pasture and fallow soils in the southwestern Amazon Basin. *Revista de Brasileira de Ciências do Solo*, 33: 907-916.
- Chin-A-Woeng, T.F.C.; Bloemberg, G.V.; van der Bij, A.J.; van der Drift, K.M.G.M.; Schripsema, J. Bruijn, F.J. 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *Radicis-lycopersici*. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 11: 1069–1077.
- Embrapa. 1997. *Análises químicas para avaliação da fertilidade do solo*. Rio de Janeiro: EMBRAPA, CNPS. 63pp.

- Heuer, H.; Krsek, M.; Baker, P.; Smalla, K.; Wellington, E.M.H. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gelelectrophoresis separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 63: 3233–3241.
- Kramer C, Gleixner G (2006) the use of plant variables and carbon derived from agricultural soil by microorganisms in the soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 3267-3278.
- Kim, J.S.; Sparovek, G.; Longo, R.M.; De Melo, W.J.; Crowley, D. 2007. Bacteria diversity of terra preta and pristine forest soil from the western Amazon. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 39: 684-690.
- Kuramae, E.E.; Yergeau, E.; Wong, L.C.; Pijl, A.S.; Veen, J.A.V.; Kowalchuk, G.A. 2011. Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiology Ecology*, Amsterdam, 79: 12–24.
- Laursen, J.B.; Nielsen, J. 2004. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chemical Reviews*, 104: 1663–1685.
- Lange, M.; Habekost, M.; Gleixner, G. 2014. Biotic and Abiotic Properties Mediating Plant Diversity Effects on Soil Microbial Communities in an Experimental Grassland, *PloS One*, 9: (5). 1-9.
- Malboobi, M.A.; Owlia, P.; Behbahani, M.; Sarokhani, E.; Moradi, S.; Yakhchali, B.; Deljou, A.; Heravi, K.M. 2009. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Oxford, 25: 1471–1477.
- Mavrodi, D.V.; Blankenfeldt, W.; Thomashow, L.S. 2006. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 417–445.
- Mavrodi, D.V.; Peever, T.L.; Mavrodi, O.V.; Parejko, J.A.; Raaijmakers, J.M.; Lemanceau, P.S.; Mazurier, H. L.; Blankenfeldt, W.; Weller, D.M.; Thomashow, L.S. 2010. Diversity and Evolution of phenazine biosynthesis *Applied Environmental Microbiology*, 886-879.
- Mendes, L.W.; Kuramae, E.E.; Navarrete A.A.; van Veen, J.A.; Tsai S.M. 2014. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. *The ISME Journal*, 1-11.
- Mendes, R.; Kruijt, M.; Bruijn, I. Dekkers, E.; Voort, M. V., Schneider, J.H. M.; Piceno, Y. M., DeSantis, T. Z.; Andersen, G.L.; Bakker P.A.H.M.; Raaijmakers, J.M. 2011. Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. *Science*, 332:1097-1100.

- Meyer, F.; Paarmann, D.; D'souza, M.; Olson, R.; Glass, E.M.; Kubal, M.; Paczian, T.; Rodriguez, A.; Stevens, R.; Wilke, A.; Wilkening, J.; Edwards, R.A. 2008. *The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. BMC Bioinformatics*, 9: 386.
- Navarrete, A.A.; Cannavan, F.S.; Taketani, R.G.; Tsai, S.M. 2010. A molecular survey of the diversity of microbial communities in different Amazonian agricultural model systems. *Diversity*, Bethesda, 2: 787-809.
- Nüsslein, K, Tiedje JM. 1999. Soil bacterial community change related to the change of forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl Environmental Microbiology*, 65: 3622-3626.
- Philippot, L.; Spor, A.; Hénault, C.; Bru, D.; Bizouard, F.; Jones, C. M.; Maron, A. S. P. 2013. Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. *The ISME journal*, 7: 1609-1619.
- Price-Whelan, A.; Dietrich, L.E.; Newman, D.K. 2006. Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature Chemical Biology*, 2: 71–78.
- Raaijmakers, J. M.; Weller, D. M.; Homashow, L. S. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments, *Applied and Environmental Microbiology* 63: 881–88.
- Ririe, K. M.; Rasmussen, R. P.; Wittwer, C.T. 1997. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*, 245: 154-160.
- Rodriguez, H.; Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, Oxford, 17: 319–339.
- Rudramurthy, S.M.; Chakrabarti, A.; Geertsen, E.; Mouton, J.W.; Furniture, J.F.; 2011. In vitro activity of isavuconazole against *Aspergillus flavus* isolated 208 compared with 7 other antifungal agents: assessment according to the methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 71: 370-377.
- Silva, F.A.S. 1996. The ASSISTAT Software Statistical Assistance In: Sixth International Conference on Computers in Agriculture, Cancun, Mexico: *Annals of the American Society of Agricultural Engineers*, 1: 294-296.
- Spence, C.; Alff, E.; Johnson, C.; Ramos, C.; Donofrio, N.; Sundaresan. V.; Bais, H. 2014. Natural rice rhizosphere microbes suppress rice blast infections. *BMC Plant Biology*, 14: (130). 2-17.

Sprent, J.L. 2001. Nodulation in legumes. *Annls of Botanic*, 89: 797-798.

Schoonbeek, H.; Raaijmakers, J.M.; De Waard, M.A. 2002 Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15: 1165–1172.

Turner, J.M.; Messenger, A.J. 1986. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Advances Microbial Physiology*, 27: 211–275.

Capítulo 3: Detecção do gene *phzF* na biossíntese e estrutura da comunidade bacteriana em Solos rizosféricos de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Wald] cultivado em terra preta da Amazônia (TPA)

RESUMO

No ambiente da rizosfera há uma grande diversidade de grupos bacterianos funcionais envolvidos no desenvolvimento das plantas. A compreensão da estrutura do perfil das comunidades bacterianas presentes nesse ecossistema é de grande importância para a ecologia microbiana, assim como o estudo das variações dessas comunidades do ambiente em solos agrícolas e também, em interação com as plantas. O presente estudo teve como objetivo detectar, quantificar os genes *phzF* da biossíntese e 16S rRNA bacteriano e avaliar a estrutura das comunidades bacterianas em solos rizosféricos e não rizosféricos do feijão caupi cultivado em TPA coletados de dois ambientes (floresta e agrícola). Para tanto, foram utilizadas as técnicas de PCR quantitativo para quantificar o número de cópias do gene *phzF* e 16S rRNA e a de T-RFLP para estudar o perfil das comunidades bacterianas. Os resultados das análises demonstraram que, a quantidade do gene *phzF* foi maior nas amostras de solos rizosféricos quando comparados a solos não rizosféricos (bulk). Porém, a quantidade do gene *phzF* entre as amostras não diferiram estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para o gene 16S rRNA bacteriano as amostras de solos não rizosféricos apresentaram diferenças significativas em relação aos solos rizosféricos. Os resultados do T-RFLP revelaram que as estruturas das comunidades bacterianas em solos rizosféricos de feijão caupi foram distintas, quando comparados com os solos não rizosféricos. Os resultados confirmam que a interação entre planta e esses micro-organismos, e o tipo de solo contribuem para uma maior diversidade bacteriana no ambiente. Este estudo foi de grande importância na detecção do gene *phzF* na rizosfera, pois irá contribuir de forma significativa na compreensão da evolução da bioprospecção de compostos naturais para utilização no controle biológico.

Palavras-chave: rizosfera, PCR quantitativo, T-RFLP, comunidades bacterianas, solo tropical.

