

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

LINA CHUAN WONG

**Identificação e quantificação do gene pirrolnitrina (*prnD*) em Terra Preta
Antropogênica da Amazônia por PCR em tempo real**

Piracicaba

2011

LINA CHUAN WONG

Identificação e quantificação do gene pirrolnitrina (*prnD*) em Terra Preta Antropogênica da Amazônia por PCR em tempo real

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro

Piracicaba

2011

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Wong, Lina Chuan

Identificação e quantificação do gene pirrolnitrina (prnD) em Terra Preta Antropogênica da Amazônia por PCR em tempo real / Lina Chuan Wong; orientadora Regina Teresa Rosim Monteiro. - - Piracicaba, 2011.

91 p.: il.

Dissertação (Mestrado – 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.

1. Antibióticos 2. Bactérias 3. Biologia molecular 4. Biotecnologia
5. Controle biológico 6. Fungos fitopatogênicos 7. Microbiologia do solo
I. Título

CDU 631.463:577.2

DEDICO

Aos meus pais

A minha irmã e

Ao meu irmão

pelo amor, apoio, incentivo e por estarem sempre ao meu lado

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro pela orientação e auxílio no trabalho;

A Profa. Dra. Siu Mui Tsai pelos conselhos, ajuda e estímulo para execução deste trabalho e por toda compreensão;

A minha família (papai, mamãe, minha irmã e meu irmão) pelos conselhos, pela paciência e compreensão;

Ao Tetsuo pelo incentivo, apoio, paciência e compreensão;

Ao curso e aos funcionários da pós-graduação do CENA;

A CAPES pela bolsa concedida;

Aos amigos do laboratório: Acácio, Ademir, Amanda, Ana Beraldo, Aline, Aline Borges, Bianca (Manaus), Bia Furlan, Bia Ferrari, Caio, Clovis, Dani, Dennis, Enéas, Ézio, Fabi, Felipe, Fernanda, Gustavo, Janne, Naíssa, Lilian, Lucas, Mari Germano, Maju, Marília, Milena, Monita e Rodrigo por me auxiliaram no trabalho e pelas companhias em almoço e momentos de descontração;

Aos técnicos do laboratório: José Elias Gomes, Fábio Duarte e Wagner Picinini pela ajuda e carinho;

A Lud pelas ajudas e pelo carinho;

A bibliotecária Marília R. G. Henyei pelo auxílio na adequação do trabalho de acordo com as normas;

A todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram na elaboração deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“Se quiser ser feliz por uma hora, tire uma soneca;
por um dia, vá pescar;
por um mês, case-se;
por um ano, herda uma fortuna;
para a vida inteira, ajude os outros”.

(Provérbio chinês)

RESUMO

WONG, L. C. **Identificação e quantificação do gene pirrolnitrina (*prnD*) em Terra Preta Antropogênica da Amazônia por PCR em tempo real**. 2011. 91 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

A Terra Preta Antropogênica (TPA) é considerada um dos solos mais férteis do mundo e recebe essa denominação por ser originada da ação antrópica, provavelmente de populações pré-colombianas que viveram nestes sítios arqueológicos. O crescente aumento por agricultura sustentável torna a utilização de bactérias produtoras de antibióticos uma alternativa de controle para doenças de plantas. Pirrolnitrina (PRN) é um antibiótico que tem ampla atividade antimicrobiana produzida por várias estirpes de *Burkholderia* e *Pseudomonas* que foram isoladas de diferentes solos. Entretanto, não se tem conhecimento de isolados bacterianos de TPA que produzem PRN, assim com, sobre a ecologia e frequência do gene para este antibiótico. A PRN é codificada por um operon composto por 4 genes sendo o gene *prnD* responsável por catalisar a oxidação que forma a pirrolnitrina. Neste trabalho, foi estudado o gene *prnD* através de métodos dependente e independente de cultivo. Foram utilizados isolados bacterianos para detectar o gene *prnD* através de PCR convencional e a identificação feita pelo seqüenciamento. As bactérias com amplificação positiva tiveram suas seqüências do gene analisadas no programa MOTHRU o qual reuniu as em 10 grupos. Um representante de cada grupo foi empregado no teste de antagonismo contra o fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Amostras de solo de TPA e seus solos adjacentes foram coletados de dois sítios: Caldeirão Capoeira (floresta secundária por mais de 20 anos) e Cultivado (cultivado com mandioca por pelo menos 30 anos). Os DNAs totais das amostras de solo extraído foram usados como molde nas reações de PCR quantitativo em tempo real para verificar a abundância do gene *prnD* nas amostras de solo. Em amostras de solo também foi quantificado o gene 16S rRNA. No estudo dependente de cultivo, do total de 219 isolados (175 *Burkholderia* e 44 *Pseudomonas*), 60 isolados do gênero *Burkholderia* e 3 de *Pseudomonas* exibiram amplificação positiva. A análise filogenética do gene *prnD* mostrou que a maioria das seqüências obtidas deste estudo não agruparam com as seqüências do banco de dados do GenBank indicando que há diversidade do gene *prnD* nos isolados de solos amazônicos e que podem ser distintos dos descritos anteriormente. O teste de antagonismo demonstrou que isolados com potencial genético para produção de pirrolnitrina também são bioativos contra *Fusarium oxysporum*, apresentando forte atividade antimicrobiana. No estudo independente de cultivo, no sítio Caldeirão Cultivado, solo de TPA apresentou maior número de cópias do gene *prnD* e do gene 16S rRNA em relação ao solo ADJ. No sítio Caldeirão Capoeira, o solo adjacente apresentou maior quantidade do gene *prnD* ($1,74 \times 10^5$ cópias/g solo) que o solo de TPA ($2,48 \times 10^4$ cópias/ g de solo), no entanto, na TPA as bactérias totais foram mais abundante. Estes resultados evidenciam que a metodologia de PCR quantitativo em tempo real desenvolvida foi altamente sensível e específica permitindo a detecção de diferenças sensíveis e significativas entre os solos na quantificação do gene *prnD*. A abundância do gene *prnD* correlacionou significativamente com parâmetros químicos do solo tais como pH, fósforo, cálcio, magnésio e micronutrientes.

Palavras-chave: Bactérias produtoras de antibiótico, Terra Preta Antropogênica, Atividade antimicrobiana, Pirrolnitrina, PCR em tempo real

ABSTRACT

WONG, L. C. **Identification and quantification of pyrrolnitrin gene (*prnD*) in Anthropogenic Dark Earth by Real-time PCR.** 2011. 91 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

Anthropogenic Dark Earth (ADE) is considered one of the world's most fertile soils and receives this name because it originated from human action, probably by pre-Columbian populations who lived in these archaeological sites. Because of the common trend in agriculture towards sustainability antibiotic-producing bacteria is an alternative for biocontrol to plant diseases. Pyrrolnitrin (PRN) is a broad-spectrum antibiotic produced by various strains of *Burkholderia* and *Pseudomonas* that have been isolated from different soils. However, little is known about PRN-producing bacteria screened from ADE, even as the ecology and frequency of pyrrolnitrin gene. PNR is encoded by an operon comprised by four genes and *prnD* gene is responsible for catalyze the oxidation to form pyrrolnitrin. In this work, we studied the gene *prnD* through culture dependent and independent methods. Conventional PCR were established to detect *prnD* gene in bacterial isolates screened in ADE and their adjacent soils (ADJ) and identification were done by sequencing. Based on the results generated by MOTHUR *prnD* sequences from isolates were grouped into 10 groups. A representative of each group was used in the test of antagonism against the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. Soil samples of ADE and its adjacent soils were collected from two sites: Caldeirão Capoeira (secondary forest for over 20 years) and Caldeirão Cultivado (cultivated with cassava for at least 30 years). The total DNA extracted from soil samples was used as template in quantitative PCR reactions to determine the abundance of *prnD* gene. In soil samples was also quantified the 16S rRNA. In the study culture-dependent, in a total of 219 isolates (175 *Burkholderia* and 44 *Pseudomonas*), 60 isolates of *Burkholderia* and 3 *Pseudomonas* exhibited positive amplification for *prnD* gene. Phylogenetic analysis of *prnD* gene showed that most of the sequences obtained in this study grouped distinctly from sequences of the GenBank database. It indicates that there is diversity in *prnD* gene of isolates from amazonian soils and they may differ from those previous described. The antagonism test showed that isolates with genetic potential for production of pyrrolnitrin are also bioactive against *Fusarium oxysporum*, exhibiting strong antimicrobial activity. In culture-independent study, the site Caldeirão Cultivado, ADE soil showed higher copies number of *prnD* gene and 16S rRNA gene than in ADJ soil. At the site Caldeirão Capoeira, surrounding soil had a higher amount of *prnD* gene (1.74×10^5 copies / g soil) than ADE soil (2.48×10^4 copies / g soil), however, in ADE total bacteria was more abundant. These results show that the real-time PCR assay developed in this study was highly sensitive and specific enabling the detection of sensitive and significant differences between soils in the quantification of *prnD* gene. Soil variables such as pH, phosphorus, calcium, magnesium and micronutrients significantly correlated with abundance of *prnD* gene.

Keywords: Antibiotic-producing bacteria, Anthropogenic Dark Earth, Antimicrobial activity, Pyrrolnitrin, Real-Time PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - (a) Perfil de Terra Preta Antropogênica-TPA- (coloração escura com fragmentos de cerâmica e artefatos líticos; (b) TPA sobre camada de Latossolos.....	21
Figura 2 - Distribuição das Terras Pretas Antropogênicas. Fonte: IBGE modificado por WONG (2011)	23
Figura 3 - Antibióticos produzidos por bactérias que são relevantes no controle biológico (HAAS; DÉFAGO, 2005).....	30
Figura 4 - Biossíntese da Pirrolnitrina.....	32
Figura 5 - Fluxograma das principais etapas efetuadas neste estudo	36
Figura 6 - (a) Localização do município de Iranduba – AM; (b) Sítio de estudo Caldeirão no município de Iranduba. Fonte: Google	37
Figura 7 - Esquema representativo da amostragem dos solos de TPA e adjacências	38
Figura 8 - Gel de agarose da amplificação positiva do gene <i>prnD</i> dos 63 isolados, das bactérias padrão da DMSZ e <i>Pseudomonas chlororaphis</i> PHZ24. PM: padrão molecular <i>Low mass DNA Ladder</i> . CN: controle negativo.....	51
Figura 9 - Árvore filogenética construída pelo método de <i>Neighbor-Joining</i> com sequências do gene <i>prnD</i> dos isolados deste estudo. Sequências de referências obtidas do banco de dados (GenBank) em negrito. Isolados usados no bioensaio sublinhado; as mesmas letras não diferem estatisticamente entre si em relação à atividade antimicrobiana contra <i>F. oxysporum</i>	57
Figura 10 - Teste de antagonismo com representante de cada grupo contra o fungo fitopatogênico <i>Fusarium oxysporum</i>	60
Figura 11 - Gel de agarose do DNA total dos solos de TPA e seus respectivos solos adjacentes. PM: padrão molecular <i>Low mass DNA Ladder</i>	62
Figura 12 - Gel de agarose da amplificação do gene <i>prnD</i> das bactérias padrão da DMSZ e <i>Pseudomonas chlororaphis</i> PHZ24 utilizando os pares de primers: PRND1/ PRND2 com tamanho de produto 786pb (a); PrnD9/ PRND2 fragmento de 568pb (b) e PrnD8 / PRND2 com <i>amplicon</i> de 217pb (c). PM: padrão molecular <i>Low mass DNA Ladder</i> ; CN: controle negativo	64
Figura 13 - Curvas padrão e curva de <i>melting</i> da DSM 17311 (a) e DSM 10685 (b) para o gene <i>prnD</i> através da amplificação por PCR-tempo real.....	66
Figura 14 - Curva padrão da DSM 10685 e quantificação do gene <i>prnD</i> nas amostras de solo. Curva de <i>melting</i> para confirmação de amplificação específica do gene <i>prnD</i> em amostras solos de TPA e ADJ.....	67
Figura 15 - Curva padrão de clone contendo gene 16S rRNA e quantificação do gene 16S rRNA nas amostras de solo de TPA e ADJ. Curva de <i>melting</i> para confirmação da amplificação específica em amostras de solo	68
Figura 16 - Quantificação de PCR em tempo real dos genes <i>prnD</i> e 16S rRNA em cópias por grama de solo no sítio Caldeirão Capoeira dos solos TPA e ADJ.....	69
Figura 17 - Quantificação de PCR em tempo real dos genes <i>prnD</i> e 16S rRNA em cópias por grama de solo no sítio Caldeirão Cultivado dos solos TPA e ADJ	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos utilizados para controle positivo e/ou no bioensaio.....	39
Tabela 2 - Características químicas das amostras de solo deste estudo.....	48
Tabela 3 - Resultado da análise de ANOVA através da comparação de médias pelo Teste de Tukey.....	49
Tabela 4 - Resultado da análise comparativa das seqüências obtidas neste estudo com as do banco de dados do GenBank.....	53
Tabela 5 - Agrupamento das seqüências pelo programa MOTHUR e representante de cada grupo (em destaque).....	59
Tabela 6 - Médias das zonas de inibição do ensaio de antagonismo dos isolados <i>Burkholderia</i> contra <i>Fusarium oxysporum</i> pelo Teste de Tukey.....	61
Tabela 7 - Primers desenhados e testados neste estudo com amplificação positiva para o gene <i>prnD</i>	63
Tabela 8 - Correlação entre quantificações dos genes <i>prnD</i> e 16S rRNA e fatores do solo do sítio Caldeirão Capoeira.....	71
Tabela 9 - Correlação entre quantificações dos genes <i>prnD</i> e 16S rRNA e fatores do solo do sítio Caldeirão Cultivado.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
BDA	Bata dextrose Agar
CAP	Capoeira
CULT	Cultivado
cm	Centímetro
CTC	Capacidade de troca catiônica
Da	Dalton
DAPG	Diacetylphloroglucionol
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxiribonucleosídeo Trifosfato
EDTA	Ácido Etileno Diamono Tetrecético
<i>g</i>	Força centrífuga relativa
g	grama
L	Litros
m	Metro
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanograma
NA	Nutriente agar
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (Reação de polimerase em cadeia)
PRN	Pirrolnitrina
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	PicoMoles

pb Pares de base
rRNA Ácido Ribonucléico Ribossomal
RNase Ribonuclease
rpm rotação por minuto
SB Soma de bases
SDS Sódium Dodecil Sulfato
Taq Thermus aquaticus
TE Tris-EDTA
TPA Terra Preta Antropogênica
TPI Terra Preta de Índio
Tris Tris-(hidroximetil)-aminometano
U Unidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Terra Preta Antropogênica (TPA)	21
2.2 Microrganismos do solo	24
2.3 Gênero <i>Pseudomonas</i>	25
2.4 Gênero <i>Burkholderia</i>	26
2.5 Controle biológico por bactérias.....	28
2.6 Antibióticos produzidos por agentes de controle biológico	29
2.6.1 Antibiótico: Pirrolnitrina.....	32
2.7 PCR quantitativo em tempo real.....	33
3. OBJETIVOS.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Área de estudo	36
4.2 Amostragem	37
4.3 Análise química do solo	38
4.4 Isolados bacterianos.....	38
4.4.1 Meio de cultura e condições de crescimento	39
4.4.2 Extração de DNA das bactérias	39
4.4.3 PCR para detecção de gene <i>prnD</i>	40
4.4.4 Purificação do produto de PCR.....	40
4.4.5 Reação de seqüenciamento e precipitação	41
4.4.6 Bioensaio	41
4.4.7 Análise de seqüências e estatísticas	42
4.5 Amostras ambientais	43
4.5.1 Extração de DNA genômico do solo	43
4.5.2 Desenho de primer	44
4.5.3 PCR quantitativo e construção da curva padrão	44
4.5.4 Análises estatísticas	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46

5.1	Caracterização química do solo	46
5.2	Estudo com isolados bacterianos	50
5.2.1	Detecção por PCR do gene <i>prnD</i> em isolados de <i>Burkholderia</i> e <i>Pseudomonas</i>	50
5.2.2	Identificação molecular do gene <i>prnD</i>	51
5.2.2	Construção filogenética do gene <i>prnD</i>	56
5.2.3	Teste de antagonismo	58
5.3	Amostras ambientais	62
5.3.1	Extração de DNA total do solo.....	62
5.3.2	Desenho de primer e avaliação da especificidade utilizando a técnica de PCR.....	62
5.3.3	PCR quantitativo em tempo real	64
5.3.4	Influência da química do solo na abundância dos genes <i>prnD</i> e 16S rRNA.....	70
6.	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74
	APÊNDICE	88

1. INTRODUÇÃO

Na Amazônia, a maioria dos solos exhibe elevada acidez, baixa fertilidade natural, pobre em nutrientes e baixa capacidade de troca catiônica. No entanto, há a ocorrência de áreas contendo solos altamente férteis e com grande potencial produtivo denominado de Terra Preta de Índio ou Terra Preta Antropogênica.

A origem das Terras Preta Antropogênica (TPA) está relacionada à atividade humana, provavelmente da ação de populações pré-colombianas que viveram na Amazônia. As TPAs são caracterizadas pela coloração escura, alta fertilidade, por apresentarem altos teores de nutrientes tais como cálcio, magnésio, potássio e principalmente fósforo e alguns micronutrientes como o manganês e zinco. Além disso, exibem horizonte antrópico com presença de artefatos líticos, fragmentos de cerâmica, apresentam elevados teores de matéria orgânica e intensa atividade biológica. Uma característica interessante das TPAs é a sustentabilidade da sua fertilidade sendo os microrganismos do solo essenciais para manutenção desta propriedade.

Os microrganismos do solo apesar do seu pequeno tamanho são fundamentais para o funcionamento sustentável de um ecossistema por desempenharem atividades importantes como: biorremediação (degradação biológica de poluentes) (HORNER; DEVINE et al., 2004), reciclagem de nutrientes, manutenção da estrutura do solo e controle biológico de doenças e pragas (ELSGAARD et al., 2001, FILIP, 2002).

Nos últimos anos aumentaram-se os estudos de controle biológico de fitopatógenos por bactérias antagonistas. Diversos microrganismos como estirpes do gênero *Burkholderia* e *Pseudomonas* apresentam atividade de biocontrole pela produção de antibióticos. A grande parte dos estudos sobre agentes de controle biológico são voltados para *Pseudomonas* spp., contudo, ao longo das duas últimas décadas, pesquisas com espécies de *Burkholderia* vem expandindo, principalmente com ênfase para o controle biológico (COMPANT et al., 2008).

O crescente interesse por agricultura sustentável torna a utilização de bactérias produtoras de antibióticos uma alternativa de controle para as infecções causadas por fitopatógenos de solos, além disso, o uso deles oferece menor risco ao ambiente e ao homem em relação aos produtos químicos. Muitas bactérias que produzem antibióticos foram isoladas

de diferentes solos (KEEL et al., 1996). No entanto, existem poucos relatos de isolados bacterianos que produzem antibióticos originários de TPA da Amazônia.

Um antibiótico chave é a pirrolnitrina (PRN) a qual apresenta ampla atividade antifúngica e é produzido por várias estirpes de *Pseudomonas* e *Burkholderia*. A biossíntese da pirrolnitrina é codificada por um operon composto de quatro genes, *PrnA*, *PrnB*, *PrnC* e *prnD*. O gene *prnD* é o mais estudado e é responsável por catalisar a oxidação do grupo amino em grupo nitro para formar PRN (KIRNER et al., 1998). Existem primers específicos para o gene *prnD* (de SOUZA; RAAIJMAKERS, 2003), os quais são interessante para detectar bactérias produtoras de pirrolnitrina e analisar a incidência da produção de PRN no solo (GARBEVA, et al., 2004), contudo, este método não fornece informações quantitativas.

A técnica de PCR quantitativo em tempo real baseia-se na quantificação do produto de PCR amplificado que por sua vez é proporcional a concentração de DNA (MAVRODI et al., 2007). Recentemente este método está sendo bastante aplicado para estudos ecológico tais como, acessar a abundância do gene nitrato redutase em diferentes amostras ambientais (GRUNTZIG et al., 2001), quantificar o gene 16S rRNA a nível de grupo em comunidades bacterianas de água marinha e sedimentos (TAKAI; HORIKOSHI, 2000). Até agora, no entanto, não há relatos de quantificação por PCR tempo em real de genes relacionados com produção de antibióticos em solos de TPA.

Desse modo, no presente trabalho foi utilizados primers específicos para detectar o gene *prnD* em isolados de solos de TPA e de solos adjacentes através de PCR convencional e o seqüenciamento dos produtos amplificados foi empregado para um melhor entendimento da diversidade do gene *prnD* nos isolados. O bioensaio foi utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana dos isolados que apresentaram amplificação para o gene *prnD*. Além disso, foi desenvolvido a metodologia de PCR em tempo real para quantificar o gene *prnD* diretamente de amostras de solo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Terra Preta Antropogênica (TPA)

Na Amazônia há uma variedade de solos, sendo que a maioria deles apresenta baixa fertilidade devido à sua avançada idade geológica e acidez elevada (SANCHEZ; COCHRANE, 1980; VIEIRA, 1975). Contudo, existem na mesma região solos extremamente férteis e produtivos, denominados de Terra Preta Antropogênia (TPA) ou Terra Preta de Índio (TPI).

As TPAs (Figura 1) são caracterizadas por apresentarem coloração escura, horizonte antrópico com presença de artefatos líticos e cerâmicos, com altos teores de fósforo, cálcio, magnésio, zinco e manganês, valores de pH e saturação por bases mais elevados, além disso, possuem elevada capacidade de troca catiônica (CTC) e altos teores de matéria orgânica proporcionando maior potencial de produção (EDEN et al., 1984; KERN; KÄMPF, 1989; LIMA et al., 2002; SOMBROEK, 1966). As Terras pretas Antropogênicas são encontradas sobre os Latossolos, Argissolos e Cambissolos com horizonte A antrópico (Figura 1) (LIMA et al., 2002). As TPAs apresentam horizonte A bem drenados e com textura variando entre arenosa a muito argilosa (KERN; KÄMPF, 1989; LIMA et al., 2002) e comparando aos solos adjacentes, o horizonte A das TPAs são mais profundos, entre 30 a 60 cm (KERN et al., 2003).

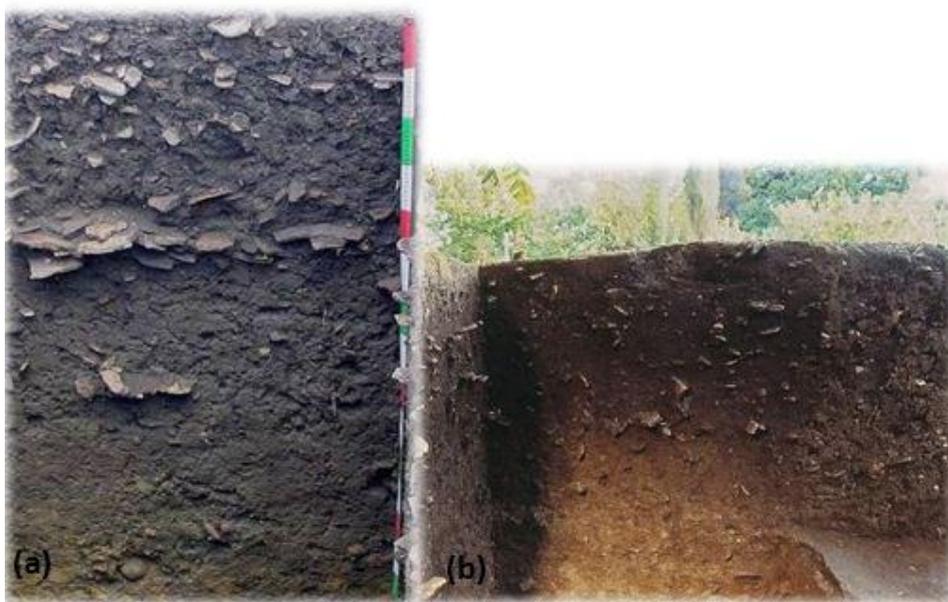


Figura 1 - (a) Perfil de Terra Preta Antropogênica-TPA- (coloração escura com fragmentos de cerâmica e artefatos líticos; (b) TPA sobre camada de Latossolos

As Terras Pretas Antropogênica são manchas de solo que ocorrem por toda a Amazônia, sendo localizadas em geral próximas aos cursos de água, ocupando várzeas, elevações marginais adjacentes (Figura 2). A extensão das TPAs varia de um hectare (distribuído em solos de terra firme) para mais de 100 hectares, ao longo de rios e interflúvios (KÄMPF; KERN, 2005; SMITH, 1980). Os sítios de TPA em floresta de terra firme são menores que os encontrados em terraços, com tamanho médio de 1,4 hectares, medindo entre 0,3 a 5,0 hectares (SMITH, 1980). Estão situadas em locais bem drenados, localizados em posição topográfica que oferece boa visualização espacial e acesso aos recursos de diferentes ambientes (KERN et al., 2003; KERN; KÄMPF, 1989; KÄMPF; KERN, 2005; GERMAN, 2004; SMITH, 1980).

Sobre o processo de formação das TPAs, atualmente a hipótese mais aceita é que são produtos da ação humana. Porém, ainda há dúvida a respeito desta formação ter acontecido com intenção de alterar a qualidade do solo ou não pelas populações (NEVES JUNIOR, 2008). As conseqüências da atividade de deposição humana (intencional ou não intencional) resultou em um enriquecimento do solo, modificando as propriedades físico-químicas (WOODS, 2003). O fósforo (P), em especial, é o elemento mais significativo da ocupação antrópica. O teor de P das TPAs é atribuído às cinzas oriundas de fogueiras, ossos de peixe e de outros animais, fezes, urina e cascos de tartaruga. Além do fósforo, outros componentes comuns à ocupação humana são encontrados nessas áreas, como o carbono, nitrogênio e cálcio. A cor do solo e o pH são modificações secundárias, associados às alterações culturais (SMITH, 1980).

Sendo as TPAs de origem antrópica, presumi-se que exista variabilidade espacial nas propriedades do solo os quais está relacionado com os diferentes períodos de ocupação, densidade da população, padrão de ocupação humana, elementos culturais e a disponibilidade de recursos na era pré-colombiana (KÄMPF; KERN, 2005; MADARI et al., 2005). A fertilidade e a produtividade das TPAs podem variar entre regiões, sítios ou até mesmo dentro de um mesmo local (MADARI et al., 2005).

Uma característica interessante das TPAs é a sustentabilidade da fertilidade, comparando com os solos adjacentes, o uso agrícola em TPA é menos danoso devido ao efeito tampão que possivelmente existe nesse solo (MADARI et al., 2005). Esta particularidade possivelmente está atribuída aos microrganismos do solo, ao elevado nível de matéria orgânica do solo e com uma contribuição significativa do carbono pirogênico

2.2 Microrganismos do solo

Os microrganismos do solo apesar do seu pequeno tamanho são essenciais para o funcionamento sustentável de um ecossistema por desempenharem atividades fundamentais os quais inclui: biorremediação (degradação biológica de poluentes) (HORNER; DEVINE et al., 2004), reciclagem de nutrientes, manutenção da estrutura do solo, controle de doenças e pragas (ELSGAARD et al., 2001, FILIP, 2002), em processos de decomposição (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002) e remoção de toxinas (BORNEMAN et al., 1996). Além disso, microrganismos são importantes índices de condições e qualidade do solo. Mudanças na composição da comunidade microbiana têm sido freqüentemente apontadas como um indicador sensível aos efeitos antropólogos na ecologia do solo (RENELLA et al., 2005).

Fatores bióticos e abióticos interferem de certa maneira na abundância de comunidades, diversidade e composição dos microrganismos. Estudos têm mostrado que o tipo de vegetação (MARSCHNER et al., 2001), tipo de solo (GIRVAN et al., 2003), manejo do solo (KENNEDY et al., 2005), temperatura (WARD et al., 1998), disponibilidade de nutrientes (BROUGHTON; GROSS, 2000), concentração de oxigênio (LUDEMANN et al., 2000), salinidade (FOTI et al., 2008) e estações do ano (KENNEDY et al., 2005) tem uma importante influência na composição da comunidade bacteriana. O'Neill et al. (2009) estudaram a comunidade bacteriana em solos de TPA e nos solos adjacentes e demonstraram uma diversidade superior em TPAs.

Devido à diversidade metabólica e adaptabilidade genética, os microrganismos são uma importante fonte de recursos genéticos para o avanço biotecnológico e para o desenvolvimento sustentável (KURTBOKE et al., 2004). Ferreira (2007) isolou bactérias de Terra Preta Antropogênica da região Amazônica e obteve 97% de bactérias produtoras de sideróforos e um isolado que produz fenazina sugerindo que muitos microrganismos deste solo têm um potencial para produzir uma diversidade de metabólitos secundários com várias aplicações em biotecnologia.

2.3 Gênero *Pseudomonas*

Pseudomonas é um gênero que está incluído nas alfa-proteobactérias pertencentes à família das Pseudomonadaceae. São bastonetes gram-negativos que podem ser móveis por flagelos polares ou imóveis. Recentes análises de seqüências de 16S rRNA redefiniram a taxonomia de muitas espécies bacterianas. O resultado foi incluir no gênero *Pseudomonas* os gêneros formalmente classificados como *Chryseomonas* e *Flavimonas* (ANZAI et al., 2000). Outras linhagens previamente classificadas no gênero *Pseudomonas* agora são classificadas nos gêneros *Burkholderia* e *Ralstonia* (ANZAI et al., 1997).

Diversas espécies de *Pseudomonas* podem ser isoladas de diferentes hábitat (água, solo e plantas) e, devido a sua ampla distribuição no ambiente e facilidade de cultivo, esse gênero constitui-se num dos mais bem estudados grupos bacterianos (AAGOT et al., 2001). Os papéis desempenhados por *Pseudomonas* no ambiente incluem o controle biológico e promotores de crescimento (SCHROTH et al., 1991).

No ano 2000, a seqüência completa do genoma de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 foi determinada. Seqüências de outras espécies foram determinadas, incluindo, *Pseudomonas putida* KT2440, *P. fluorescens* Pf-5, *P. fluorescens* PfO-1 e *P. entomophila* L48 (CORNELIS, 2008).

Este gênero compreende um táxon de organismos muito versáteis metabolicamente, capazes de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos simples ou complexos. Conseqüentemente, eles estão distribuídos por solos e água, sendo importantes como patógenos de plantas, animais e humanos, com algumas estirpes relacionadas à promoção de crescimento de plantas e biocontrole de fitopatógenos (ZAGO, 2000).

As *Pseudomonas* spp., é o grupo de bactéria mais conhecidas por suas atividades de controle biológico contra vários patógenos de solo (RAAIJMAKERS et al., 2002) e possuem características semelhantes à aqueles que são encontrados em solos de supressão específica (WELLER et al., 2002). Antibióticos produzidos por agentes de controle biológico são facilmente isolados, mas não somente, da espermosfera, rizosfera e de tecidos de plantas (BONSALL et al., 1997). *Pseudomonas* spp produz um amplo espectro de antibióticos, tais como pyrrolnitrin, pyoluteorin, 2,4 – diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) e os derivados de fenazinas.

2.4 Gênero *Burkholderia*

Uma das primeiras *Burkholderia* foi descrita por Burkholder (1942), *Burkholderia* sp., *Phytomonas caryophylli*, que posteriormente veio a ser conhecida como *Pseudomonas caryophylli*. Walter H. Burkholder também descreveu uma bactéria fitopatogênica a qual causava podridão mole da cebola, no Estado de Nova York, a denominou de espécie “cepacia” significado derivado de “onion” (BURKHOLDER, 1950), a qual mais tarde nomeada de *Pseudomonas cepacia*.

Devido a sua vaga e ampla definição fenotípica, *Burkholderia* spp. pertenceram por vários anos ao gênero *Pseudomonas*. Análises genotípicas posteriores dividiram os organismos deste gênero. *Pseudomonas* s.s foi restrito exclusivamente na homologia do grupo I, contendo a espécie *Pseudomonas aeruginosa* (de VOS et al., 1985). As outras espécies que pertenciam ao rRNA homologia do grupo II (*Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas pickettii*, *P. cepacia*, *P. gladioli*, *P. mallei*, *P. caryophylli*) foram transferidas para o novo gênero *Burkholderia* (YABUUCHI et al., 1992) os quais pertencem ao sub-grupo β -3 da *Betaproteobactérias sensu* Woese (1987).

Nos últimos anos, um considerável número de espécies foi incluído no gênero *Burkholderia* (COENYA; VANDAMME, 2003). Este gênero abrange mais de 50 espécies descritas válidas que são encontrados em diversos nichos ecológicos e foram isolados de solo, água plantas, insetos, fungos e em ambientes industriais (COENYE; VANDAMME., 2003; MAHENTHIRALINGAM et al., 2005; 2008). Várias espécies de *Burkholderia* exibem atividade antimicrobiana, e podem ser utilizados comercialmente para proteger as culturas economicamente importantes, particularmente contra as doenças causadas por fungos. Estas espécies pertencem ao “Complexo *Burkholderia cepacia*” (Bcc) (VANDAMME et al., 1997) que inclui um grupo fenotipicamente heterogêneo de pelo menos 17 espécies: *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia cenocepacia*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. pyrrocinia* (MAHENTHIRALINGAM et al., 2005), também as *Burkholderia ubonensis*, *Burkholderia latens*, *B. diffusa*, *B. arboris*, *B. seminalis*, *B. Metallica* (VANLAERE et al., 2008), *Burkholderia lata* e *B. contaminans* (VANLAERE et al., 2009) assim como muitos outros que podem ser potencialmente novos grupos taxonômicos (MAHENTHIRALINGAM et al., 2008).

Em um ambiente natural, *Burkholderia* spp. estão entre as bactérias mais abundantes. A plasticidade de seus genomas e a capacidade de adaptar se às mudanças do ambiente permite que estes microrganismos colonizem diversos nichos. Várias espécies do gênero são classificadas como patógenos de humanos, animais e de plantas, entretanto, existem outros que interagem com as plantas resultando num efeito benéfico e que podem ser potencialmente utilizados como um poderoso biopesticida no controle de doenças dos patógenos associados ao solo (COMPANT et al., 2008).

Algumas *Burkholderia* podem ainda ser usadas como biofertilizantes, atuando na fixação de nitrogênio ou solubilizando ferro ou fósforo das rochas fosfatadas, desse modo, os solos menos férteis podem ser utilizados para agricultura além de ser ecologicamente e economicamente interessante (COMPANT et al., 2008).

O gênero *Burkholderia* apresenta alta versatilidade ecológica, provavelmente devido ao tamanho do seu genoma (VIAL et al., 2007). Quando comparados com bactérias com genoma menor, as que possuem genomas grandes apresentam uma desproporção quanto à distribuição dos genes, sendo mais frequentes os associados ao metabolismo secundário e regulação do que genes envolvidos com o metabolismo de nucleotídeos, divisão celular, replicação de DNA e tradução de proteínas. Isso pode explicar porque espécies que contem genomas maiores dominam ambientes onde os recursos são escassos, mas diversos, tal como o solo (KONSTANTINIDIS; TIEDJE, 2004).

A versatilidade nutricional deste gênero permite estas bactérias crescer em mais de duzentos compostos orgânicos (COENYE; VANDAMME, 2003). Dentre os compostos, estão fontes de carbono incomuns como o ácido azeláico triptofano (BURBAGE; SASSER, 1982). Esta capacidade nutricional contribui na habilidade destas bactérias competirem com sucesso por exudatos da planta, o que facilita a colonização das raízes (DALMASTRI et al., 1999). Tal versatilidade também confere a espécies do gênero *Burkholderia* ser utilizadas em processo de biodegradação ambiental de poluentes (van PELT et al., 1999).

2.5 Controle biológico por bactérias

O aumento considerável do interesse em controle biológico de fitopatógenos é devido às preocupações sobre o uso de agrotóxicos e uma tendência comum para uma agricultura sustentável (HAAS; DÉFAGO, 2005; RAAIJMAKERS et al., 2002; 2008). Além disso, grande parte dos agroquímicos para doenças de plantas são ineficientes ou não existem no mercado (ROBERTS et al., 2005).

O controle biológico de doenças consiste no uso de microrganismos que atuam como antagonistas aos agentes causadores de prejuízos em planta (AZEVEDO; ARAÚJO; MACHERONI, 2000). Um grande número de microrganismos, como estirpes dos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Pseudomonas* assim como as estirpes não patogênicas de *Fusarium* sp., tem sido relatada por exibirem atividade de biocontrole e algumas destas são utilizadas em aplicações comerciais (BERG, 2000; CAO et al., 2005; THOMASHOW, 1996).