Chapter 3: Detection of *phzF* biosynthesis gene and bacterial community structure in rhizosphere soil of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Wald] in Amazonian Dark Earth

ABSTRACT

In the rhizosphere environment there is a wide variety of bacterial genes involved in plant development. Understanding the structure of the bacterial communities present in this ecosystem is of great importance for microbial ecology, as well as the study of variations of the environment of these communities in agricultural soils. The present study aimed to detect the abundance of 16S rRNA and *phzF* genes, and evaluate the structure of bacterial communities in the rhizosphere and non-rhizosphere soil from Amazon Dark Earth under cowpea cultivation collected from two environments (forest and agricultural soil). For this purpose, quantitative PCR was used to quantify the number of gene copies and T-RFLP was used to study the structure of the bacterial community. The amount of *phzF* gene was higher in rhizosphere soil samples when compared to non-rhizosphere, although there were no statistical differences between environments. For the 16S rRNA gene, non-rhizosphere soils (without influence of plant roots) showed significant differences from the rhizosphere soils. The results of T-RFLP revealed that the bacterial community structure in rhizosphere of cowpea was different when compared to non-rhizospheric soil. These results confirm that the interaction of plant-microorganisms and soil type contribute to shaping the microbial community. This study was of great importance in detecting *phzF* gene in rhizosphere, leading to significantly contribution to the study of evolution of bioprospecting of natural compounds.

Key words: rhizosphere, quantitative PCR, T-RFLP, bacterial community, tropical soil,

3 INTRODUÇÃO

As bactérias têm um papel de grande relevância principalmente na produção de alguns compostos, que são utilizados na indústria farmacêutica, alimentícia e na agroindústria. O sucesso dos processos biotecnológicos está diretamente relacionado à diversidade destes micro-organismos e das moléculas que elas produzem como resultado dos metabolismos primário e secundário (Hunter-Cevera 1998).

Os compostos secundários estão presentes na natureza principalmente em plantas e micro-organismos. O estudo de compostos provenientes do metabolismo secundário de micro-organismos presentes em amostras ambientais vem aumentando devido ao avanço das ferramentas moleculares. O ambiente do solo é um grande reservatório de genes bacterianos específicos para determinadas funções como, por exemplo, para os ciclos do nitrogênio e do carbono, genes responsáveis pela síntese de processos de degradação e compostos secundários. Alguns desses genes são expressos mediante a interação de micro-organismos e plantas, que podem ser uma grande fonte de metabólitos bioativos.

O composto secundário fenazina, produzido por bactérias, é um composto heterocíclico nitrogenado e pigmentado. Possui uma ampla atividade de antibiótico contra células de bactérias, fungos e animais. Os antibióticos Piocianina (PYO), Fenazina-1-carboxamida (PCN), 1-Hidroxifenazina, 2-Hidroxifenazina-1-ácido carboxílico, 2-hidroxifenazina; 1,6-Dihidroxifenazina 5, 10-N-Dióxido (Iodina), D-Alanil-ácido griseolutéico (AGA) e Fenazina-1-ácido carboxílico (PCA) são exemplos de fenazinas de origem bacteriana (Laursen e Nielsen 2004; Smirnov e Kiprianova 1990; Gessard 1882).

Através das análises utilizadas neste estudo foi possível quantificar os genes *phzF* e 16S rRNA, além de determinar o perfil molecular das comunidades bacterianas. Esta pesquisa tem sua importância por fornecer informações do papel da comunidade funcional bacteriana em amostras de solos rizosféricos e não rizosféricos do feijão caupi cultivado em terra preta da Amazônia (TPA).

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus - AM e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA) USP O fluxograma descreve as etapas realizadas nesse segundo estudo (Figura 3.1).

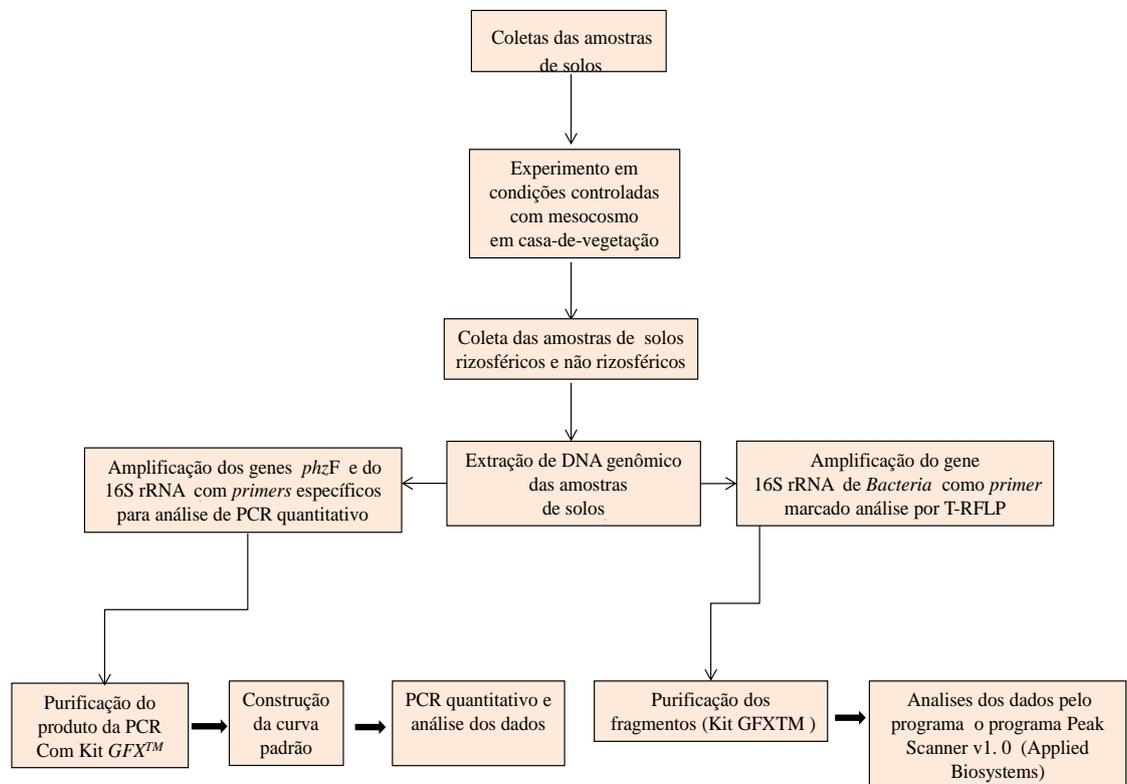


Figura 3.1 Fluxograma das etapas desse estudo

3.2.1 Amostragem do solo

As amostras de solos foram coletadas em duas áreas no sítio Hatahara: floresta e agrícola no Município do Iranduba, AM, no ano de 2012. Foram coletados cinco pontos a partir de um ponto central nas posições Norte, Sul, Leste e Oeste (Figura 3.2). De cada ponto

foram coletadas duas amostras em sacos plásticos de 25 kg nos primeiros 20 cm do perfil do solo.

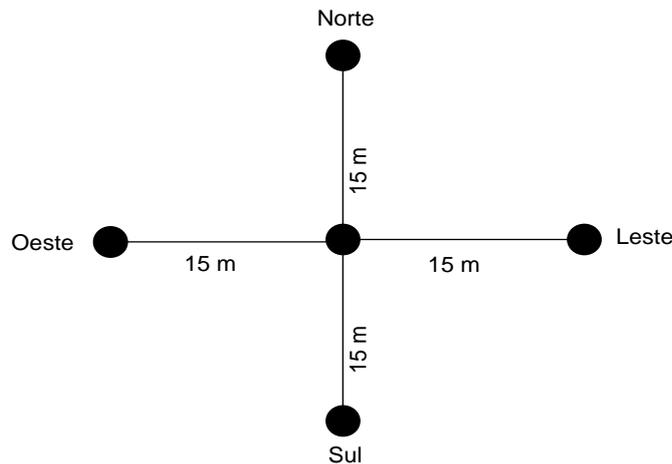


Figura 3.2 – Croqui da coleta das amostras dos solos

3.2.2 Experimento de mesocosmo em casa de vegetação

Neste experimento as amostras de solo de TPA de cada ponto das áreas foram homogeneizadas, obtendo uma amostra composta, que foi distribuída em seis vasos com capacidade de 3,6 kg contendo uma camada de seixo ao fundo para facilitar a drenagem. Em cada vaso, foram semeadas cinco sementes de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Wald] (variedade Crioula-INPA), as quais foram cedidas pelo Laboratório de Sementes de Genética e Melhoramento de Hortaliças do INPA/AM. Como tratamento controle foram estabelecidos seis vasos sem sementes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e o experimento foi conduzido em casa de vegetação, localizada no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus – AM.

Aos 15 dias após a germinação foi realizado o desbaste deixando apenas duas plantas por vaso e aos 45 dias, no período de florescência, procedeu-se a coleta dos solos rizosféricos e do solo dos vasos controle (sem plantas) (Figura 3.3). As amostras dos solos da rizosfera de cada planta foram coletadas com a ajuda de um pincel de cerdas firmes previamente autoclavado. De cada vaso foram retiradas três amostras de solos de 0,25 g que foram armazenadas em tubos de

eppendorf de 2 ml e mantidas à -20 °C até o momento da extração do DNA. Para análise química foram coletados três amostras para cada tipo de solo (rizosférico e não rizosférico).

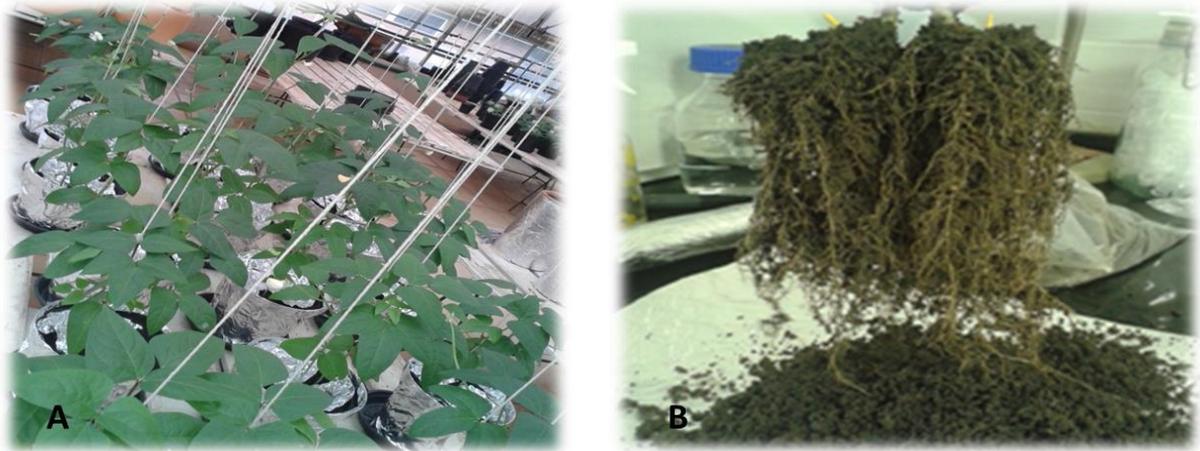


Figura 3.3 (A) Experimento em casa de vegetação com feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) (B) solo aderente às raízes do feijão caupi.

3.2.3 Extração de DNA genômico das amostras de solos

O presente experimento foi conduzido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, CENA/USP, Piracicaba-SP. A extração do DNA foi realizada com *Kit Power lyzie DNA ExtractionTM* (MoBio, Carlsbad, CA). Em microtubo com esferas de vidro foram adicionados 0,25 g de solo, agitado levemente no vórtex para homogeneização da amostra. Em seguida, o DNA foi extraído de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A qualidade da extração e integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% (p/v), em tampão TSB 1x corado com GelRedTM (Biotium) (1,5 μL 50 mL^{-1} de gel), carregado com 1 μL do DNA adicionado de 1 μL de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicose). Como padrão de tamanho de banda de DNA utilizou-se *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen). Após 30 minutos de eletroforese a 90 Volts, os géis foram observados sob luz ultravioleta e registrados em transiluminador L.PIX (Loccus Biotecnologia, São Paulo – SP).

3.2.4 Amplificação dos genes 16S rRNA e *phzF* PCR quantitativo

A reação de amplificação para o gene 16S rRNA bacteriano foi realizada utilizando os *primers* para o domínio *Bactéria* U968F e R1387 (Heuer *et al.* (1997), que amplificam um fragmento de aproximadamente 400 pb. Para amplificação do gene *phzF* utilizou-se os *primers* Ps_up1 e Ps_low1 amplificando 427 pb (Tabela 1). As reações de PCR quantitativo foram realizadas em um volume total de 10 µL contendo 5 µl Kit SYBR Green Rox qPCR (Fermentas Brasil), 1,0 µL de cada *primer* a (5 pmol), 2 µL de água do Kit SYBR Green e 1 µl do produto do controle positivo que foi purificado com o kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). E para amplificação do gene *phzF* utilizou-se os *primers* Ps_up1 e Ps_low1, os quais geram um fragmento de 427 pb (Tabela 2). As reações de PCR quantitativo foram realizadas em um volume total de 10 µL contendo 5 µL Kit SYBR Green Rox qPCR (Fermentas Brasil), 1,0 µL de cada *primer* a (5 pmol) 2 µL de água do Kit SYBR Green e 1 µL do produto purificado 50 ng e o DNA total do solo. As condições de amplificação do gene 16S rRNA foram 5 minutos a 95 °C, 30 segundos a 95 °C, 45 segundos a 56 °C, 1 minuto a 72 °C e 35 ciclos de 72 °C por 7 minutos. Para o gene *phzF* foram otimizadas as seguintes condições: 4 minutos a 94 °C, 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 62 °C, 45 segundos a 72 °C, 10 minutos a 72 °C. As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlusTM Real- Time PCR System (*Applied Biosystems*).

Tabela 1 - *Primers* utilizados nas reações PCR quantitativo em tempo real na amplificação parcial do gene 16S rRNA bacteriano (U968F e R1387) e do gene fenazina (Ps_up1 e Ps_low1)

<i>Primers</i>	Sequências (5' - 3')	Fragmento (pb)	Temperatura de <i>Melting</i> (°C)	Referências
U968F	AACGCGAAGAACCTTAC			
R1387	CGGTGTGTACAAGCCCCGGGAACG	~400	56	HEUER <i>et al</i> (1997)
Ps_up1	ATCTTCACCCCGGTCAACG			
Ps_low1	CCRTAGGCCGGTGAGAAC	~427	62	Mavrodi <i>et al</i> (2010)

3.2.5 Construção da curva padrão

Para a construção da curva padrão foram utilizados DNAs genômicos das bactérias padrões descritas no estudo anterior. O produto de PCR do controle positivo foi purificado, Kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), seguindo-se as instruções do fabricante e quantificado no espectrofotômetro modelo ND-2000 (Nanodrop Technologies,

Waltham, EUA) para calcular o número de cópias de genes em μL^{-1} com base no número de pares de bases. As curvas padrão foram construídas utilizando 10 diluições em série, variando de 10^2 a 10^6 cópias de gene. μL^{-1} . A amplificação das amostras de solos e da curva padrão por PCR quantitativo foi realizada em triplicatas (réplicas técnicas) para avaliar a confiabilidade da quantificação.