A maior parte das pesquisas sobre agentes do controle biológico são de *Pseudomonas* spp., entretanto, ao longo das duas últimas décadas, vem expandindo o estudo com espécies de *Burkholderia*, e muitas destas bactérias foram analisadas com ênfase para o controle biológico (COMPANT et al., 2008).

Várias espécies de *Burkholderia* possuem a habilidade de produzir compostos com atividade antimicrobiana (KANG et al., 1998; HU; YOUNG, 1998) os quais podem ser potencialmente utilizados como agentes do controle biológico de fungos fitopatogênicos. Esta capacidade foi evidenciada em *Burkholderia cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. ambifaria*, *B. pyrrocinia*, *B. vietnamiensis* e *B. phytofirmans* para *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Fusarium* sp., *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani* (BOWERS; PARKE, 1993; HEBBAR et al., 1992; 1998; PARKE, 1990; PARKE et al., 1991; KING; PARKE, 1993; McLOUGHLIN et al., 1992; SINGH et al., 2006).

Diversas espécies de *Burkholderia* também são capazes de inibir o crescimento de outras bactérias, de protozoários (CAIN et al., 2000) e de nematóides (MEYER et al., 2000). A capacidade de *Burkholderia* em suprimir doenças de plantas tem sido observada em diferentes culturas, tais como no milho, algodão, em videira, ervilha, tomate e pimentão. Estirpes de *Burkholderia* formam a população dominante em musgo e demonstraram alto potencial antagonista contra fungos patogênicos (OPELT; BERG, 2004). Duas novas espécies,

Burkholderia bryophila e *Burkholderia megapolitana*, foram isoladas de musgos mostrando atividade antifúngica assim como propriedades de promover de crescimento em plantas (VANDAMME et al., 2007).

Os mecanismos de controle biológico podem ser: competição por nichos ecológicos ou por substrato; por indução de resistência sistêmica no hospedeiro contra patógenos (PIETERSE et al., 1996) e pela produção de antibióticos que inibem o crescimento do patógeno (O'SULLIVAN; O'GARA, 1992).

2.6 Antibióticos produzidos por agentes de controle biológico

Antibióticos englobam uma química heterogênea do grupo orgânico, são compostos de baixo peso molecular produzidos por microrganismos. Em baixas concentrações, os antibióticos são deletérios para o crescimento ou atividades metabólicas de outros microrganismos (FRAVEL, 1988; THOMASHOW et al., 1997). Vários antibióticos, tais como fenazinas, pirrolnitrina, oomicina A, pioluteorina, 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) e cianide tiveram as estruturas químicas elucidadas (Figura 3) e foram isolados de diversas estirpes de diferentes gêneros bacterianos que atuam no biocontrole (RAAIJMAKERS et al., 2002).

Algumas estirpes bacterianas do controle biológico produzem números de antibióticos e apresentam uma diversidade de tipo. Como exemplos, o *Bacillus cereus* UW85 (HANDELSMAN; STABB, 1996), *Pseudomonas fluorescens* CHA0 e *P. fluorescens* Pf-5 (BENDER et al., 1999; KEEL et al., 1996) produzem múltiplos antibióticos por sobreposição ou em diferentes graus de atividade contra fungo patogênico específico (RAAIJMAKERS et al., 2002).

Doenças de plantas causadas por fungos e oomicetos podem ser controladas por estirpes do gênero *Burkholderia*. Um dos exemplos mais bem estudados inclui o controle biológico de damping-off e doenças associadas a fungo de solos causadas por *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* e *Fusarium* spp. (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001). Os compostos produzidos por *Burkholderia* sp. que tem mostrado atividade antifúngica inclui: os lipopeptídeos (KANG et al., 1998), cepaciamide A e B (JIAO et al., 1996), cepacidinas (LEE et al., 1994), pirrolnitrina (ARIMA et al., 1964), glidobactinas (SCHELLENBERG

et al., 2007; SHOJI et al., 1990), fenazinas (CARTWRIGHT et al., 1995) e 2-hidroxiacetil-chroman-4-one (KANG et al., 2004).

A biossíntese de antibióticos em bactérias do controle biológico é modulada por fatores abióticos e bióticos. Os fatores físicos relatados que afetam a produção de antibióticos são: temperatura (SHANAHAN et al., 1992), umidade do solo (GEORGAKOPOULOS et al., 1994) e pH (OWNLEY et al., 1992). Chin-a-Woeng et al. (1998) observaram que em pH 5,7 *in vitro*, a atividade de fenazina-1-acido carboxamida foi 10 vezes maior que de fenazina-1-acido carboxílico (PCA), assim, os autores sugerem que a natureza dos derivados de fenazina pode contribuir nas diferenças das atividades de biocontrole entre estirpes. Os microrganismos do solo dependem de substratos liberados das raízes, dessa forma, a vegetação influencia de certo modo na quantidade e composição de microrganismos bem como na expressão de genes biossintético para antibióticos (RAAIJMAKERS et al., 2002). A produção do antibiótico kanosamina em *Bacillus cereus* foi elevada em mais de 300% com a adição de exudatos de plântulas de alfafa no meio de cultura (MILNER et al., 1996).

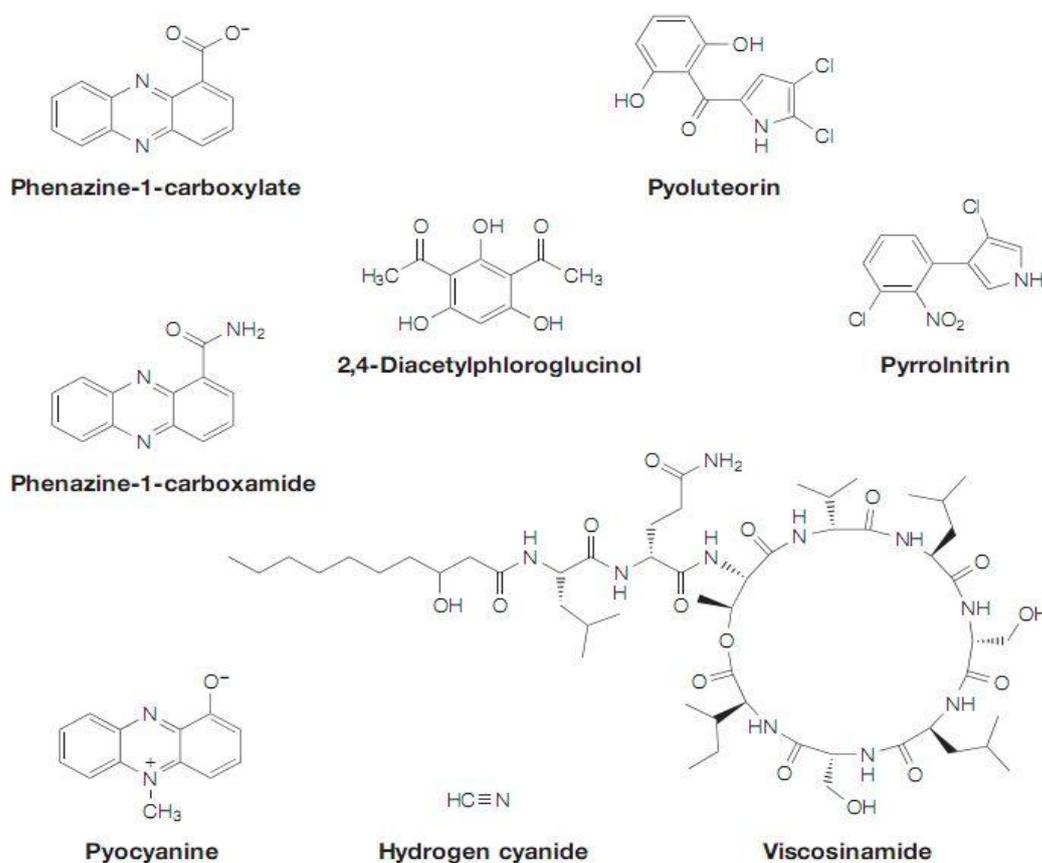


Figura 3 - Antibióticos produzidos por bactérias que são relevantes no controle biológico (HAAS; DÉFAGO, 2005)

Bactérias que produzem antibióticos *in vitro* foram isoladas dos mais diversos solos e plantas, esta aparente ampla distribuição sugere que bactérias produtoras de antibióticos são constituintes comuns da microflora do solo e da associação com as plantas (RAAIJMAKERS et al., 2002). Muitas bactérias produtoras de antibióticos foram identificadas ao acaso em ambientes naturais, no entanto, os genes regulatórios e a biossíntese de antibióticos foram clonados e seqüenciados e com isso tem facilitado o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores os quais podem ser utilizados para a detecção e isolamento das bactérias específicas que produzem antibióticos.

O pré-requisito para detecção baseado em DNA é que o gene de interesse deve ser conservado entre uma ampla estirpe de bactérias (RAAIJMAKERS et al., 2002). Pelas técnicas de PCR (RAAIJMAKERS et al., 1997; RAMETTE et al., 2001), hibridização por Southern (KEEL et al., 1996) mostrou que genes específicos envolvidos na biossíntese de antibióticos são conservados entre estirpes diferentes.

Conhecer a diversidade dentro de um grupo de estirpes que compartilham a propriedade de controle biológico pode fornecer uma nova abordagem para identificar estirpes de controle biológico que são superiores em relação à habilidade ecológica e capacidade de suprimir doenças específicas de plantas. Estudos demonstraram que há uma considerável diversidade genotípica na população de *B. cepacia* (BEVIVINO et al., 1998; PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001), *Serratia plymuthica* (BERG, 2000), *Bacillus cereus* (RAFFEL et al., 1996) e espécies de *Pseudomonas* (McSPADDEN-GARDENER et al., 2000). Genótipos diferentes de *Pseudomonas* spp. que produzem DAPG diferiram na suas capacidades de suprimir podridão de raízes causada por *Fusarium* e *Pythium* (SHARIFI-TEHRANI et al., 1998). Os resultados destes estudos evidenciaram que avaliar a diversidade dentro de um grupo específico de microrganismos antagonistas seleciona o com melhor potencial para o controle biológico.

2.6.1 Antibiótico: Pirrolnitrina

Pirrolnitrina (PRN) foi isolada pela primeira vez de *Burkholderia pyrocinia* (conhecido anteriormente como *Pseudomonas pyrocinia*; (ARIMA et al., 1964), é um metabólito secundário derivado do triptofano e apresenta atividade antifúngica de amplo espectro (KIRNER et al., 1998). Hammer et al (1997) descreveu a clonagem e caracterização de uma região de 5,8kb DNA que codifica a biossíntese de pirrolnitrina. Esta região confere a habilidade de produzir PRN e é compreendida por quatro genes, *prnABCD*, cada um dos quais é requerida para a produção de pirrolnitrina (KIRNER et al., 1998).

A biossíntese de PRN foi proposta por van Pée et al. (1980) (Figura 4), porém, e elucidação da função do produto de cada gene foi evidenciada por Kirner et al. (1998), no qual o produto de gene *prnA* catalisa a cloração (ou oxidação) do triptofano para formar 7-cloro-L-triptofano, o produto do gene *prnB* catalisa o rearranjo do anel e a descarboxilação para formar monodecloroaminopirrolnitrina. Este intermediário é oxidado pelo produto de *prnC* e forma aminopirrolnitrina e na última etapa, o produto do gene *prnD* catalisa a oxidação do grupo amino de aminopirrolnitrina para o grupo nitro para formar pirrolnitrina.

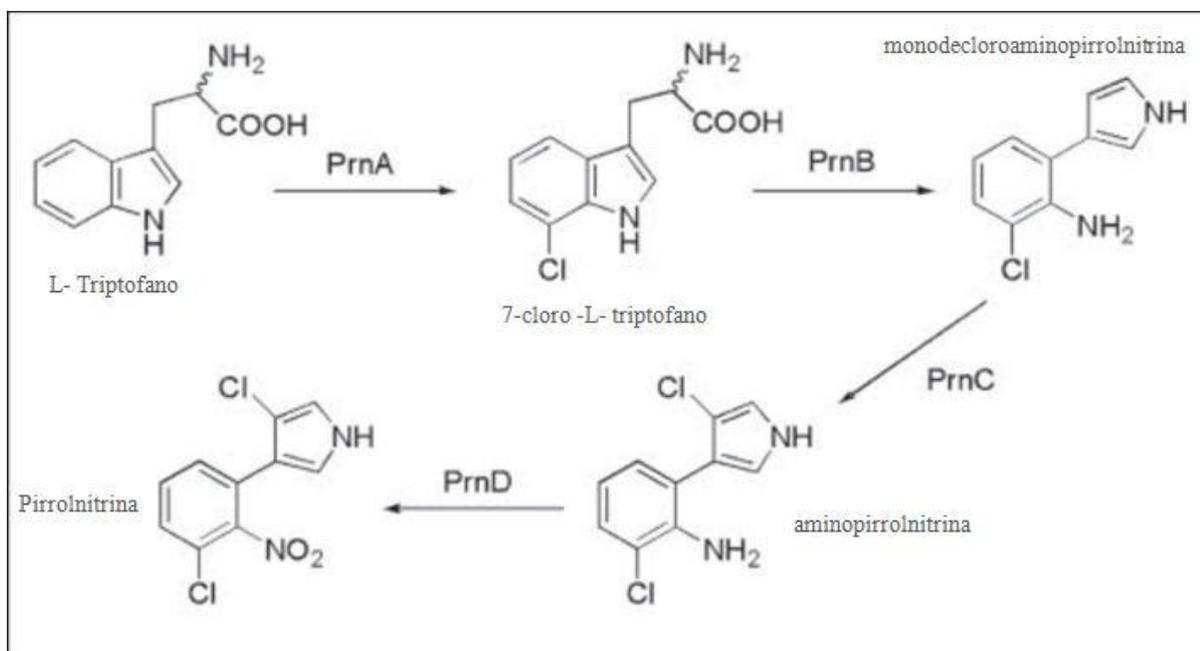


Figura 4 - Biossíntese da Pirrolnitrina

A pirrolnitrina (3-chloro-4-(2'-nitro-3'chlorophenyl)pyrrole) é produzido por algumas espécies de *Pseudomonas* (KIRNER et al., 1998; PFENDER et al., 1993), por *Myxococcus fulvus* (GERTH et al., 1982), por *Enterobacter agglomerans* (CHERN et al., 1996) e algumas espécies de *Burkholderia* (EL-BANNA; WINKELMANN, 1998; HWANG et al., 2002; SCHMIDT et al., 2009).

PRN tem sido utilizado como antimicótico na medicina humana, particularmente contra fungo dermatofítico do gênero *Trichophyton* e análogos sintéticos de pirrolnitrina foram desenvolvidos para serem usados como fungicida agrícola (LIGON et al., 2000). PRN foi descrito como inibidor da cadeia respiratória dos fungos e apresenta atividade contra fungos pertencentes aos filos Basidiomycota, Ascomycota, e Deuteromycota (TRIPATHI; GOTTLIEB, 1969) incluindo vários patógenos economicamente importantes como *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Verticilium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum* (LIGON et al., 2000) e *Fusarium sambicinum* (KURKHEAD et al., 1994). Além disso, pirrolnitrina também foi reportado ser ativo contra bactéria gram-positiva, em especial, *Streptomyces* (EL-BANNA; WINKELMANN, 1998) e exibir atividade contra *Aspergillus*, *Bacillus subtilis* e *Proteous vulgaris* (ARIMA et al., 1965).

2.7 PCR quantitativo em tempo real

Quantificar microorganismos é importante, pois proporciona um melhor entendimento da influência de diferentes ambientes, tipo de vegetação e da rizosfera na população microbiana. Quantificação de ácidos nucleicos por PCR convencional apresenta a desvantagem de medir somente a quantidade final de DNA, isso torna difícil a dedução da concentração inicial (HERMANSSON; LINDGREN, 2001). Medições espectroscópicas são imprecisos devido à sobreposição na absorbância 260 nm causado por contaminações, co-extrato húmico (CULLEN; HIRSCH, 1998). Concentração de DNA determinada por PCR quantitativo supera estas limitações. PCR quantitativo tem sido utilizado para avaliar a comunidade microbiana ao nível taxonômico (FIERER et al., 2005).

Mavrodi et al. (2007) realizaram a quantificação de estirpes de *Pseudomonas* fluorescentes produtoras do antibiótico 2,4 Diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) em solos supressivos pelo método de PCR em tempo real e concluíram que a maior vantagem desta técnica é que ela é cultivo independente o qual permite determinar, de forma direta, em

amostras do solo a densidade populacional microbiana, e sobretudo, a composição genotípica dos produtores de 2,4-DAPG.

PCR em tempo real é baseado na detecção em tempo real da concentração de ácidos nucleicos no qual a fluorescência aumenta conforme o acúmulo de produtos durante cada ciclo de amplificação (RAEYMAEKERS, 2000). Utilizando esta técnica, uma fase log pode ser identificada facilmente e os dados aparecem na tela do computador que serão comparados com as curvas padrões (MADANI et al., 2005). PCR em tempo real tem as vantagens de ser rápido, preciso e confiável quando comparado com PCR tradicional (SCHAAD et al., 2002). Pode ser utilizados diferentes reagentes tais como, SYBR Green, TaqMan e FRET. Além disso, esta técnica exige um menor consumo de tempo devido a sua rapidez e capacidade de suportar grande quantidade de amostras (HERMANSSON; LINDGREN, 2001).

A fluorescência SYBR Green possui a vantagem de ser mais fácil, pois não é necessário uma seqüência específica, assim pode detectar qualquer produto de PCR e ligar a qualquer fita dupla de DNA (MADANI et al., 2005). Contudo, tem a desvantagem de ligar-se a produtos não específico incluindo primer-dimers (MADANI et al., 2005). Para superar este problema, pode-se alterar a temperatura de desnaturação do DNA molde. Produtos não específicos tem a temperatura de desnaturação mais baixa que os produtos específicos (RIRIE et al., 1997).

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Identificar e quantificar o gene *prnD* em solos de TPA comparando com os solos da adjacência.

Objetivos específicos

- ✓ Detectar e identificar o gene *prnD* em isolados bacterianos de TPA e ADJ através de PCR convencional e seqüenciamento;
- ✓ Análise filogenética do gene *prnD* dos isolados;
- ✓ Verificar a atividade antifúngica dos isolados por bioensaio;
- ✓ Desenvolver a metodologia de PCR quantitativo em tempo real utilizando o sistema SYBR Green para estudar a abundância do gene *prnD* em solos de TPA e ADJ.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA) - USP, Piracicaba-SP. A Figura 5 mostra um fluxograma representativo das etapas realizadas neste estudo.