3.2.6 Amplificação do gene 16S rRNA de *Bactéria* pela análise por T-RFLP

A partir das amostras de DNA dos solos rizosféricos e não rizosféricos foi realizada a amplificação do gene 16S rRNA de *Bactéria*. A reação de amplificação foi feita utilizando o conjunto de *primers*: 27F e 1492R (Ewards *et al.* 1989; Woese *et al.* 1990) (Tabela 2). Para posterior detecção dos *amplicons* utilizando a técnica de T-RFLP em sequenciador automático o *primer* 27F foi marcado com 6-carboxyfluorescein (6-FAM) na extremidade 5'.

Tabela 2 - *Primers* da região 16S rRNA utilizados nas reações de T-RFLP

<i>Primers</i>	Sequências (5' - 3')	Fragmento gerado (pb)	Referência
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	~1500	EDWARDS <i>et al.</i> 1989
1492R	TACGGYTACCTTGTACGACTT		WOESE <i>et al.</i> 1990

Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o Kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram utilizados nas reações de restrição as enzimas *MspI*. Os produtos digeridos foram precipitados adicionando 2 μL de tampão Acetado de Sódio/EDTA e 60 μL de etanol no microtubo contendo 15 μL do produto da digestão, em seguida foi agitado levemente no vórtex para homogeneizar e centrifugado por 20 minutos a 12.000 xg. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 150 μL de etanol a 70%, recém-preparado. As amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 xg por 5 minutos. O sobrenadante descartado e o precipitado foram secos em concentrador de eppendorf (Concentrador 5401) a 45 °C por 10 minutos. Para a análise dos T-RFs, o produto de digestão precipitado foi ressuscitado em formamida Hi-Di e padrão de comprimento

GeneScan 500 ROX (*AppliedBiosystems*). A determinação do comprimento dos Fragmentos Terminais de Restrição (T-RFs) foi realizada no sequenciador capilar automático modelo ABI PRISM 3130 XL *GeneticAnalyzer* (*AppliedBiosystems*).

Os dados de T-RFLP foram analisados a partir dos arquivos gerados pelo programa *Data Collection Software* do sequenciador, no programa Peak Scanner v 1.0 (*Applied Biosystems*) para determinação do comprimento dos fragmentos terminais de restrição através de comparação com os fragmentos do padrão de comprimento (Trotha *et al.* 2002). Os dados foram exportados para uma planilha eletrônica Excel (*Microsoft*) sendo convertidos em uma matriz, onde cada coluna representa uma amostra e cada linha representa um tamanho de T-RFs específico. Essa matriz foi utilizada para posterior análise multivariada. A avaliação da estrutura das comunidades de bactérias obtidas pelos perfis de T-RFLP foi realizada pela análise em escala multidimensional (*multidimensional scaling*, MDS), utilizando o coeficiente de similaridade de *Bray-Curtis*. Posteriormente, uma análise de similaridade (ANOSIM) foi realizada para determinar diferenças estatísticas entre as amostras estudadas (Clarke 1993).

3.2.7 Análises estatísticas

Os dados químicos e biológicos foram analisados no programa *ASSISTAT* 7.6 (Silva 1996) utilizando ANOVA. A análise de comparação de médias foi realizada pelo Teste de Tukey. Os dados de PCR quantitativo, quando necessário, foram transformados em \log^{10} ou raiz quadrada.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Análise química do solo

No presente estudo foram analisadas algumas propriedades químicas dos solos rizosféricos e não rizosféricos de Feijão Caupi cultivado em TPA. Com base na caracterização dos atributos químicos, os resultados indicaram formas bem variadas das duas amostras de solos. Os solos rizosféricos apresentaram menores valores no teor dos atributos avaliados em relação aos não rizosféricos (Tabela 3).

Tabela 3. - Atributos químicos dos solos rizosféricos e não rizosféricos do feijão caupi cultivada em TPA.

Amostras de solos	Atributos químicos								
	pH	M.O	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	Fe
Solos rizosféricos	5,3±0,47a *(8,81%)	49,3±7,7a *(15,74%)	355,6±125,2a *(35,43%)	1,33±0,97a *(72,84%)	102,33±37,8a *(36,98%)	7,0±1,73a *(24,74%)	41,3±14,3a *(34,75%)	110,6±39,5 ^a *(35,79%)	87,3±31,4b8 ^{**} *(36,03%)
Solo bulk	5,2±0,28a *(5,44%)	53,1±2,6a *(4,99%)	505,0±88,6a *(17,43%)	1,06±0,35a *(33,67%)	138,33±7,63a *(5,52%)	13,6±3,05 *(22,35%)	48,6±5,77a *(11,86%)	153,0±5,3a *(3,52%)	210,6±36,5a *(17,35%)

Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Alumínio (Al), potencial de acidez (H+Al), (SB) soma de bases e (CTC) capacidade de troca catiônica são representados em mmolc/dm⁻³; (MO) matéria orgânica em g/dm⁻³; o fósforo em mg/dm⁻³ e pH em CaCl₂. Os valores das médias nas colunas seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($P \geq 0,05$); ** significativo ao nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$) o segundo valor corresponde ao desvio padrão das médias e * Coeficiente de variação.

Para o pH foi observado um leve aumento nos solos rizosféricos sugerindo que a rizosfera do feijão possa ter estimulado este aumento. O pH é um dos fatores mais alterados na rizosfera devido aos exsudatos liberados pelas raízes; assim, diferindo do solo bulk, sua estabilidade pode interferir na diversidade de micro-organismos (Moreira e Siqueira 2006). Os resultados também demonstram que os valores dos atributos analisados como P, Ca, Mg e Fe foram menores no solo com influências das raízes das plantas em relação ao não rizosféricos, sugerindo que a rizosfera possa apresentar uma diversidade de bactérias solubilizadora. Moreira e Siqueira (2006) demonstram que micro-organismos solubilizadores parecem ser mais abundantes na rizosfera associados à excreção de ácidos orgânicos que favoreçam a nutrição das plantas.

O micronutriente ferro (Fe) apresentou diferença significativa entre os solos rizosféricos e solo bulk. Uma hipótese para este resultado é que as bactérias presentes na rizosfera de feijão caupi possam estar captando o Fe para seu metabolismo. O Fe está presente em grande quantidade nos solos, mas sua grande maioria é encontrada na forma de hidróxido férrico $\text{Fe}(\text{OH})_2$, indisponível para as plantas. Dessa forma, as bactérias desenvolvem uma estratégia para uma captação eficiente através de secreção de compostos orgânicos quelantes de ferro (Fe^{+3}) chamados de sideróforos, tornando disponível para seu metabolismo e também para as plantas (Buyer *et al.* 1993; Raaijmakers *et al.* 1995).