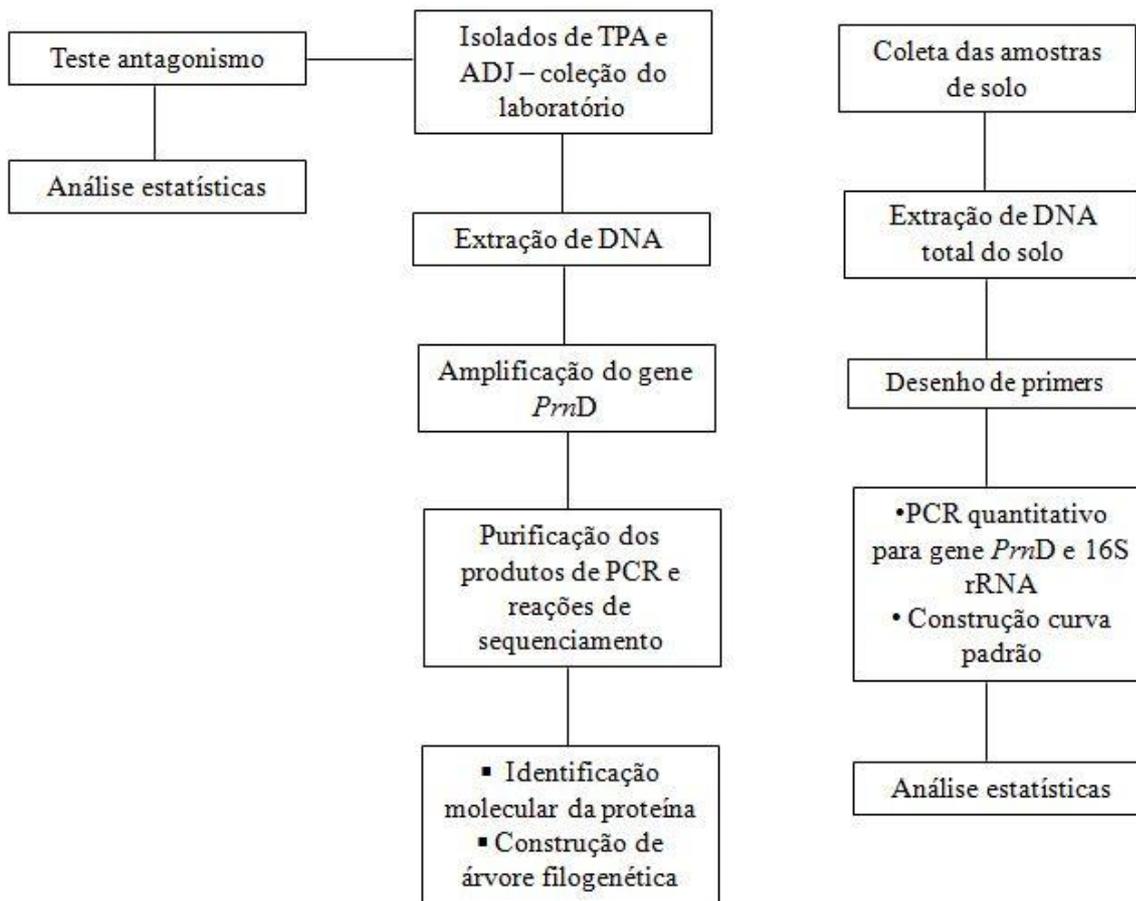


Figura 5 - Fluxograma das principais etapas efetuadas neste estudo

4.1 Área de estudo

A área de estudo está localizada no município de Iranduba – AM (Figura 6), a 22 quilômetros de Manaus e está situada na estação experimental do Caldeirão pertencente a Embrapa Ocidental. Foram coletadas amostras de solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) e

dos seus respectivos solos adjacentes (ADJ) em dois sítios: Caldeirão Capoeira ($03^{\circ}15'11''\text{S}$ - $60^{\circ}13'43''\text{W}$) e Caldeirão Cultivado ($03^{\circ}15'09''\text{S}$ - $60^{\circ}13'42''\text{W}$).

A vegetação presente no sítio Caldeirão Capoeira (CAP) é uma área floresta secundária sem perturbação há pelo menos 20 anos e o sítio Caldeirão Cultivado (CULT) constitui plantação de mandioca por pelo menos 30 anos.

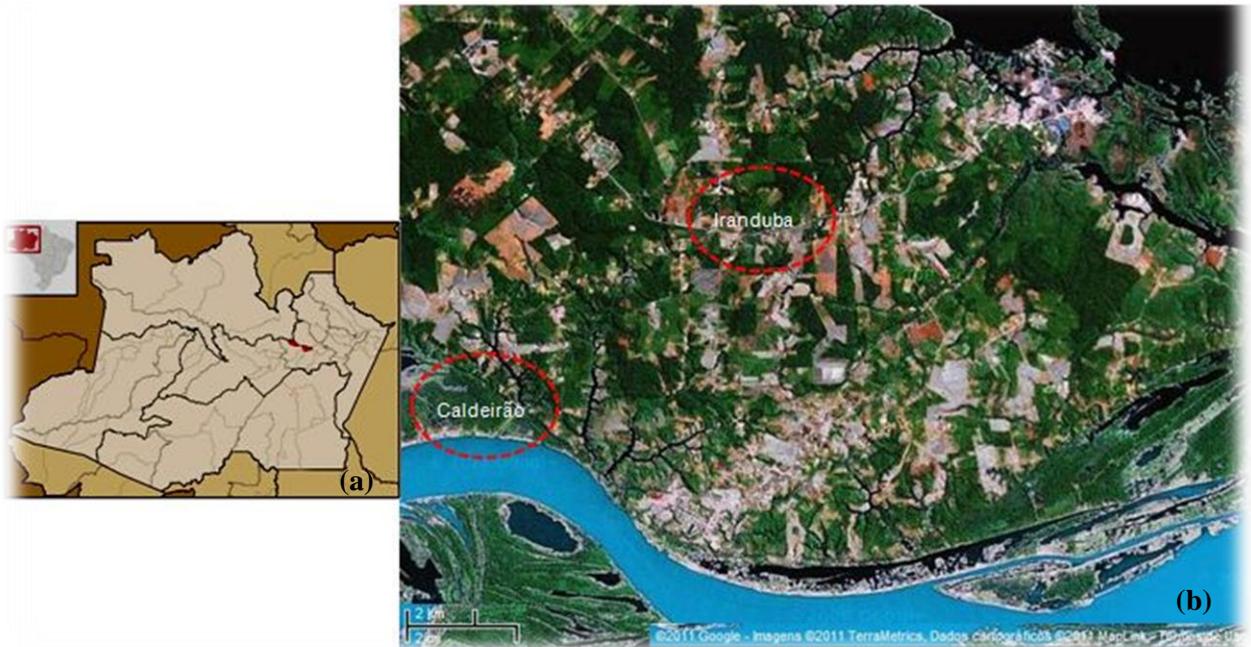


Figura 6 - (a) Localização do município de Iranduba – AM; (b) Sítio de estudo Caldeirão no município de Iranduba. Fonte: Google

4.2 Amostragem

As amostras de solos foram coletadas em tubos de PVC, a uma profundidade de 0 a 10 cm. Um ponto central foi selecionado e quatro pontos de amostragem distante de 1,5 metros do ponto central foram escolhidos. Cada amostra foi composta por cinco repetições os quais foram coletados com 30 cm de distância de cada um (Figura 7). Os tubos foram encaminhados ao laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) sob refrigeração e posteriormente mantidas a -80°C para análises moleculares.

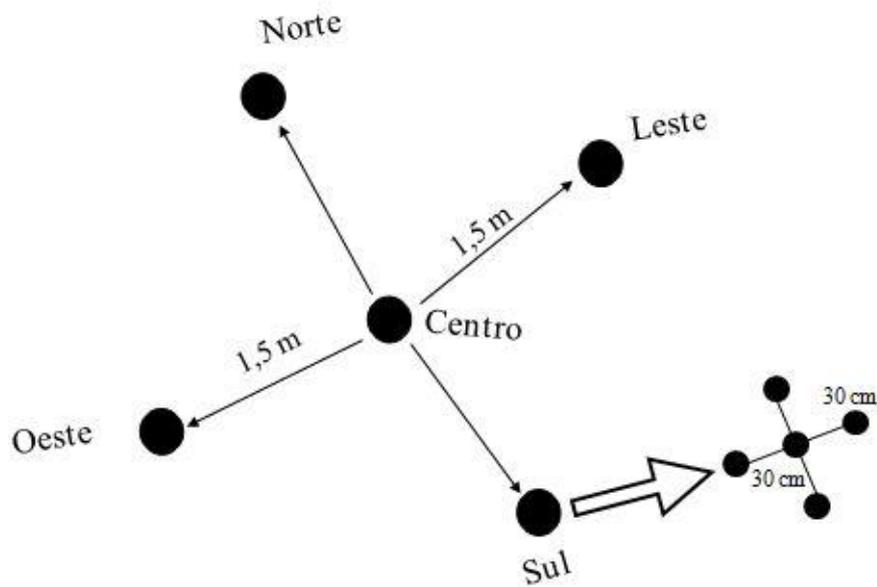


Figura 7 - Esquema representativo da amostragem dos solos de TPA e adjacências

4.3 Análise química do solo

A análise dos atributos químicos dos solos foi realizada na EMBRAPA Solos e disponibilizada pelo Professor Dr. Wenceslau Geraldes Teixeira da mesma instituição.

4.4 Isolados bacterianos

Neste estudo foram utilizados 219 isolados de bactérias sendo 175 do gênero *Burkholderia* e 44 *Pseudomonas*. Em relação à origem, dos 175, 88 isolados são de solo adjacentes (ADJ) e 87 de TPA, dos 44 isolados do gênero *Pseudomonas*, 4 são de ADJ e 40 de TPA. Os isolados bacterianos foram obtidos da coleção de cultura do Laboratório de Biologia Celular e Molecular – CENA/USP (Apêndice A). As bactérias usadas como controle positivo nas análises moleculares foram adquiridas da Coleção de Microrganismos e Culturas de Células da Alemanha – DSMZ (German Collection of Microorganism and Cell Cultures - www.dsmz.de). A bactéria *Pseudomonas chlororaphis* PHZ24 também utilizado para controle em análise molecular foi gentilmente cedido pelo Dr. Rodrigo Mendes da Universidade de Wageningen – Holanda. O fungo empregado no bioensaio foi cedido pela Liliane De Diana Teixeira da Clínica Fitopatológica – ESALQ/USP (Tabela 1).

4.4.1 Meio de cultura e condições de crescimento

Os isolados bacterianos da Coleção de cultura do Laboratório de Biologia Celular e Molecular e as bactérias padrão da DSMZ, *Burkholderia cepacia* e *Burkholderia pyrrocinia*, foram colocados para crescer em meio líquido Nutriente Ágar (NA) (peptona 5,0 g/L ; extrato de malte 3,0 g/L). *Burkholderia ubonensis* e *Burkholderia ambifaria* da DSMZ foram cultivados em Meio Caso (Peptona de caseína 15,0 g/L; Peptona de soja 5,0 g/L; NaCl 5,0 g/L). A *Pseudomonas chlororaphis* PHZ24 foi primeiramente crescida no meio King's B (bacto peptona 20g/L; glicerol 10ml/L; K₂HPO₄ 1,5g/L; MgSO₄.7H₂O 1,5g/L) e posteriormente foi transferido para o NA líquido. O fungo *Fusarium oxysporum* foi cultivado em meio BDA (batata 4,0g/L; dextrose 20g/L). Para meio sólido foi adicionado 15g/L de agar. Os microrganismos foram incubados a 28°C.

Tabela 1- Microrganismos utilizados para controle positivo e/ou no bioensaio

Isolado	Origem/hospedeiro	Descrição	Referência
DSM 7288	Cebola - EUA	<i>Burkholderia cepacia</i>	Yabuuchi et al, 1993
DSM 10685	Solo-Japão	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	Vandamme et al,1997
DSM 17311	Solo - Tailândia	<i>Burkholderia ubonensis</i>	Yabuuchi et al, 2000
DSM 16087	Rizosfera de ervilha - EUA	<i>Burkholderia ambifaria</i>	Coenye et al, 2001
PHZ24	Tomate-França	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	de Souza; Raaijmakers, 2003
109-08	Pupunha	<i>Fusarium oxysporum</i>	Clínica de Fitopatológica, 2008

4.4.2 Extração de DNA das bactérias

Para a extração de DNA dos isolados da coleção e das bactérias padrão da DSMZ foi empregado o método de Stirling e Bartlett (2003). As bactérias foram cultivadas *overnight* em meio líquido a 28°C sob agitação. Foram transferidos 1500µl de suspensão de células para tubo de rosca e centrifugados a 12000-14000rpm durante 10 minutos. As amostras foram ressuspensas em 200 µl de Tampão de Extração A (Triton X-2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 8,0 10 mM, EDTA pH 8,0 1 mM). Em seguida, foi adicionados 200 mg de pérolas de vidro 0,1 mm, 200µl de fenol e 200µl de Clorofórmio Álcool-Isoamílico (24:1). As amostras foram agitadas vigorosamente por cinco minutos e, logo após, foram adicionados 200µl de tampão TE (Tris-EDTA), homogeneizando-se 20 vezes. Posteriormente, foi realizada a centrifugação das amostras por cinco minutos a 12000-14000rpm e foi transferido

500µl do sobrenadante para um novo tubo. Nesse tubo, foi adicionado 1000µl de etanol absoluto, homogeneizando-se 20 vezes e centrifugando-se a 12000-14000rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuscitado em 400µl de TE. Em seguida, foi adicionado 10µl de acetato de amônio a 4M, homogeneizando-se 20 vezes e adicionando-se 1000µl de etanol absoluto. As amostras foram centrifugadas a 12000-14000rpm durante cinco minutos. Logo após, descartou o sobrenadante e secou as amostras de DNA durante dez minutos no concentrador de DNA. E por fim, as amostras foram ressuscitadas em 40µl de Tris-RNase e incubadas a 37°C por 20-30 minutos.

As amostras de DNA extraídas foram quantificadas no espectrofotômetro tipo ND-2000 (Nanodrop Technologies, Waltham, EUA).

4.4.3 PCR para detecção de gene *prnD*

Para a amplificação do gene *prnD* foram utilizados como molde os DNA extraídos. Uma reação continha 1X tampão para PCR 10X; 1,5 mM de MgCl₂; 0,1mM de cada dNTP; 1µL de cada primer a 5 pmol: PRND1 (5'-GGGGCGGGCCGTGGTGATGGA-3') e PRND2 (5'- YCCCGCSGCCTGYCTGGTCTG-3') (de SOUZA; RAAIJMAKERS, 2003); 20-50ng de DNA; 0,2µL de *Platinum[®] Taq DNA Polimerase* 5U (Invitrogen, Brasil) e água Mili-Q esterilizada para um volume final de 25µL. As reações de amplificações foram feitas no termociclador modelo Gene AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 68°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; seguido de uma extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto amplificado foi verificado em gel de agarose 1%, corado com *GelRed* (Biotium Inc. Hayward, CA) (3µL/100 mL de gel), utilizando como padrão molecular 2µL de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen, Brasil).

4.4.4 Purificação do produto de PCR

Foram adicionados isopropanol 75%, na proporção 4:1 (isopropanol 75%: produto PCR) nos produtos de PCR e deixou-se *overnight* no freezer. Após este período, as amostras em microplaca foram centrifugadas por 90 minutos a 4000rpm, com o descarte do sobrenadante, as amostras foram ressuscitadas em 150µL de etanol 70% e centrifugadas na

mesma rotação e tempo que anteriormente e o sobrenadante descartado. Por último, as amostras foram secadas no termociclador modelo Gene AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems) por 10 minutos e o *pellet* ressuspensos em água Mili-Q esterilizada. A quantificação do produto foi feita em gel de agarose 1% corado com *GelRed* (Biotium Inc. Hayward, CA) (3µL/ 100 mL de gel), utilizando como padrão molecular 2µL de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen, Brasil).

4.4.5 Reação de seqüenciamento e precipitação

No seqüenciamento foi utilizado microplaca e foram efetuadas duas reações por produto de PCR obtido, um com primer PRND1 e outro com primer PRND2, preparadas com *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham, Biosciences GE). A reação foi feita em solução contendo: 2µL de DYEnamic; 2µL de tampão para PCR 2,5X (400mM Tris-HCl pH 9,0; 10mM MgCl₂); 1µL do primer a 5 pmol; 100ng de produto da amplificação purificado e água Mili-Q esterilizada para completar um volume final de 10µL. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo Gene AMP PCR System 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 30 ciclos com desnaturação de 95°C por 20 segundos, anelamento a 55°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto.

A precipitação foi efetuada com acetato de sódio 1,5m/EDTA 0,25M e etanol 100%, no qual, adicionou-se 2µL de solução de acetato de sódio/EDTA e 60µL de etanol 100%. O material foi misturado em vortex e centrifugado a 4000rpm por 45 minutos, o sobrenadante foi descartado. Em seguida, adicionou-se 150µL de etanol 70% e centrifugou-se a 4000rpm por 15 minutos, descartou-se o sobrenadante. As amostras foram secas no termociclador a 40°C por 10 minutos e foram ressuspensas em 10µL de *Hi-Di Formamide* (Applied Biosystems) e agitadas em vortex. O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador automático *ABI Prism 3100 Genetic Analyser* (Applied Biosystems).

4.4.6 Bioensaio

O teste de antagonismo *in vitro* de isolados bacteriano do gênero *Burkholderia* contra *Fusarium oxysporum* foi baseado no Método da cultura pareada ou Pareamento (MARIANO, 1993) e foi realizado em meio BDA. Isolado previamente crescido em meio líquido NA (Nutriente Agar) foi inoculado a 15 mm da borda de um lado da placa com o auxílio da

alça de platina. As suspensões de células bacterianas foram quantificadas para $10^8 - 10^9$ células/mL utilizando-se o espectrofotômetro ($A_{600} = 0,03 - 0,04$) modelo ND-2000 (Nanodrop Technologies, Waltham, EUA). Após 24 horas, disco de cerca de 10mm de diâmetro foi cortado da borda de crescimento do fungo, previamente cultivado em placas de petri contendo meio BDA (batata dextrose agar) e foi colocado a 15 mm da borda do outro lado da placa. Foram feitas 3 repetições para cada isolado, as placas foram incubadas a 28°C e a análise do experimento foi realizada quando o controle, placa com apenas o disco fúngico, apresentou crescimento de uma extremidade à outra da placa de petri.