Os sideróforos são peptídeos de síntese não ribossômica com altíssima afinidade por ferro, de baixo peso molecular, produzidos e secretados por micro-organismos, incluindo as bactérias presentes na rizosfera, que auxiliam no crescimento das plantas. Esses micro-organismos podem aumentar a disponibilidade de ferro para a planta e ao mesmo tempo inibem a colonização dos patógenos próximos das raízes (Luca *et al.* 1988; Neerlands 1984). Estudos realizados por Fedrizzi, (2006), por meio de bioprospecção, detectou a presença de sideróforos e de compostos antimicrobianos ativos em amostras de solo de terra preta da Amazônia.

3.3.2 Extração de DNA genômico das amostras de solos

As extrações de DNA genômico das amostras de solos foram realizadas e sua qualidade foi verificada em gel de agarose 1%, utilizando como padrão molecular 2 μL de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen, Brasil). (Figura 3.4).

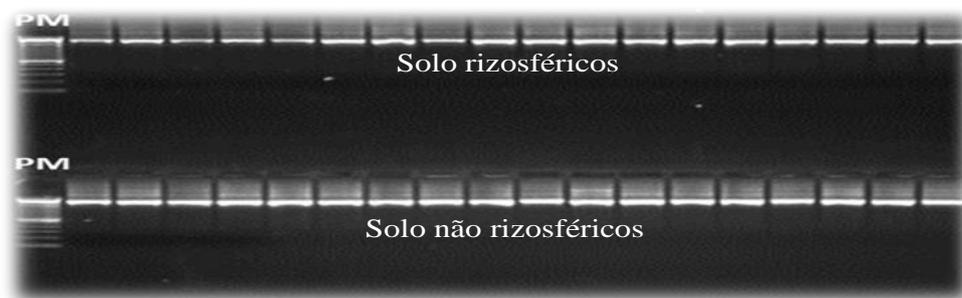


Figura 3.4 Gel resultante da extração do DNA genômico das amostras de solos rizosféricos e não rizosféricos do feijão caupi PM: padrão de peso molecular 100 pb DNA *Mass Ladder*TM (Invitrogen Life Technologies)

3.3.3 PCR quantitativo (qPCR)

As análises de PCR quantitativo foram realizadas para obtenção do número de cópias do gene 16S rRNA bacteriano e do gene *phzF* nas amostras de solos de TPA. A técnica foi precisa na detecção do número de cópias dos genes, permitindo a comparação das frequências entre as amostras de solos estudadas. As informações dos controles positivos que foram utilizados para construção da curva padrão estão citadas no capítulo anterior. Todas as diluições apresentaram o coeficiente de correlação satisfatória para o uso da curva de calibração, e os valores da curva de amplificação das amostras de solos deste estudo estão descritos na (Tabela 4).

Tabela 4. Valores da curva de *Melting* na amplificação dos genes 16S rRNA bacteriano e *phzF* nas amostras de solos obtidos pela análise das reações de PCR quantitativo

Gene	Correlação (R ²)	Eficiência (%)	TM da curva padrão (°C)
16S rRNA	0,996	87,22	90,1
<i>phzF</i>	0,999	101,42	84,76

Para esta reação, foram feitas diluições seriadas 10^{10} a 10^2 cópias de gene μL^{-1} , entretanto, foram utilizadas as diluições de 10^6 a 10^2 nas reações de PCR quantitativo para elaboração da curva padrão de *Melting*, com três repetições para cada diluição (réplicas técnicas).

3.3.4 Análise do gene 16S rRNA bacteriano nas amostras de solos

As análises de PCR quantitativo demonstraram que para o solo de floresta, o número de cópias do gene 16S rRNA bacteriano foi menor nos solos rizosféricos ($3,85 \times 10^9$ cópias.g solo) quando comparado com o não rizosférico ($3,94 \times 10^9$ cópias.g solo⁻¹). Para o ambiente solo agrícola foi observado 1,25 vezes mais número de cópias gene nos solos rizosféricos ($3,51 \times 10^8$ cópias.g solo⁻¹) do que nos solos não rizosféricos ($2,79 \times 10^8$ cópias.g solo⁻¹). Não houve diferenças significativas entre os solos rizosféricos e não rizosféricos (Figura 3.5), porém quando se comparou os ambientes, a quantidade do número do gene bacteriano foi maior na floresta para ambos os solos, configurando uma alta diversidade de bactérias nesse ambiente.

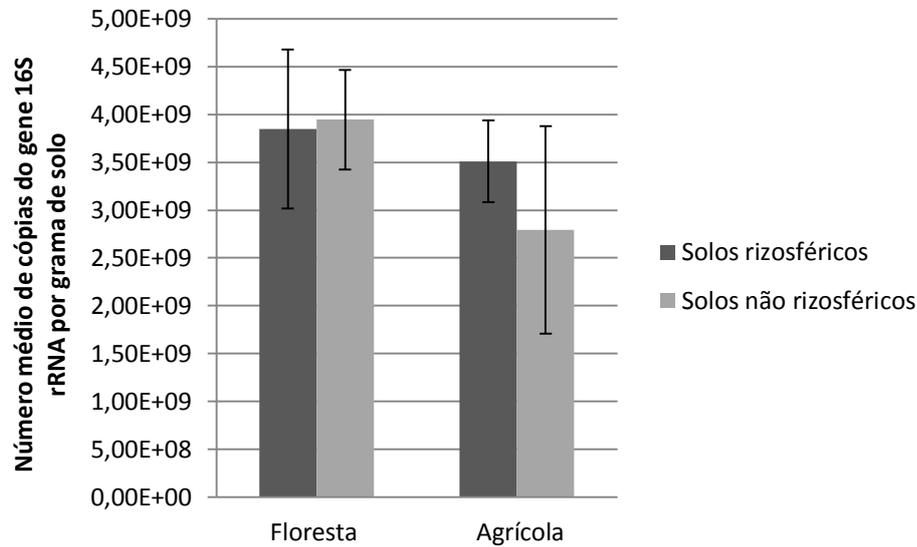


Figura 3.5 Número médio de cópias do gene 16s rRNA bacteriano determinado por PCR quantitativo. As amostras referem-se a solos rizosféricos de feijão caupi cultivada em solos de terra preta da Amazônia coletado em dois ambientes (floresta e agrícola). Barras na vertical representam erro padrão

Os resultados sugerem que, as condições químicas, físicas e biológicas do ambiente da rizosfera do feijão caupi possam ter favorecido a incorporação de grupos de bactérias específicas. Lima (2012) estudando a diversidade das comunidades bacterianas observou, que a rizosfera apresentou menor riqueza e diversidade nas comunidades bacterianas em duas espécies de leguminosas cultivadas em TPA.

O efeito da rizosfera sob os micro-organismos é mais acentuado nas bactérias. As plantas liberam para o ambiente externo íons, gases, aminoácidos e açúcares que estimulam tanto a presença como a ausência de grupos bacterianos específicos. Também no ambiente da rizosfera, a temperatura e estresse nutricional pode afetar diretamente sua composição próxima das raízes (Alexander 1977; Compant *et al.* 2005; Moreira e Siqueira 2008). Contudo, estes autores sugerem estudos direcionados a esses grupos da diversidade bacteriana presentes no ambiente da rizosfera de plantas cultivadas em solos de TPA, considerando a possibilidade de isolar e caracterizar espécies bacterianas por meio de métodos dependentes e independentes de cultivos, principalmente para produção de metabólitos secundários.

No entanto, na identificação da diversidade de genes específicos para processos que estão ligados à biossíntese de compostos secundários, a caracterização de genes funcionais em solos TPA pode gerar informação sobre a influência da microbiota no equilíbrio da fertilidade e qualidade biológica desse solo (Germano *et al.* 2011).