4.4.7 Análise de seqüências e estatísticas

A partir dos resultados fornecidos pelo seqüenciador, as seqüências nucleotídicas obtidas tiveram os seus cromatogramas editadas pelo programa Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998), a fim de estabelecer a seqüência consenso e remoção de seqüências que apresentaram baixa qualidade. O nível de exigência mínima foi de qualidade de bases acima de 20 (1 erro a cada 100 bases lidas). Em seguida, as seqüências foram submetidas à análise comparativa com aquelas disponibilizadas no banco de dados GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI- www.ncbi.nlm.nih.gov). Utilizou-se a ferramenta blastx (ALTSCHUL et al., 1997) o qual compara seqüências de nucleotídeos, traduzidas nos seis frames, contra o banco de dados de proteína. Posteriormente, todas as seqüências nucleotídicas foram traduzidas *in silico* para aminoácido e alinhadas usando ClustalW através do programa BioEdit. A análise filogenética foi conduzida no programa MEGA 4.1 (TARUMA et al., 2007) pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) com valor de *bootstrap* (reamostragem) para 1000 repetições e foram incluídas seqüências do banco de dados.

Utilizando o programa MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009) baseando-se numa similaridade de 95% (*cutoff* 0,05) as seqüências foram reunidas em grupos. Para o bioensaio, foi escolhido um representante de cada grupo. Dados do ensaio de antagonismo *in vitro* foram analisados usando ANOVA no programa ASSISTAT 7.6 (SILVA, 1996) empregando a análise de comparação de médias pelo Teste de Tukey.

4.5 Amostras ambientais

4.5.1 Extração de DNA genômico do solo

O procedimento de extração de DNA foi realizado através do UltraClean[®] Mega Soil DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc.). Inicialmente foi adicionado 15mL de *solution bead* em cada tubo *50 mega bead*, que foram referidos como *Bead Solution Tubes*. Para a extração, foi adicionado 10g de solo nos *Bead Solution Tubes* os quais foram agitadas em aparelho vortex por 1minuto. Em seguida, foi adicionado 1,2mL de solução S1, sendo as amostras homogeneizadas vigorosamente por 30 segundos, depois, adicionou-se 4mL da solução IRS. As amostras foram agitadas horizontalmente no vortex por 20minutos, logo após, foram centrifugadas a 2.500g por 3minutos, depois disso, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foi adicionado 2mL de solução S2, sendo os tubos invertidos duas vezes e incubado a 4°C por 10minutos. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas por 4minutos a 2.500g. Evitando-se o pellet, o sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado 30mL de solução S3. As amostras foram invertidas duas vezes, posteriormente, a solução foi transferidas para uma coluna com filtro e o material centrifugado por 2minutos a 2.500g. O líquido dos tubos foi descartado e foi carregada novamente a solução na coluna e centrifugou-se por 2minutos a 2.500g, descartou-se o líquido. Na etapa seguinte, foi adicionado 6mL da solução S4 às amostras e estas foram centrifugadas por 3minutos, a 2.500g. O líquido foi descartado e as amostras foram centrifugadas mais uma vez durante 5minutos, a 2.500g. Finalmente, as colunas referentes a cada amostra foram transferidas para um novo tubo e adicionou-se a solução S5 no centro da coluna, os tubos foram centrifugados por 3minutos a 2.500g.

Na extração de DNA foi escolhido de forma aleatória 3 amostras das cinco e para cada uma foi feito 3 repetições, totalizando 12 extrações. A qualidade do DNA, foi verificada em gel de agarose 1% corado com *GelRed* (Biotium Inc. Hayward, CA) (3µL/ 100 mL de gel), utilizando como padrão molecular 2µL de *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen, Brasil). As amostras de DNA também foram quantificadas em espectrofotômetro modelo ND-2000 (Nanodrop Technologies, Waltham, EUA). Todas as amostras de DNA foram armazenadas em freezer, à -20 °C.

4.5.2 Desenho de primer

Primers para o gene *prnD* foram desenhados no programa Primer3 (frodo.wi.mit.edu/primer3/) a partir das seqüências do gene *prnD* de *Burkholderia cepacia* LT4-12-W (número de acesso no GenBank: AF161183), *Pseudomonas fluorescens* BL915 (número de acesso no GenBank: U74493) e *Burkholderia pyrrocinia* (número de acesso no GenBank: AF161186) disponível no banco de dados. As seqüências foram alinhadas utilizando o ClustalW no BioEdit e foi criada uma seqüência consenso a qual foi empregada para o desenho dos primers. Os seguintes critérios foram usados para desenhar os primers: tamanho do primer: 19-25pb; tamanho do produto de amplificação: 200-600pb e temperatura de *melting*: 59°C a 69°C. Para checagem dos primers, em relação à *hairpin*, *dimer-dimer*, foi utilizado o programa NetPrimer (www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html).

A especificidade dos primers e otimização das condições de PCR foi usado o DNA genômico das bactérias padrão da DSMZ e *P. chlororaphis* PHZ24.

4.5.3 PCR quantitativo e construção da curva padrão

A abundância do gene *prnD* nas amostras de solo do sítio Caldeirão Capoeira e Cultivado foi realizado através da técnica de PCR em tempo real. Visando verificar a frequência do gene biossintético para o antibiótico pirrolnitrina também foi efetuada a quantificação do gene 16S rRNA nas amostras. As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus™ Real- Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o sistema SYBR Green.

PCR tempo real para o gene *prnD*

A reação continha 10µL do Kit SYBR Green Rox qPCR (Fermentas, Brasil), 1,5µL de cada primer a 5pmol: PrnD9 (5'-ACGGCTACGTGTGGGTCTGGTA-3') (neste estudo) e PRND2 (5'- YCCCGCSGCCTGYCTGGTCTG-3') (de SOUZA; RAAIJMAKERS, 2003), 50ng de DNA total do solo e água para um volume final de 20µL. As condições de amplificação foram: uma pré-incubação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 25segundos, 67°C por 45segundos e 72°C por 50segundos e ao final da reação foi incluída uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95°C por 15 segundos, 67°C por 1 minuto e 95°C por 15segundos com leitura dos dados a cada 0,7°C. Em todas as reações foi incluído controle negativo, utilizando a água como molde ao invés de DNA.

Para curva padrão, utilizou-se DNA genômico de bactéria da DSMZ como molde nas ampliações de PCR e foi usados os primers descritos acima. O produto de PCR foi purificado e quantificado com o espectrofotômetro modelo ND-2000 (Nanodrop Technologies, Waltham, EUA) para fim de calcular o número de cópias de genes em μL^{-1} com base no número de pares de bases e o peso molecular de bases em DNA da fita dupla (660 Da). Diluições seriadas foram feita de 10^{10} a 10^2 gene μL^{-1} .

As amostras de solos e curva padrão foram amplificadas por PCR em tempo real em triplicatas para avaliar a confiabilidade da quantificação.

PCR tempo real para o gene 16S rRNA

A reação de PCR foi realizada em solução contendo 5 μL do Kit SYBR Green Rox qPCR (Fermentas, Brasil), 1,0 μL de cada primer a 2,5pmol (U968–5'CGAACGAGAACCTTAC-3' e R1387-5'CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') (HEUER et al., 1997), 20ng de DNA genômico do solo e água para um volume final de 10 μL . As condições de amplificação foram: uma pré-incubação a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30segundos, 56°C por 30segundos e 72°C por 40segundos e ao final da reação foi incluída uma curva de *melting* nas seguintes condições: 95°C por 15 segundos, 56°C por 1 minuto e 95°C por 15segundos com leitura dos dados a cada 0,7°C. Em todas as reações foi incluído controle negativo, usando a água como molde ao invés de DNA. Para cada amostra e a curva padrão foram feitos em triplicata.

Para construir a curva padrão, utilizou-se o um clone obtido a partir de biblioteca 16S rRNA que foi amplificada com os primers descritos acima. O produto de PCR foi purificado e quantificado com o espectrofotômetro modelo ND-2000 (Nanodrop Technologies, Waltham, EUA) e diluições seriadas foram feita, de 10^{10} a 10^2 gene μL^{-1} .

4.5.4 Análises estatísticas

Os dados da química dos solos e os de PCR em tempo real foram analisados no programa ASSISTAT 7.6 (SILVA, 1996) utilizando ANOVA. A análise de comparação de médias foi pelo Teste de Tukey, quando necessário, os dados foram transformados (log ou raiz quadrada). A correlação dos parâmetros dos solos com os dados de abundância de PCR quantitativo foram analisados no programa STATISTICA 10 (Statsoft, Tulsa, OK) utilizando a ferramenta correlação de matrizes com normalização dos dados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química do solo

Neste estudo foram coletadas amostras de solos nos sítios de Terra Preta Antropogênica do Caldeirão Capoeira e Caldeirão Cultivado e dos seus respectivos solos adjacentes na profundidade de 0-10 cm. As características químicas dos solos dos sítios estudados e a análise comparativa das médias pelo teste de Tukey estão apresentadas na Tabelas 2 e 3.

Solos de Terra Preta Antropogênica apresentaram um pH mais alto em relação aos solos adjacentes. Os resultados de ANOVA demonstraram diferenças significativas entre pH de TPA e solos ADJ tanto para o sítio Capoeira ($P= 0.0102$) como para o Cultivado ($P= 0.009$). Nas TPAs, a relação inversa do teor de Al com o pH é muito evidente, isto é, quanto maior os valores de pH menor são as concentrações de Al (FALCÃO et al., 2009), isto pode ser verificado na Tabela 2.

Diferente dos latossolos, neossolos, os solos antrópicos (TPA) apresentam altas concentrações dos micronutrientes, Mn e Zn, mas baixos teores de Fe (Tabela 2). Nos sítios Capoeira e Cultivado, os valores de Zinco e Manganês exibidos foram mais elevados de forma significativa que dos seus solos adjacentes e a quantidade de Fe nas TPAs foi significativamente menor também, apresentando $P<0.001$. Nas TPAs, a menor quantidade de Fe está provavelmente associada aos elevados teores e da forma de como o carbono orgânico é encontrado nestes solos, que atuam como complexantes do Fe (MADARI et al., 2007).

As Terras Pretas apresentam maiores teores de carbono orgânico, cálcio e magnésio, maior pH, saturação por bases e menor teor de alumínio trocável, propriedades que são responsáveis pela melhor qualidade das TPAs em relação à sua fertilidade (MADARI et al., 2009). Na análise de solo, nos dois sítios, as TPAs apresentaram valores significativamente maiores para o cálcio, magnésio e soma de bases que os solos adjacentes. No sítio Cultivado, o teor de carbono e matéria orgânica em TPA foi significativamente maior que no solo da adjacência. Para o sítio Capoeira esta diferença não foi significativa (Tabela 3), no entanto, os valores de matéria orgânica e carbono, tanto em TPA como solo ADJ, foram maiores que no sítio Cultivado, possivelmente devido à vegetação do sítio ser floresta onde existe mais serrapilheira e não haver perturbação. Segundo MADARI et al. (2009) a distribuição da matéria orgânica é variável no solo e isso depende de vários fatores como cobertura vegetal, práticas de uso e manejo do solo e condições climáticas.

Admitindo-se que as TPAs são solos decorrentes de atividades antrópicas, o fósforo (P), em especial, é o elemento mais significativo da ocupação humana. O teor de P das TPAs é atribuído às cinzas oriundas de fogueiras, ossos de peixe e de outros animais, fezes, urina e cascos de tartaruga (SMITH, 1980). Os resultados da análise do solo e de ANOVA mostram que as TPAs apresentaram teores de P significativamente mais elevados que dos solos adjacentes. Existe uma relação direta entre quantidade de matéria orgânica, CTC (capacidade de troca catiônica) e disponibilidade de fósforo e de nutrientes. A análise do solo (Tabela 2) demonstra que as TPAs são realmente solos de alta fertilidade (FALCÃO et al., 2009).

Tabela 2 - Características químicas das amostras de solo deste estudo

Amostras	pH	C	M.O	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	V	m	Fe	Zn	Mn	Cu
	H2O	g/kg	mg/dm3	cmolc/dm3							%	mg/dm3							
TPACAP	4.45	39.8	68.46	275	87.00	6.00	10.41	1.43	1.19	11.34	12.09	13.28	23.42	51.61	8.96	44	10.06	102.94	1.37
TPACAP	5.57	38.96	67.02	143	59.00	4.00	11.33	1.5	0.00	7.56	13	13	20.56	63.24	0.00	27	14.77	123	1.51
TPACAP	5.51	26.35	45.33	143	30.00	3.00	6.10	1.44	0.00	6.20	7.63	7.63	13.83	55.15	0.00	22	16.85	75.41	1.11
ADJCAP	3.53	35.87	61.7	9.00	35.00	4.00	0.64	0.25	2.27	12.26	1.00	3.27	13.26	7.52	69.48	307	0.70	3.77	0.08
ADJCAP	3.48	25.14	43.24	10.0	30.00	6.00	0.15	0.13	2.11	10.97	0.38	2.49	11.36	3.37	84.64	286	0.36	2.46	0.11
ADJCAP	3.52	20.99	36.1	5.00	25.00	11.0	0.41	0.14	1.97	9.27	0.66	2.63	9.93	6.66	74.85	341	0.65	2.73	0.09
TPACULT	5.32	27.53	47.35	148.00	25.00	3.00	7.52	1.33	0.04	8.27	8.93	8.97	17.19	51.92	0.45	24	14.58	53.10	1.18
TPACULT	5.24	34.35	58.09	144.00	78.00	3.00	10.03	1.42	0.03	6.91	11.66	11.69	18.58	62.78	0.26	26	14.26	135.71	1.11
TPACULT	5.74	25.48	43.82	231.00	32.00	3.00	8.24	2.00	0.00	6.85	10.33	10.33	17.18	60.15	0.00	25	8.97	52.75	1.70
ADJCULT	4.47	16.16	27.79	4.00	21.00	2.00	0.73	0.51	0.77	6.55	1.30	2.07	7.85	16.58	37.15	217	0.38	1.74	0.09
ADJCULT	3.75	16.06	27.62	3.00	25.00	1.00	0.03	0.06	1.70	7.03	0.16	1.86	7.19	2.20	91.48	198	0.32	1.25	0.08
ADJCULT	3.56	17.58	30.23	7.00	32.00	2.00	0.09	0.08	1.93	7.74	0.26	2.19	8.00	3.26	88.11	216	0.90	1.89	0.02

t: capacidade de troca catiônica efetiva; T: capacidade de troca catiônica a pH 7,0; SB: Somo de bases traçáveis; V: índice de Saturação por Bases; m: índice de saturação por Alumínio

Tabela 3 - Resultado da análise de ANOVA através da comparação de médias pelo Teste de Tukey

	pH	C	M.O	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	V	m	Fe	Zn	Mn	Cu
	H ₂ O	g/kg	mg/dm ³	cmolc/dm ³									%	mg/dm ³					
TPACAP	5.18	35.04	60.27	187.00	58.67	4.33	9.28	1.46	0.40	8.37	10.91	11.30	19.27	56.67	2.99	31.00	13.89	100.45	1.33
ADJCAP	3.51	27.33	47.01	8.00	30.00	7.00	0.40	0.17	2.12	10.83	0.68	2.80	11.52	5.85	76.32	311.33	0.57	2.99	0.09
P-value	0.0102	0.2825	0.2823	0.0153	0.1612	0.3034	0.0054	<0.001**	0.013	0.2346	0.0036	0.0101	0.061	<0.001	<0.001	<0.001	0.0027	0.0021	<0.001
TPACULT	5.43	29.12	49.75	174.33	45.00	3.00	8.60	1.58	0.02	7.34	10.31	10.33	17.65	58.28	0.24	25.00	12.60	80.52	1.33
ADJcult	3.93	16.60	28.55	4.67	26.00	1.67	0.28	0.22	1.47	7.11	0.57	2.04	7.68	7.35	72.25	210.33	0.53	1.63	0.06
P-value	0.009	0.0101	0.0083	0.0039	0.3244	0.0161	<0.001	0.0059	0.0152	>0.05	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.0149	<0.001	0.0027	0.046	0.0025

t: capacidade de troca catiônica efetiva; T: capacidade de troca catiônica a pH 7,0; SB: Soma de bases traçáveis; V: índice de Saturação por Bases; m: índice de saturação por Alumínio

5.2 Estudo com isolados bacterianos

5.2.1 Detecção por PCR do gene *prnD* em isolados de *Burkholderia* e *Pseudomonas*

O gene *prnD* é um dos quatro genes do operon que codifica para biossíntese da pirrolnitrina (PRN), um antibiótico com ampla atividade contra vários fungos fitopatogênicos (LIGON et al., 2000). O DNA extraído dos isolados bacterianos da Coleção de Cultura do Laboratório de Biologia Celular e Molecular foram quantificados em espectrofotômetro e diluído. Foram utilizados, através da técnica de PCR com os primers PRND1 e PRND2, para detectar a presença do gene *prnD* e o resultado foi verificado em gel de agarose a 1%. Para controle positivo, foram utilizadas as bactérias padrão da DSMZ e estirpe cedida de Wageningen-Holanda.

Do total de 175 *Burkholderia* da coleção, 60 isolados apresentaram amplificação positiva para o gene *prnD* resultando em 35%. Das *Pseudomonas*, apenas em 7% dos isolados obteve a presença do gene. Em relação ao “tipo” de solo, na TPA foi detectado o gene para pirrolnitrina em 26 isolados (24 em *Burkholderia* e 2 em *Pseudomonas*) e na ADJ, 37 isolados tiveram amplificação de PCR positiva, sendo 36 em *Burkholderia* e 1 de *Pseudomonas*. Dessa forma, do total de 219 isolados, 63 (aproximadamente 30%), entre *Burkholderia* e *Pseudomonas*, apresentaram o gene *prnD* (Figura 8).

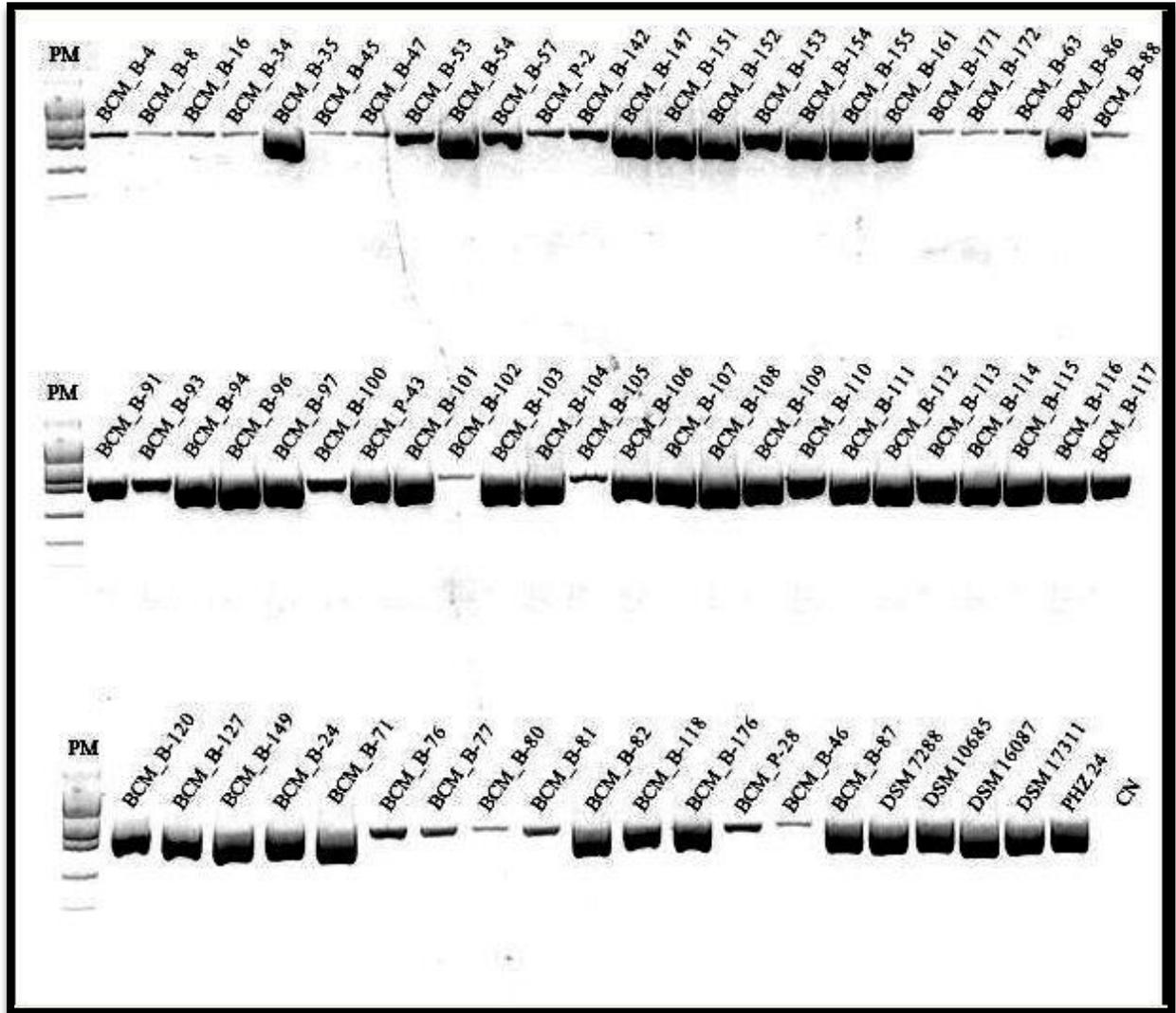


Figura 8 - Gel de agarose da amplificação positiva do gene *prnD* dos 63 isolados, das bactérias padrão da DMSZ e *Pseudomonas chlororaphis* PHZ24. PM: padrão molecular *Low mass DNA Ladder*. CN: controle negativo

5.2.2 Identificação molecular do gene *prnD*

Todos os 63 produtos de PCR com amplificação positiva para o gene *prnD*, fragmento de 786bp, foram purificados com isopropanol 75% e seqüenciados com os primers, PRND1 e PRND2. Posteriormente as seqüências obtidas foram analisadas no programa Phred/Phrap/Consed para verificar a qualidade e estabelecer a seqüência consenso.

As seqüências do gene foram comparadas com o banco de dados do GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando a ferramenta blastx. Foram considerados principalmente o e-value (probabilidade de alinhamento ao acaso) menores que 10^{-5} e a similaridade (identidade).

As seqüências obtidas neste estudo apresentaram boa similaridade ($\geq 90\%$) em relação aos do banco de dados do GenBank, confirmando que as amplificações positivas de PCR são de fato a proteína de estudo. Deste modo, 63 isolados deste estudo apresentam o gene *prnD*.

Os resultados voltadas do banco de dados não foram muito diversas, ficando em torno de 9 descrições diferentes. A proteína Rieske (2Fe-2S), retornado da análise de comparação com o NCBI, pertence a região *Rieske_RO_Alpha_prnD* que representa o domínio N-terminal da subunidade alfa oxygenase da oxygenase aminopirrolnitrina (*prnD*). *prnD* é uma N-oxygenase que catalisa a etapa final da biossíntese de pirrolnitrina. Na Tabela 4 encontram-se os resultados da análise comparativa das seqüências obtidas deste estudo com as do banco de dados.

Tabela 4 - Resultado da análise comparativa das seqüências obtidas neste estudo com as do banco de dados do GenBank

ISOLADO	ORIGEM DO ISOLADO	GENBANK	DESCRIÇÃO	E VALUE	IDENTIDADE	REFERÊNCIA
BCM_B-4	TPA	ABR08705.1	<i>prnD</i> [Burkholderia cenocepacia]	2.00E-87	95%	MENDES et al. (2007)
BCM_B-8	TPA	YP_001774582.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia cenocepacia MC0-3]	2.00E-121	100%	COPELAND et al. (2010)
BCM_B-16	TPA	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	2.00E-103	98%	COPELAND et al. (2010)
BCM_B-24	TPA	ZP_02359724.1	<i>prnD</i> [Burkholderia oklahomensis EO147]	2.00E-125	97%	READ et al. (2007)
BCM_B-63	TPA	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	7.00E-117	93%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-71	TPA	CAQ53705.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. LMG1222]	3.00E-99	100%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-76	TPA	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	4.00E-122	92%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-77	TPA	ZP_02381195.1	<i>prnD</i> [Burkholderia ubonensis Bu]	4.00E-95	95%	READ et al. (2007)
BCM_B-80	TPA	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	6.00E-102	93%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-81	TPA	ZP_02889110.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia ambifaria IOP40-10]	3.00E-128	93%	COPELAND et al. (2008)
BCM_B-82	TPA	ZP_02359724.1	<i>prnD</i> [Burkholderia oklahomensis EO147]	8.00E-84	96%	READ et al. (2007)
BCM_B-86	TPA	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	6.00E-122	95%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-87	TPA	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	1.00E-60	91%	COPELAND et al. (2010)
BCM_B-88	TPA	ZP_02359724.1	<i>prnD</i> [Burkholderia oklahomensis EO147]	7.00E-137	97%	READ et al. (2007)
BCM_B-91	TPA	ZP_02359724.1	<i>prnD</i> [Burkholderia oklahomensis EO147]	4.00E-115	97%	READ et al. (2007)
BCM_B-93	TPA	ZP_02381195.1	<i>prnD</i> [Burkholderia ubonensis Bu]	1.00E-36	90%	READ et al. (2007)
BCM_B-94	TPA	ZP_02359724.1	<i>prnD</i> [Burkholderia oklahomensis EO147]	6.00E-92	95%	READ et al. (2007)
BCM_B-120	TPA	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	3.00E-124	95%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-142	TPA	CAQ53705.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. LMG1222]	4.00E-132	100%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-147	TPA	CAQ53705.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. LMG1222]	7.00E-133	100%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-149	TPA	CAQ53705.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. LMG1222]	6.00E-108	99%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-151	TPA	CAQ53705.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. LMG1222]	8.00E-119	100%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-152	TPA	CAQ53705.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. LMG1222]	3.00E-128	100%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-153	TPA	CAQ53705.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. LMG1222]	2.00E-131	100%	COSTA et al. (2009)
BCM_P-2	TPA	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	5.00E-138	95%	COPELAND et al. (2010)

(Continua)

							(Continuação)
BCM_P-28	TPA	ZP_02381195.1	<i>prnD</i> [Burkholderia ubonensis Bu]	1.00E-110	94%	READ et al. (2007)	
BCM_B-34	ADJ	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	4.00E-85	98%	COPELAND et al. (2010)	
BCM_B-35	ADJ	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	3.00E-124	94%	COSTA et al. (2009)	
BCM_B-45	ADJ	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	1.00E-69	91%	COPELAND et al. (2010)	
BCM_B-46	ADJ	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	2.00E-63	93%	COPELAND et al. (2010)	
BCM_B-47	ADJ	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	2.00E-109	95%	COSTA et al. (2009)	
BCM_B-53	ADJ	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	2.00E-141	97%	COPELAND et al. (2010)	
BCM_B-54	ADJ	ABR08705.1	<i>prnD</i> [Burkholderia cenocepacia]	3.00E-116	96%	MENDES et al. (2007)	
BCM_B-57	ADJ	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	4.00E-126	97%	COPELAND et al. (2010)	
BCM_B-96	ADJ	ZP_02359724.1	<i>prnD</i> [Burkholderia oklahomensis EO147]	1.00E-116	97%	READ et al. (2007)	
BCM_B-97	ADJ	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	2.00E-121	95%	COSTA et al. (2009)	
BCM_B-100	ADJ	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	9.00E-131	96%	COPELAND et al. (2010)	
BCM_B-101	ADJ	ZP_02359724.1	<i>prnD</i> [Burkholderia oklahomensis EO147]	3.00E-79	95%	READ et al. (2007)	
BCM_B-102	ADJ	ZP_02359724.1	<i>prnD</i> [Burkholderia oklahomensis EO147]	1.00E-76	100%	READ et al. (2007)	
BCM_B-103	ADJ	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	4.00E-128	95%	COSTA et al. (2009)	
BCM_B-104	ADJ	AAD46373.1	<i>prnD</i> [Burkholderia pyrrocinia]	8.00E-119	96%	HAMMER et al. (1999)	
BCM_B-105	ADJ	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	6.00E-56	81%	COSTA et al. (2009)	
BCM_B-106	ADJ	ZP_02359724.1	<i>prnD</i> [Burkholderia oklahomensis EO147]	3.00E-141	97%	READ et al. (2007)	
BCM_B-107	ADJ	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	2.00E-130	96%	COPELAND et al. (2010)	
BCM_B-108	ADJ	ZP_02359724.1	<i>prnD</i> [Burkholderia oklahomensis EO147]	8.00E-102	97%	READ et al. (2007)	
BCM_B-109	ADJ	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	5.00E-113	96%	COPELAND et al. (2010)	
BCM_B-110	ADJ	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	4.00E-127	95%	COSTA et al. (2009)	
BCM_B-111	ADJ	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	6.00E-126	96%	COPELAND et al. (2010)	
BCM_B-112	ADJ	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	3.00E-119	95%	COSTA et al. (2009)	
BCM_B-113	ADJ	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	3.00E-120	100%	COPELAND et al. (2010)	
BCM_B-114	ADJ	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	3.00E-123	95%	COSTA et al. (2009)	

(Continua)

						(Conclusão)
BCM_B-115	ADJ	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	3.00E-123	95%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-116	ADJ	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	2.00E-122	95%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-117	ADJ	AAD46373.1	<i>prnD</i> [Burkholderia pyrrocinia]	2.00E-119	100%	HAMMER et al. (1999)
BCM_B-118	ADJ	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	8.00E-130	96%	COPELAND et al. (2010)
BCM_B-127	ADJ	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	2.00E-117	95%	COPELAND et al. (2010)
BCM_B-154	ADJ	CAQ53705.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. LMG1222]	2.00E-132	100%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-155	ADJ	CAQ53705.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. LMG1222]	3.00E-131	99%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-161	ADJ	CAQ53705.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. LMG1222]	1.00E-128	100%	COSTA et al. (2009)
BCM_B-171	ADJ	ZP_02381195.1	<i>prnD</i> [Burkholderia ubonensis Bu]	4.00E-119	94%	READ et al. (2007)
BCM_B-175	ADJ	ZP_02381195.1	<i>prnD</i> [Burkholderia ubonensis Bu]	4.00E-119	93%	READ et al. (2007)
BCM_B-176	ADJ	CAQ53706.1	aminopyrrolnitrin oxygenase [Burkholderia sp. BS067]	8.00E-120	92%	COSTA et al. (2009)
BCM_P-43	ADJ	YP_366402.1	Rieske (2Fe-2S) protein [Burkholderia sp. 383]	6.00E-123	96%	COPELAND et al. (2010)

5.2.2 Construção filogenética do gene *prnD*

No programa BioEdit, todas as seqüências nucleotídicas obtidas do seqüenciamento foram traduzidas *in silico* para aminoácido e alinhadas. A análise filogenética foi efetuada no programa MEGA 4.1 (TARUMA et al., 2007) pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987) com valor de *bootstrap* para 1000 repetições. Para a construção da árvore de filogenia do gene *prnD*, foram incluídas seqüências disponíveis do banco de dados do NCBI e alinhadas com as seqüências do presente estudo. A seqüência de *Myxococcus fulvus* fl47 (GenBank AF161185) foi utilizada como grupo externo (Figura 9).

Na análise, foi observado que a maioria das seqüências do gene *prnD* dos isolados não se agruparam com as seqüências de referência, mostrando características genéticas distintas. O grupo de isolados da base da árvore é um exemplo desta distância genética e pode-se observar também que várias seqüências dos isolados apresentaram similaridade entre si.

O grupo de isolados do começo da árvore separou-se conforme a origem, os isolados: 47, 113, 109, 111, 100, 118, 101, 43, 107 e 127 são de solos adjacentes e os isolados 63, 28, 81, 80 e 76 de Terra preta Antropogênica. Contudo, de modo geral, as seqüências se agruparam de forma aleatória, sem relacionar com a origem.

Os isolados 153, 151 apresentaram características genéticas semelhantes as seqüências do banco de dados: ZP_02381195 *Burkholderia ubonensis* Bu e ZP_02889110 *B. ambifaria*. Os dois isolados: 152 e 71 se assemelharam com CAQ 53705 *B. sp.* LMG 1222.

O isolado 35 se apresentou no mesmo clado que a seqüência de referência: YP_366402 *Burkholderia* sp. 383 que em estudo anterior (SCHMIDT et al., 2009) exibiu atividade antigúngica contra Oomycota e Basidiomycota. O isolado 104 mostrou estar no mesmo clado que a seqüência do banco de dados: ZP_02359724 *B. oklahomensis* BO147. No grupo das patogênicas, as que são encontradas em pacientes com fibrose cística, o isolado 8 apresentou-se no mesmo clado que AF161183 *B. cepacia* e próxima à *Burkholderia cenocepacia* BSS4 (ABR08705).

De forma surpreendente, os isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, as seqüências do gene *prnD* agruparam na árvore sem similaridade com as seqüências de referências de *Pseudomonas*, relacionaram-se com os isolados do gênero *Burkholderia*. O mesmo foi observado para a seqüência do banco de dados: AAB97507 *Pseudomonas*

fluorescens BL915 que apresentou se no mesmo clado que a sequência de referência: *Burkholderia pyrrocinia* AF161186. Este resultado indica que pode ocorrer transferência lateral de genes (de SOUZA; RAAIJMAKERS, 2003).

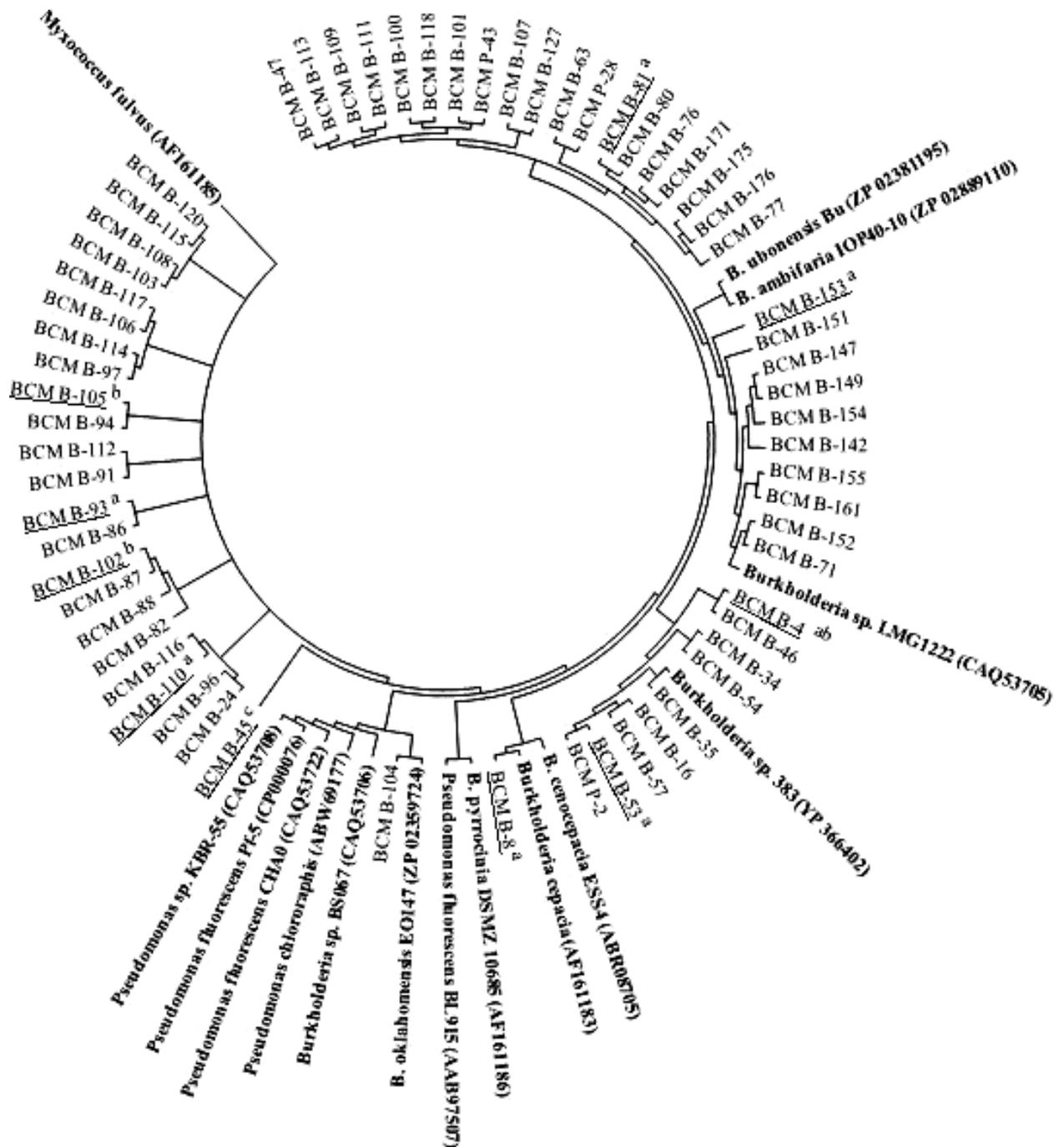


Figura 9 - Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-Joining* com sequências do gene *prnD* dos isolados deste estudo. Sequências de referências obtidas do banco de dados (GenBank) em negrito. Isolados usados no bioensaio sublinhado; as mesmas letras não diferem estatisticamente entre si em relação à atividade antimicrobiana contra *F. oxysporum*.