3.3.5 Análise do gene *phzF* na biossíntese

O resultado da detecção e quantificação do gene *phzF* envolvido na biossíntese do composto fenazina é fundamentado na técnica de PCR quantitativo, que permitiu observar a frequência do gene nos ambientes estudados. Os resultados demonstram que, para o solo coletado em ambiente de floresta secundária, após cultivo do feijão caupi, solos rizosféricos apresentaram 1,26 vezes mais o número de cópias do gene ($3,11 \times 10^8$ cópias.g de solo⁻¹) em relação aos solos não rizosféricos ($2,46 \times 10^8$ cópias.g de solo⁻¹), não apresentando diferenças significativas de probabilidade. Para solo agrícola o número de cópias do gene foi maior nos solos rizosféricos ($4,82 \times 10^8$ cópias.g solo⁻¹), em conferência aos solos não rizosféricos ($2,75 \times 10^8$ cópias.g de solo⁻¹) (Figura 3.6).

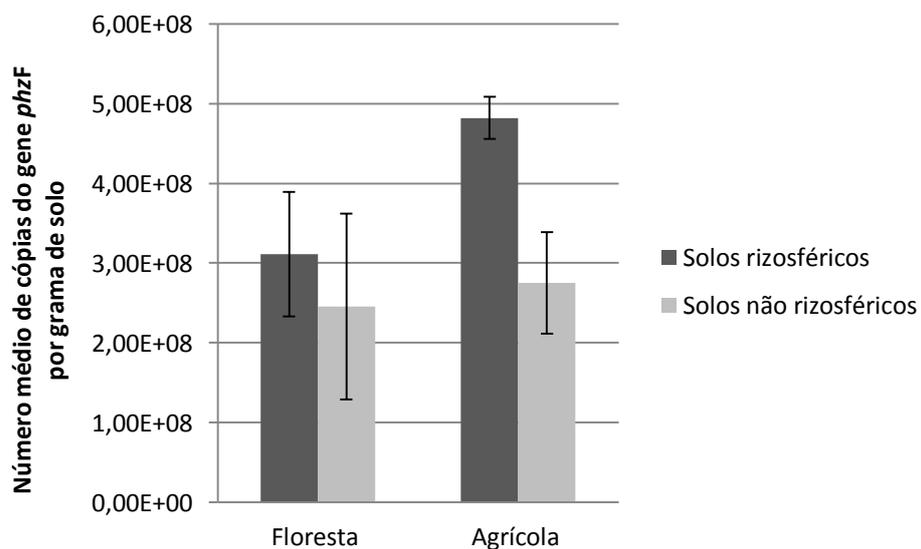


Figura 3.6 Número médio de cópias do gene *phzF* determinado por PCR quantitativo. As amostras referem-se a solos rizosféricos de feijão caupi cultivada em solo de terra preta da Amazônia coletado em dois ambientes (floresta e agrícola). Barras na vertical representam erro padrão.

O resultado da análise sugere que, o ambiente da rizosfera do feijão caupi possa estar agregando grupos específicos de bactérias que contêm a presença do gene *phzF*. Segundo Mavrodi *et al.* (2010) estudando a evolução e dispersão do gene *phzF* em amostras de solos rizosférico, evidenciou a diversidade de bactérias produtoras de fenazina, sugerindo ainda que, a maioria parecem estar associadas às plantas e que o mecanismos de conservação do gene varia nos gêneros *Pseudomonas* spp. para a transferência horizontal de genes em *Burkholderia* spp. e *Pectobacterium* spp. A diversidade genotípica dentro de um grupo de micro-organismos que compartilham a mesma característica antagônica fornece um recurso largamente inexplorado para melhorar o controle biológico de patógenos de solo. (Raaijmakers e Weller 2001; Wang *et al.* 2001; Weller *et al.* 2002).

A detecção da diversidade do gene *phzF* no ambiente natural possibilita compreensão específica e regulação destes processos por alguns grupos de bactérias que são relevantes para a produção de biocompostos naturais *in vitro*. Os resultados deste estudo propiciam subsídios com a finalidade de aperfeiçoar técnicas para isolar e caracterizar bactérias produtoras de fenazinas em diversos sistemas do solo, como o ambiente da rizosfera de plantas. Acredita-se que, a rizosfera proporcione condições ideais de estímulos à ativação de compostos bioativos por bactérias como, por exemplo, a fenazina, e esta pode ser sintetizada e mediada pela autodefesa desses micro-organismos contra fitopatógenos.

3.3.6 Análise de polimorfismo dos fragmentos terminais de restrição (T-RFLP)

A análise de T-RFLP foi realizada para acessar os perfis das comunidades bacterianas nos solos rizosféricos do feijão caupi, comparando com os solos não rizosféricos (solo bulk), coletados nos ambientes floresta e agrícola, com base em T-RFs separados pelo gene marcador rRNA 16S bacteriano entre as amostras de solos.

3.3.7 Escala multidimensional (MDS)

Com base na discriminação automatizada dos T-RFs foram realizados agrupamentos usando a análise de MDS. A MDS é uma técnica de ordenação utilizada em análises ecológicas que tem por objetivo descrever a estrutura de uma matriz complexa, reduzindo a

dimensionalidade da matriz de dados e ordenando os objetos num gráfico. A análise de MDS dos perfis de T-RFs foi feita nas amostras de solos rizosféricos sob influência das raízes do feijão caupi e não rizosféricos (solo bulk), coletados nos ambientes floresta e agrícola conforme apresentado na (Figura 3.7). A representação bidimensional da análise foi validada por níveis de *Stress* 0,06 e 0,01 diferenciando visivelmente a estrutura da comunidade bacteriana.

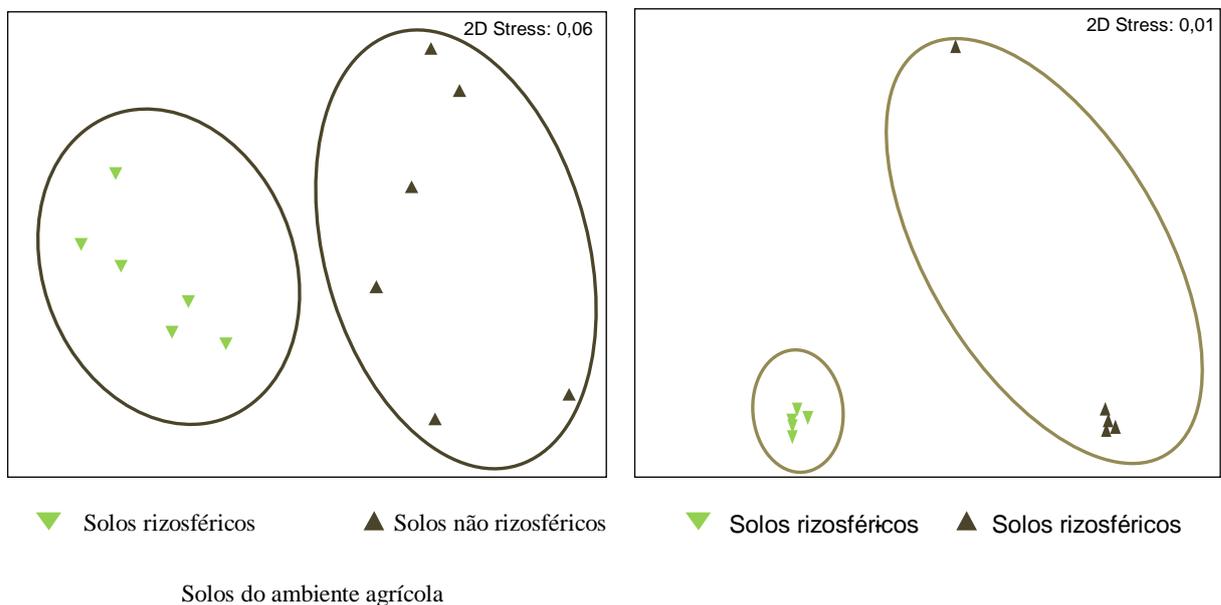


Figura 3.7 Análise sobre o escala multidimensional (MDS), com base em T-RFs separado pelo rRNA 16S de bactérias entre as amostras de solos.

Os resultados revelaram agrupamentos ao nível de similaridade de 55% entre as amostras estudadas, mostrando ainda alta similaridade entre as réplicas biológicas. Observa-se que as raízes do feijão influenciaram consideravelmente na estrutura da comunidade bacteriana. Considera-se também que, as características gerais de cada ambiente (floresta e agrícola) podem ter moldado o perfil da estrutura das comunidades bacterianas. Estudos realizados por Lima (2012), com amostras de solos rizosféricos (TPA) e controle, demonstraram em análise de ordenação MDS, a partir dos dados de T-RFLP, que a rizosfera de duas espécies de leguminosas juntamente com as propriedades do solo moldaram a estrutura das comunidades bacterianas.

A análise de ordenação MDS mostrou claramente uma diferença das comunidades bacterianas entres as amostras de solos. Essa diferença estrutural pode estar relacionada às

diferentes características de cada solo e principalmente pela influência das raízes do feijão caupi. A interação entre plantas e bactérias é coordenada por processos metabólicos presentes tanto em plantas como nas bactérias, ocorrendo um reconhecimento mútuo viabilizando o estabelecimento da interação (Andreote 2007). Além disso, as bactérias respondem diferentemente aos compostos liberados pelas raízes (Melo e Azevedo 2008), em consequência das propriedades dos solos que influem fortemente na estrutura das comunidades bacterianas (Jesus *et al.* 2009).

Para testar a diferença na composição das comunidades bacterianas entre as amostras de solos (rizosférico e não rizosférico), foi utilizado a análise de similaridade ANOSIM. O ANOSIM é um teste estatístico baseado em permutação, análogo ao teste ANOVA, que avalia a diferença entre grupos de amostras de diferentes ambientes e tratamentos experimentais (Yannarell e Triplett, 2004; Danovaro *et al.* 2006). O teste foi calculado com base no coeficiente de similaridade de Bray-Curtis, utilizando o programa *Primer 6 (Plymouth Marine Laboratory, Primer E, Reino Unido)*. Os resultados apresentaram valores de R global acima de 0,830 para as amostras de solos rizosféricos e não rizosféricos do ambiente agrícola e 0,704 para as amostras de solos rizosféricos e não rizosféricos do ambiente floresta sendo estatisticamente diferente em nível de $p \leq 0,05$ pelo teste do ANOSIM.

3.3.8 Análise de Cluster entre as amostras de solos

Foi possível observar, a partir dos perfis gerados pela análise de T-RFPL, diferenças na estrutura das comunidades bacterianas entre a rizosfera do feijão caupi e os solos não rizosféricos (bulk), assim como, entre as áreas dos quais foram coletados (floresta e agrícola). O uso da enzima *MspI* proporcionou analisar e representar melhor os perfis. Os resultados também demonstraram que, para o ambiente de agricultura houve semelhança na densidade das comunidades, tanto para os solos rizosféricos quanto para os não rizosféricos (solo bulk), inferindo assim, que este ambiente influenciou nesta composição (Figura 3.8A). Para o solo do ambiente floresta nota-se que a rizosfera do feijão foi mais homogênea que o solo não rizosféricos (Figura 3.8B), e também foi observado maior agrupamento entre as amostras. Estudos semelhantes com solos da região amazônica mostraram que as comunidades

bacterianas foram influenciadas pelo uso da terra, características químicas e vegetação (Jesus *et al.* 2009; Cannavan 2011; Lima 2012).

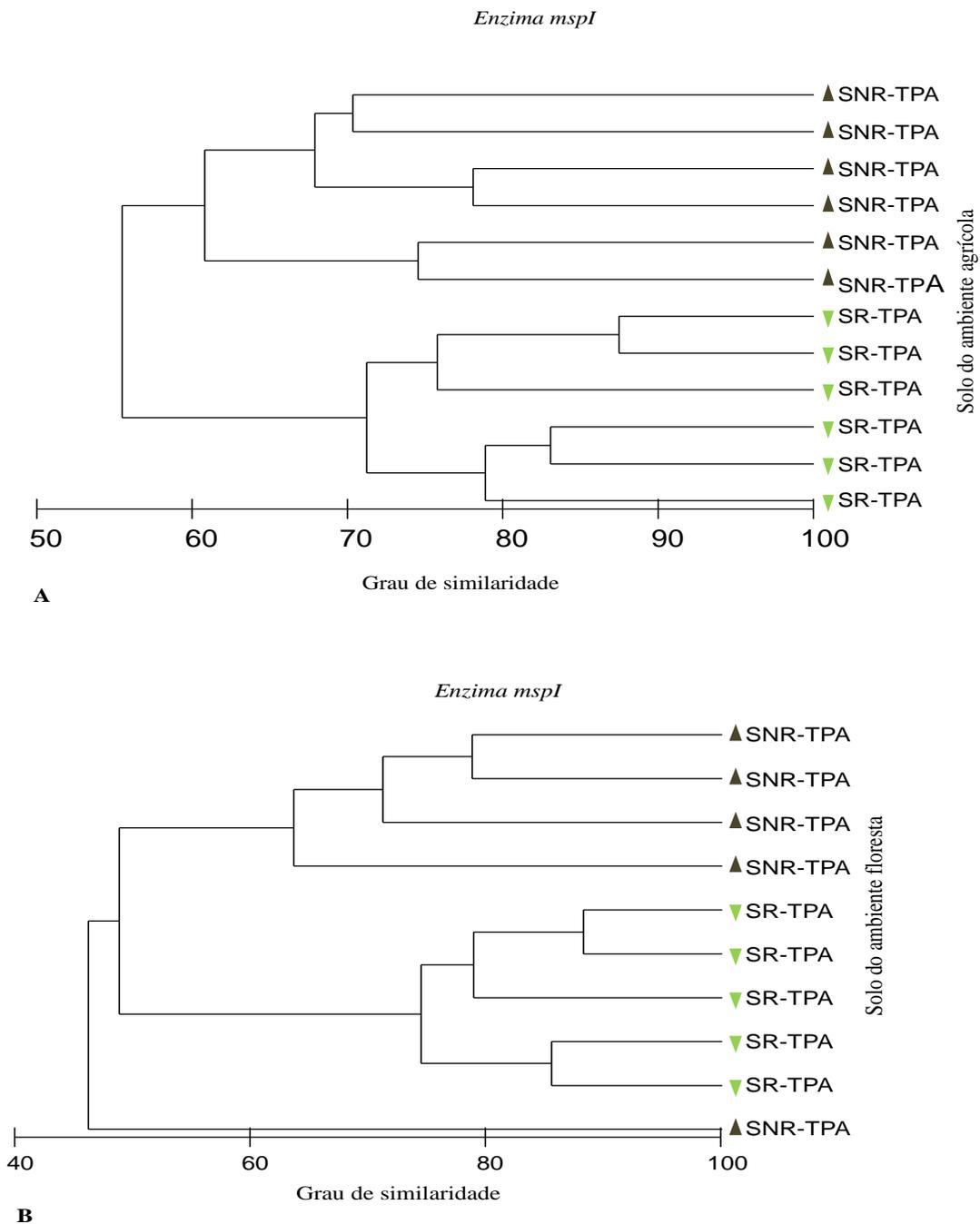


Figura 3.8 Agrupamento por similaridade entre as amostras de ▼ solos rizosféricos de terra preta da Amazônia (SR-TPA) e ▲ não rizosféricos de terra preta da Amazônia (SNR-TPA) coletados em ambientes, agrícola e floresta, obtidos através da segmentação da enzima *MspI*, a partir da análise de CLUSTER no programa *Primer6* (Plymouth Marine Laboratory, PrimerE, Reino Unido).