5.2.3 Teste de antagonismo

Estudos anteriores (EL-BANNA; WINKELMANN, 1998; TRIPATHI; GOTTLIEB, 1969) demonstraram o efeito da pirrolnitrina contra Ascomycota, Actinobactéria, Basidiomycota e em Firmicutes. Neste estudo foi empregado o bioensaio com a finalidade de verificar se os isolados que exibem potencial genético de produção para pirrolnitrina, tem bioatividade, e se os mesmo apresentam desempenho no controle biológico de similar intensidade.

As seqüências das 63 ampliações positivas foram analisadas no programa MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009) baseando-se numa similaridade de 95% (*cutoff* 0,05) o qual reuniu-as em 10 grupos distintos (Tabela 5). Foi escolhido um representante de cada grupo para o bioensaio. Os dados de zona de inibição, em milímetros, foram submetidos à análise estatística utilizando o Teste de Tukey.

Os representantes de cada grupo “escolhidos” pelo MOTHUR foram todos do gênero *Burkholderia* (Tabela 5), assim, pelo método de pareamento (MARIANO, 1993) testou-se a atividade antimicrobiana dos destes isolados contra o fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum*. O bioensaio foi feito em triplicata para cada isolado.

De acordo com trabalhos precedentes (COENYE et al., 2001; ROBERTS et al., 2005; SCHMIDT et al., 2009), neste estudo foi observado que várias estirpes de *Burkholderia* exibiram intensa atividade antifúngica contra Ascomycota. A Figura 10 mostra que atividade antimicrobiana do isolado representante de cada grupo foi bastante pronunciada, com exceção do isolado BCM_B-45 que exibiu menor controle em relação aos outros.

Tabela 5 - Agrupamento das seqüências pelo programa MOTHUR e representante de cada grupo (em destaque)

GRUPO	ISOLADOS
I	BCM_B-57; BCM_B-35; BCM_P-2; BCM_B-34; BCM_B-16; BCM_B-4 ; BCM_B-46
II	BCM_B-8
III	BCM_B-104; BCM_B-47; BCM_B-94; BCM_B-97; BCM_B-88; BCM_B-82; BCM_B-108; BCM_B-120; BCM_B-114; BCM_B-86; BCM_B-110 ; BCM_B-115; BCM_B-103; BCM_B-116; BCM_B-96; BCM_B-112; BCM_B-91; BCM_B-24; BCM_B-117; BCM_B-106; BCM_B-87
IV	BCM_B-45
V	BCM_B-101; BCM_B-111 ; BCM_B-118; BCM_B-127; BCM_P-43; BCM_B-113; BCM_B-109; BCM_B-107; BCM_B-100; BCM_B-54; BCM_B-53
VI	BCM_B-81 ; BCM_P-28; BCM_B-76; BCM_B-176; BCM_B-175; BCM_B-171; BCM_B-77; BCM_B-80; BCM_B-63
VII	BCM_B-149; BCM_B-161; BCM_B-154; BCM_B-152; BCM_B-147; BCM_B-153 ; BCM_B-151; BCM_B-142; BCM_B-71; BCM_B-155
VIII	BCM_B-93
IX	BCM_B-102
X	BCM_B-105

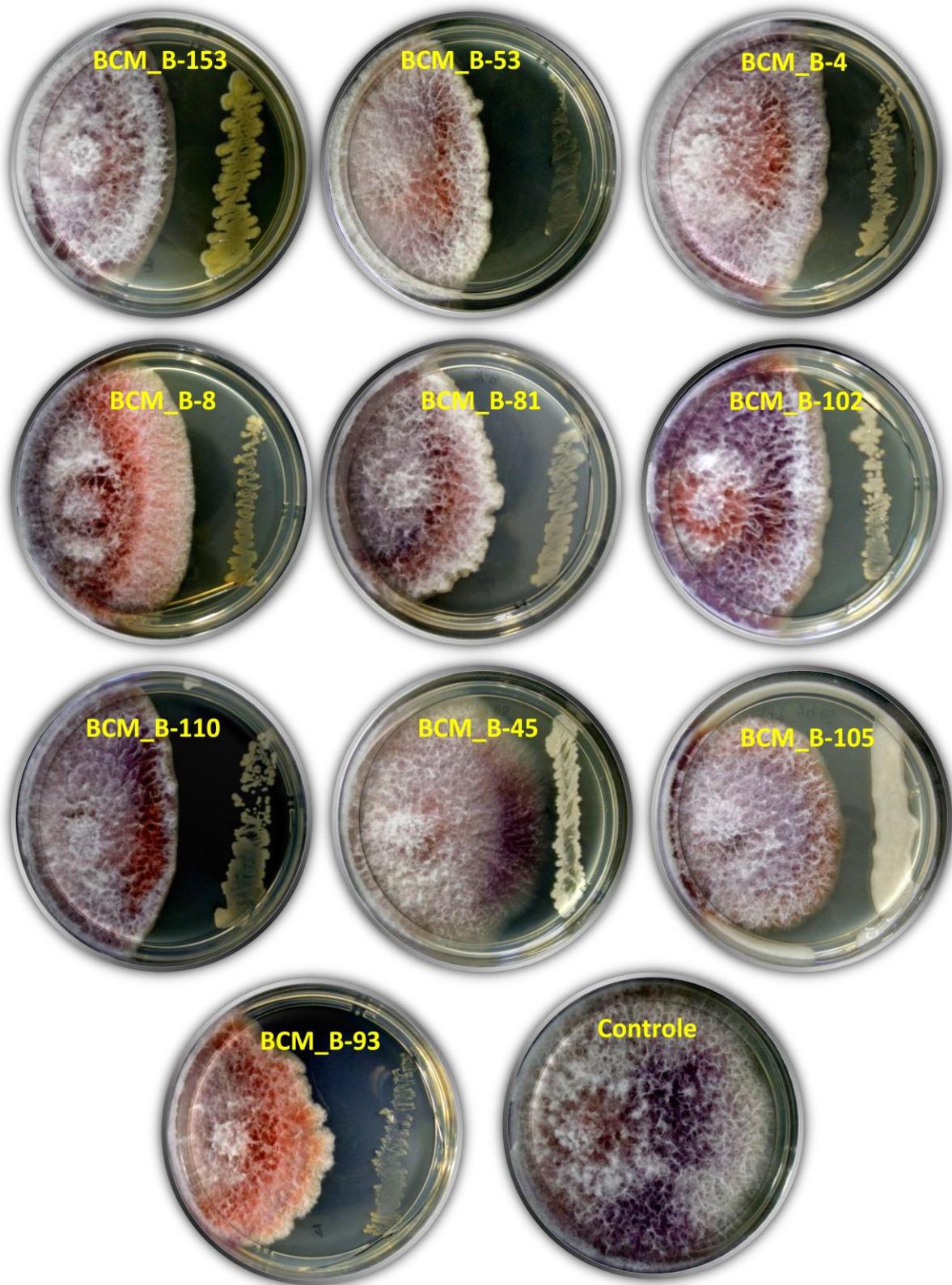


Figura 10 - Teste de antagonismo com representante de cada grupo contra o fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum*

Pelo Teste de Tukey a capacidade de biocontrole dos isolados tiveram diferenças significativas. Os isolados BMC_B-81, BCM_B-110, BCM_B-53, BCM_B-8, BCM_B-153 e BCM_B-93 foram os que tiveram maior atividade contra *Fusarium oxysporum* seguido de BCM_B-4, BCM_B-105 e BCM_B-102, e por fim, o isolado BCM_B-45 (Tabela 6). Na árvore filogenética pode-se verificar que os isolados representantes de cada grupo ficaram distribuídos ao longo da árvore. Além disso, mostra que os isolados bacterianos que exibiram forte atividade antifúngica foram encontradas tanto próximas as sequências de referências como em agrupamentos não relacionados com as sequências do banco de dados (Figura 9).

Além de exibirem maior atividade antimicrobiana pela análise estatística, em relação à análise visual, os isolados BCM_B-93 e BCM_B-81 também apresentaram um forte efeito antagonista, observando-se que também houve inibição de crescimento do fungo pelas bordas. Apesar da presença do gene *prnD* no isolado BCM_B-45, a produção de pirrolnitrina pelo mesmo foi menor, mostrando menos controle do fungo quando comparado com os outros isolados deste estudo.

Tabela 6 - Médias das zonas de inibição do ensaio de antagonismo dos isolados *Burkholderia* contra *Fusarium oxysporum* pelo Teste de Tukey

ISOLADO	Médias das zonas de inibição (mm)
BCM_B-153	18.7 a
BCM_B-53	18.3 a
BCM_B-4	16 ab
BCM_B-8	17 a
BCM_B-81	18.7 a
BCM_B-102	11.3 b
BCM_B-110	18 a
BCM_B-45	5.3 c
BCM_B-105	11 b
BCM_B-93	17.7 a

P<0.001 e médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si

5.3 Amostras ambientais

5.3.1 Extração de DNA total do solo

As amostras de solo de TPA e dos respectivos solos adjacentes coletados dos sítios Caldeirão Capoeira e Caldeirão Cultivado foram submetidos à extração de DNA genômico utilizando o UltraClean[®] Mega Soil DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc.), para cada amostra foram feitas extrações em triplicata. A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose de 1%, o padrão molecular utilizado foi o *Low mass DNA Ladder* (Invitrogen, Brasil). Na Figura 11 mostra que os DNA extraídos apresentaram boa qualidade e pureza e o rendimento foi suficiente para as ampliações em PCR quantitativo.

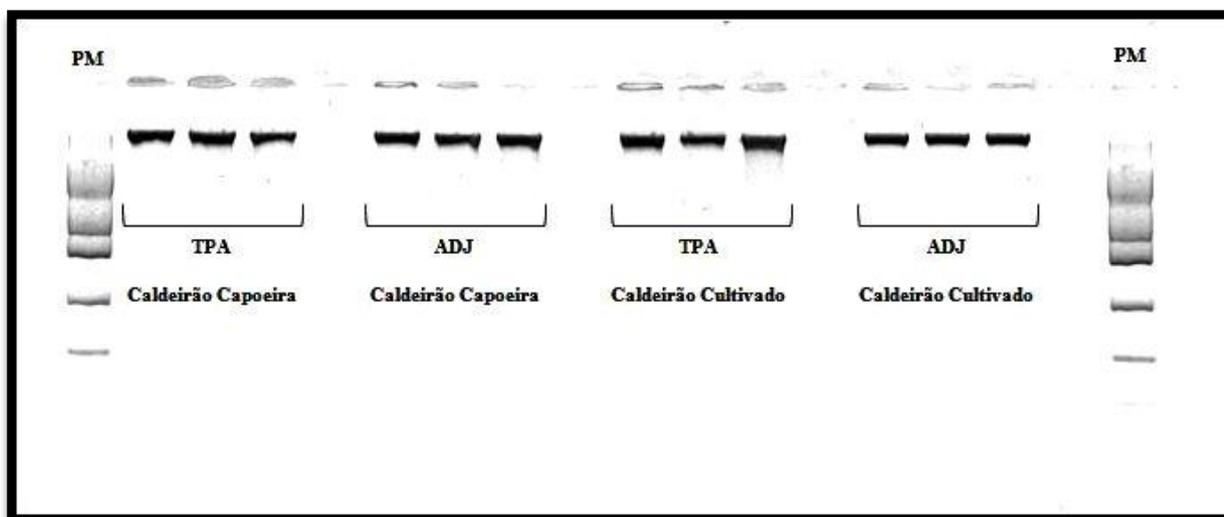


Figura 11 - Gel de agarose do DNA total dos solos de TPA e seus respectivos solos adjacentes. PM: padrão molecular *Low mass DNA Ladder*

5.3.2 Desenho de primer e avaliação da especificidade utilizando a técnica de PCR

Na literatura há relatos de primers para o gene da pirrolnitrina, como os PRND1 e PRND2 (de SOUZA; RAAIJMAKERS, 2003) que foram usados neste estudo para detectar a presença deste gene em isolados bacterianos, no entanto, o produto amplificado de 786pb, não sendo adequado para ser utilizado na técnica de PCR quantitativo. Garbeva et al. (2004) desenharam primers para o gene *prnD* para ser aplicado em PCR quantitativo mas

desenvolvido para o sistema TaqMan. Desse modo, no presente estudo, primers específicos para o gene *prnD* foram desenhados a partir das seqüências de *prnD* disponíveis no banco de dados do GenBank. Para testar a especificidade dos primers e otimização das condições de PCR foi usado o DNA genômico das bactérias padrão do Banco de Culturas da Alemanha (DSMZ) e da *Pseudomonas chlororaphis* PHZ24 (Tabela 1).

Dos 16 primers desenhados e testados, o PrnD8 e PrnD9 (Tabela 7) em combinação com o primer da literatura PRND2 apresentaram amplificação positiva. Contudo, o primer PrnD 9 exibiu ser mais específico. (Figura 12)

O novo primer desenhado neste estudo, PrnD9, mostrou ser altamente específico para o gene *prnD*. A visualização dos produtos de PCR em gel de agarose indicou a presença de uma única banda, sem amplificação inespecífica e no tamanho esperado. Comparando com os primers da literatura (PRND1 e PRND2), o fragmento amplificado foi menor e mostrou-se ter a mesma especificidade (Figura 12).

Tabela 7 - Primers desenhados e testados neste estudo com amplificação positiva para o gene *prnD*

Primer	Seqüência (5'-3')	Comprimento (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
PrnD8	CGCAGATGAACCTGCACTTCG	21	68	Este estudo
PrnD9	ACGGCTACGTGTGGGTCTGGTA	22	67	Este estudo

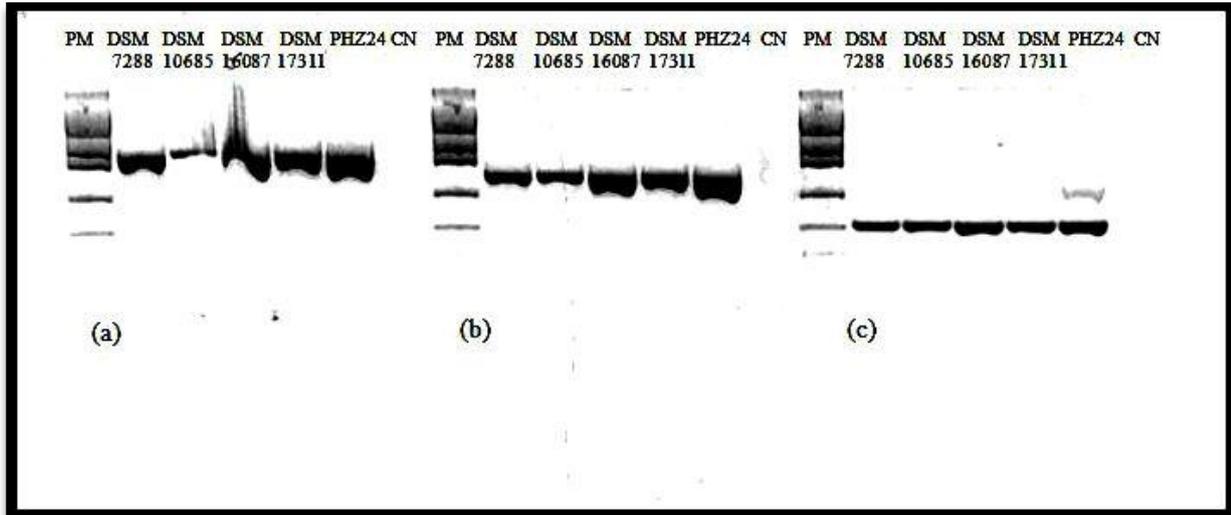


Figura 12 - Gel de agarose da amplificação do gene *prnD* das bactérias padrão da DMSZ e *Pseudomonas chlororaphis* PHZ24 utilizando os pares de primers: PRND1/ PRND2 com tamanho de produto 786pb (a); PrnD9/ PRND2 fragmento de 568pb (b) e PrnD8 / PRND2 com *amplicon* de 217pb (c). PM: padrão molecular *Low mass DNA Ladder*; CN: controle negativo

5.3.3 PCR quantitativo em tempo real

A técnica de PCR em tempo real quantifica DNA utilizando sonda fluorescente para detectar o produto (SCHROEDER et al., 2006). Monitorando a fluorescência durante cada ciclo (WHITTEWER et al., 1997) permite que o início da fase logarítmica da amplificação seja identificado a fim de calcular a concentração inicial do DNA alvo (BATES et al., 2001). No ciclo em que o sinal fluorescente cruza a linha de *threshold*, conhecida como Ct, inicia a detecção da fase exponencial da amplificação e este valor é inversamente proporcional à quantidade de DNA alvo existente na amostra (MAVRODI et al., 2007).

Na PCR-tempo real utilizando o método SYBR Green, a especificidade é estabelecida adicionando-se um ciclo para curva de *melting* ao final da corrida. Cada produto formado terá um distinto *melting* baseado no comprimento e composição do produto, fornecendo dessa forma, a confirmação de uma amplificação específica (SCHROEDER et al., 2006). O emprego de qPCR tem permitido a quantificação precisa e cultivo-independente de uma variedade de microrganismos associados ao solo ou planta (FERNÁNDEZ et al., 2010; SCHENA et al., 2004).

PCR quantitativo também tem sido aplicado para quantificação direta de populações de bactérias em diversos ambientes diferentes: *Pseudomonas stutzeri* em sedimentos de lago (GRUNTZIG et al., 2001); bactérias oxidadoras de amônia em solo (OKANO et al., 2004); *Escherichia coli* O157:H7 em solo, estrume (IBEKWE et al., 2003) e *Streptococcus pneumoniae* em secreções nasofaríngeas (GREINER et al., 2001). Recentemente, PCR em tempo real tem sido empregado com sucesso na detecção e quantificação de patógenos de solo em amostras de planta e solo (FERNÁNDEZ et al., 2010; OKUBARA et al., 2005), quantificação do gene *PhlD*, um gene chave para a produção do antibiótico 2,4-Diacetylphloroglucinol, em rizosfera de planta (MAVRODI et al., 2007) e de genes de PAH-RHD α em amostras de solo e sedimentos (CÉBRON et al., 2008).