A caracterização das comunidades bacterianas em ambientes rizosféricos podem contribuir para estudos futuros, relacionados à qualidade do solo e funcionalidade destes micro-organismos no ambiente como, fixação biológica do nitrogênio, biorremediação, produção de plásticos biodegradáveis, controle de doenças em plantas e supressão de patógenos do solo (Bettiol *et al.* 2005). Com este estudo agregam-se informações sobre a estrutura das comunidades bacterianas em amostras de solos rizosféricos de plantas cultivadas em terra preta da Amazônia.

3.4 Conclusões

O gene *phzF* foi detectado em solos rizosféricos de feijão caupi por meio da técnica de PCR quantitativo. Os resultados demonstram que o número de cópias do gene *phzF* foram maiores nos solos rizosféricos para os dois ambientes nos quais as amostras de solos foram coletadas. O maior número de cópias do gene 16S rRNA bacteriano foi encontrado no solo não rizosférico coletado no ambiente floresta o que ressalta a diversidade bacteriana deste ambiente. A técnica de T-RFLP foi eficiente para definir o perfil das estruturas das comunidades bacterianas em solos rizosféricos de feijão caupi e solo bulke.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, M. 1977. *Introduction to soil microbiology*. New York: John Wiley e Sons, 467pp.
- Andreote, F.D. 2007. *Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas*. Tese de doutorado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, São Paulo. 201pp.
- Bettiol, W.; Ghini, R.; Morandi, M.A.B. 2005. *Alguns métodos alternativos para o controle de doenças de plantas disponíveis no Brasil*. In: Venzon, M.; Junior, T.J. Palline, A. (Coord.). Controle alternativo de pragas e doenças. EPAMIG/CTZM: UFV. p.163-183.
- Buyer, J.S.; Kratzke, M.G.; Sikoga, L.J. 1993. A method for detection of pseudobactin, the siderophore produced by a plant-growth-promoting *Pseudomonas* strain, in the barley rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 677-681.
- Cannavan, F.S. 2011. *A estrutura e composição de comunidades microbianas (Bactéria e Archaea) em fragmentos de carvão pirogênico de terra preta de índio da Amazônia Central*. Tese de doutorado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, São Paulo. 105pp.
- Clarke, K.R. 1993. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, Canberra, 18:117-143.
- Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clement, C.; Barkal, E.A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 4951–4959.
- Danovaro, R.; Luna, G.M.; Dell'anno, A.; Pietrangeli, B. 2006. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intragenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 72: 5982-5989.
- Edwards, U.; Rogall, T.; Blocker, H.; Emde, M.; Bottger, E.C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, London, 17: 7843-7853.
- Fedrizzi, S.M.G. 2005. *Produção de metabolitos antimicrobianos e sideróforos de isolados provenientes de terra preta antropogênica da Amazônia Ocidental*.

- Dissertação de mestrado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, São Paulo. 115pp.
- Germano, M.G.G. 2011. *Diversidade funcional em solos de terra preta de índio da Amazônia e carvão pirogênico*. Tese de doutorado do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, São Paulo. 187pp.
- Gessard, C. 1882. Sur les colorations bleu vert des lignes a pansements Comptes Rendus de l'Académie des sciences. Paris, 94: 536-68.
- Hunter-Cevera, J. C. 1998. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*, London, 1: 278-285.
- Heuer, H.; Krsek, M.; Baker, P.; Smalla, K.; Wellington, E.M.H. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gelelectrophoresis separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 63: 3233–3241.
- Jesus, E.C.; Marsh, T.L.; Tiedje, J.M.; Moreira, F.M.S. 2009. Changes in land use alter structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *The ISME Journal*, New York, 3: 1004-1011.
- Laursen, J.B.; Nielsen, J. 2004. Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chemical Reviews*, Baltimore, 104: 1663-1685.
- Lima, A.B. 2012. *Influência da cobertura vegetal nas comunidades bacterianas em terra preta de índio na Amazônia Central brasileira*. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. 116pp.
- Lima, H. N.; Benites, V.M.; Shaefer, C.E.R.; Mmelo, J.W.V.; Ker, J.C. 2001. Caracterização de ácidos húmicos extraídos de terra preta de índio. In: *Encontro brasileiro de substâncias húmicas*, Viçosa. Resumos. Viçosa: Departamento de Solos, UFV. 155-156.
- Luca, De N.G.; Wexler, M.; Pereira, M.J.; Yeoman, K.H.; Johnston, A.W.B. 1988. Is the fur gene of *Rhizobium leguminosarum* essential. *FEMS microbiology Letters*, Amsterdam, 168: 289-295.
- Mavrodi, D.V.; 2010. Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 866–879.

- Melo, I.S.; Azevedo, J.L. 2008. *Microbiologia Ambiental*. In: Melo, I.S. (Ed.). *Importância da rizosfera da biodegradação de xenobióticos*. Empresa brasileira de pesquisa agropecuária, Jaguariúna, São Paulo, p. 589-609.
- Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. 2006. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2. ed. Lavras: UFLA, Minas Gerais, 729p.
- Neilands, J.B. 1984. Siderophore of bacteria and fungi. *Microbiological Sciences*, Oxford, 1: 9-14.
- Raaijmakers, J.M.; Leeman, M. Van Oorschot, M.M.P.; Van der Sluis, I.; Schippers, B.; Bakker, P.A.H.M. 1995. Dose response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 85: 1075–1081.
- Raaijmakers, J.M, Weller, D.M, Thomashow, L.S. 2001. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied Environmental Microbiology*, 63: 881–887.
- Silva, F.A.S. 1996. The ASSISTAT Software Statistical Assistance In: Sixth International Conference on Computers in Agriculture, Cancun, Mexico: *Annals of the American Society of Agricultural Engineers*, 1: 294 – 296.
- Smirnov, V. V.; Kiprianova, E. A. 1990. Bacteria of *Pseudomonas* Genus. Kiev, Ukraine: Naukova Dumka. Pp 100-111.
- Trotha, R., U. Reichl, F.L. Thies, D. Sperling, W. König, and B. König. 2002. Adaptation of a fragment analysis technique to an automated high-throughput multicapillary electrophoresis device for the precise qualitative and quantitative characterization of microbial communities. *Electrophoresis*, 23:1070–1079
- Yannarell, A.C.; Triplett, E.W. 2004. Within- and between-lake variability in the composition of bacterioplankton communities: investigations using multiple spatial scales. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 70: 214-223.
- Weller, D. M.; Raaijmakers, J. M.; Mcspadden-Gardener B. B.; Thomashow, L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 309–348.
- Woese, C.R.; Kandler, O.; Wheelis, L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya*. *Proceedings of National Academy of Science of the USA*, Washington, DC, 87: 4576-4579.