No presente estudo, foi desenvolvida uma metodologia de PCR em tempo real, utilizando o sistema SYBER Green, para a detecção e quantificação do gene *prnD* em amostras ambientais. DNA das bactérias padrão *Burkholderia ubonensis*-DSM 17311 e *Burkholderia pyrrocinia*-DSM 10685 foram utilizados para construção das curvas de calibração. Diluições em series de 10^2 a 10^{10} cópias do gene μL^{-1} foram feitas para cada uma, no entanto, foram utilizadas as diluições 10^2 a 10^6 nos ensaios de PCR quantitativo (qPCR). Para cada ponto de diluição foram feitas 3 repetições. A Figura 13 mostra que as curvas padrão geradas pelas DSM 17311 e DSM 10685 respectivamente apresentaram ótimos coeficientes de correlação ($R^2 > 0,99$), sendo adequado o uso deles para curva de calibração, além disso, a presença de um pico na curva de *melting* demonstra que o emprego do primer PrnD9 foi específico e também eficiente para qPCR.

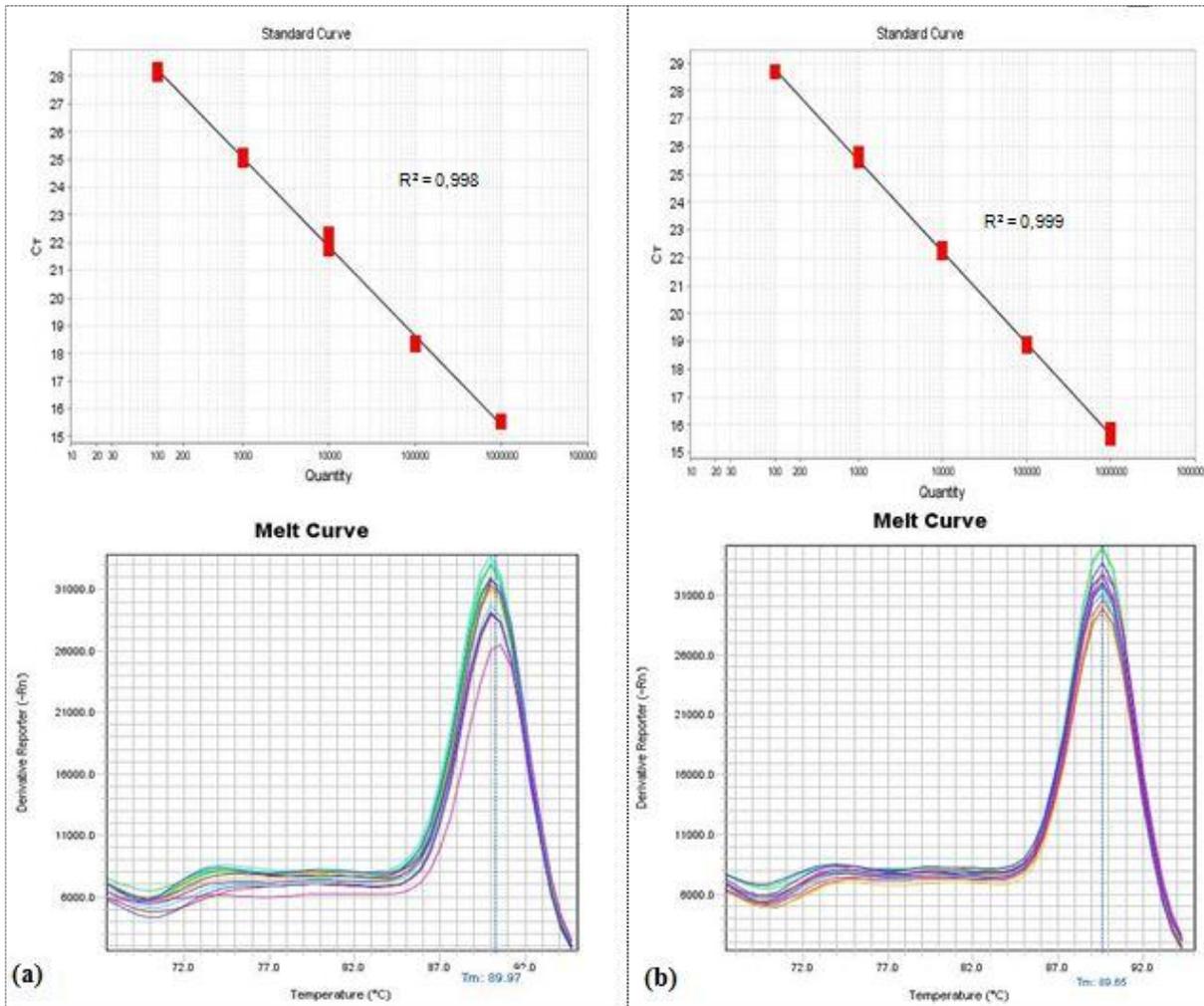


Figura 13 - Curvas padrão e curva de *melting* da DSM 17311 (a) e DSM 10685 (b) para o gene *prnD* através da amplificação por PCR-tempo real

A metodologia desenvolvida foi empregada para avaliar a abundância do gene *prnD* nas amostras de solo dos sítios de TPA Caldeirão Capoeira e Cultivado e dos seus respectivos solos adjacentes. Os resultados demonstraram que foi um sucesso a detecção e quantificação do gene *prnD* em ambientes de solos. O coeficiente de correlação (R^2) da curva padrão foi maior que 0,99 e apresentou alta especificidade, exibindo um único pico na curva de *melting*, além disso, observa-se que as amostras de solos (pontos azuis), em triplicatas, ficaram alinhadas a curva padrão. Variáveis como a composição dos primers, estruturas secundárias e tamanho do *amplicon* podem afetar a eficiência da PCR-tempo real. O valor ideal seria de 100%, resultando em uma curva padrão com *slope* de -3,3 (MAVRODI et al., 2007). O DNA da *B. pyrrocinia*-DSM 10685 utilizado como curva de calibração para as amostras de solos, mostrou um *slope* de -3,1 com eficiência de 111% (Figura 14).

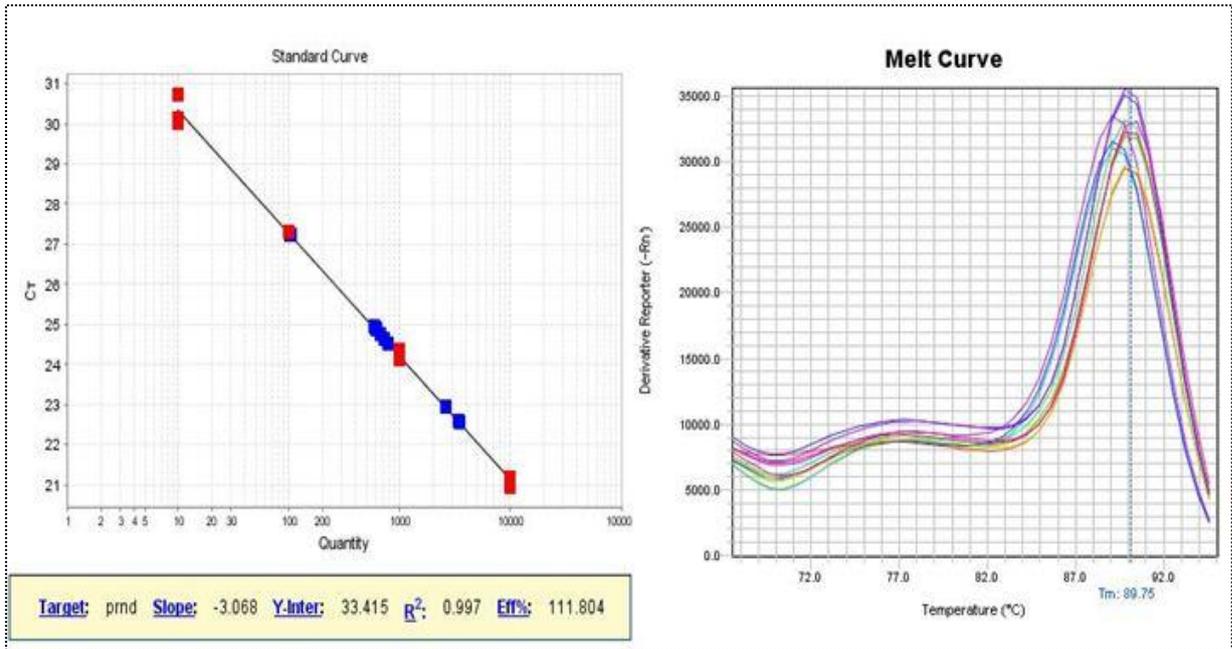


Figura 14 - Curva padrão da DSM 10685 e quantificação do gene *prnD* nas amostras de solo. Curva de melting para confirmação de amplificação específica do gene *prnD* em amostras solos de TPA e ADJ

Nas amostras de solos também foi feita a quantificação para o gene 16S rRNA para parâmetros de comparação e inferir sobre a frequência do gene pirrolnitrina: *prnD*. Para geração da curva padrão foi utilizado um clone de biblioteca genômica contendo o gene ribossomal 16S rRNA. As amplificações de PCR em tempo real apresentaram ótimo coeficiente de correlação ($R^2 > 0,99$) e foram bastante específicos exibindo apenas um pico na curva de *melting*. Observa-se que as amostras de solos (pontos azuis), em triplicatas, ficaram alinhadas na curva padrão, além disso, o slope da curva de calibração foi de -3,4 e a eficiência de 97,5% (Figura 15).

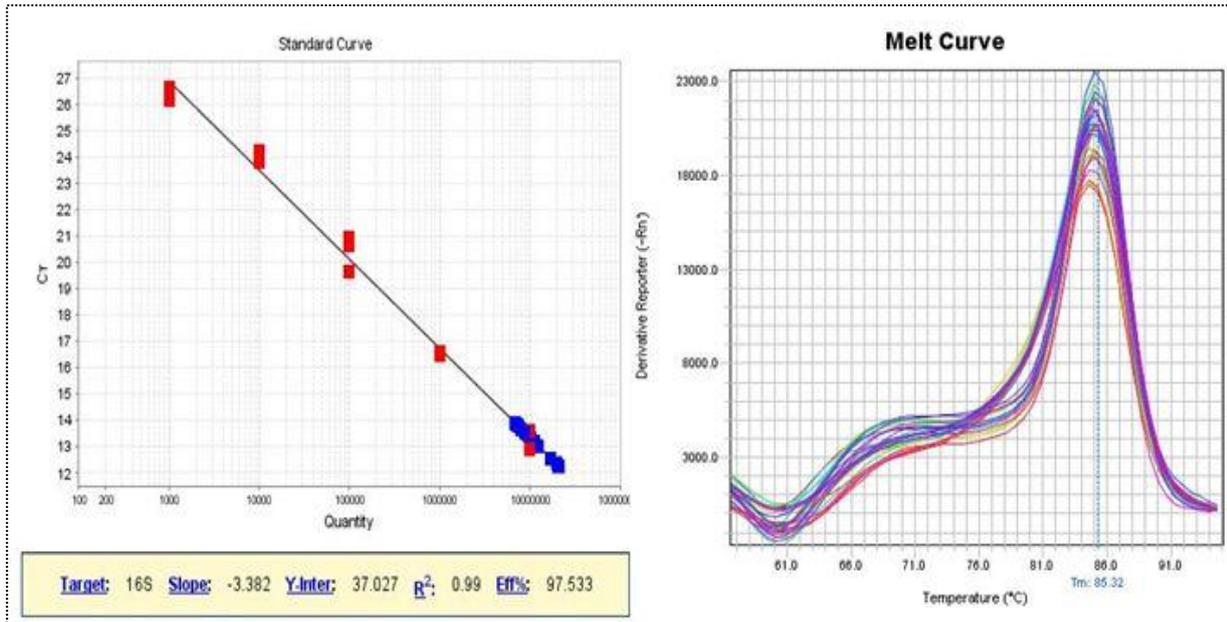


Figura 15 - Curva padrão de clone contendo gene 16S rRNA e quantificação do gene 16S rRNA nas amostras de solo de TPA e ADJ. Curva de melting para confirmação da amplificação específica em amostras de solo

No sítio Caldeirão Capoeira, o gene *prnD* foi mais abundante nas amostras do solo adjacente ($1,74 \times 10^5$ cópias/g solo) do que em Terra preta Antropogênica ($2,48 \times 10^4$ cópias/g solo) e esta diferença foi significativa apresentando $P < 0,001$. Contudo, a quantidade total de bactérias foi significativamente maior ($P < 0,001$) no solo de TPA ($1,04 \times 10^{10}$ cópias/g solo) que no solo adjacente ($4,84 \times 10^9$ cópias/g solo) (Figura 16). As TPAs são conhecidas por serem altamente férteis devido à maior quantidade de matéria orgânica conseqüentemente apresentam a característica coloração escura. Além disso, apresentam alta capacidade de troca catiônica e elevados teores de fósforo, cálcio e magnésio e maior presença de carvão pirogênico, desse modo, as TPAs tem maiores fontes de nutrientes e ocorrência de nichos diferenciados o que pode contribuir para uma maior abundância de bactérias. Além destas propriedades particulares do solo de TPA, neste sítio, a vegetação presente é uma floresta secundária, a qual ocorre uma diversidade de plantas que liberam diferentes tipos de exudatos que também pode ter sido um fator favorável resultando numa maior quantidade de bactérias que nos solos adjacentes.

A menor abundância do gene *prnD* possivelmente é devido que pelas TPAs serem solos que apresentam material orgânico estável, grande atividade biológica e de alta diversidade microbiana (TSAI et al., 2003), rico em nutrientes e no sítio Caldeirão Capoeira

ser uma floresta, pode ser considerado um ambiente em equilíbrio, sem perturbação, onde não há a seleção de microrganismos com genes específicos para competir no ambiente pela sobrevivência. Comparando com o número total de bactérias existente nos solos de TPA e ADJ, a frequência do gene de pirrolnitrina foi de 0,0003% e 0,003% respectivamente nos solos, demonstrando que uma pequena fração das bactérias do solo apresentam o gene *prnD*.

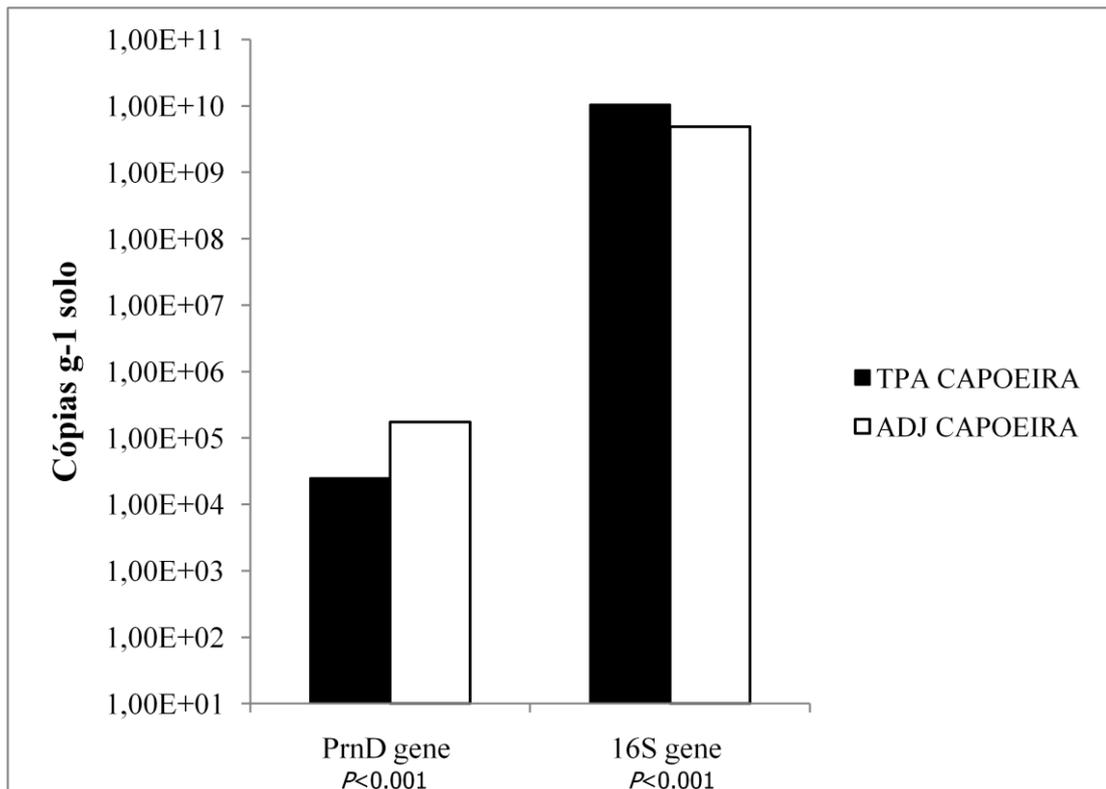


Figura 16 - Quantificacao de PCR em tempo real dos genes *prnD* e 16S rRNA em cópias por grama de solo no sítio Caldeirão Capoeira dos solos TPA e ADJ

No sítio Caldeirão Cultivado, o gene *prnD* foi significativamente ($P < 0,001$) mais abundante nas amostras de solo de TPA ($7,83 \times 10^5$ cópias/g solo) do que no solo adjacente ($1,54 \times 10^5$ cópias/g solo). Em relação ao gene 16S rRNA, a TPA apresentou $5,29 \times 10^9$ cópias/g solo enquanto que no solo adjacente foram $3,53 \times 10^9$ cópias/g solo, sendo esta diferença significativa ($P < 0,0141$) (Figura 17). A maior abundância de bactérias totais e do gene *prnD* no solo de TPA possivelmente está relacionado a características deste solo. Bactérias que apresentam o gene *prnD* em TPA representam em torno de 0,02% do total da população bacteriana e nos solos adjacentes 0,004%.

Práticas agrícolas aparentam afetar a quantidade do gene *prnD* em solos de TPA de forma mais intensa que no solo adjacente, esses resultados indicam que solos de TPAs perturbados, como os usados para cultivo de monocultura, podem exibir maior abundância de bactérias que carregam o gene biossintético de pirrolnitrina.

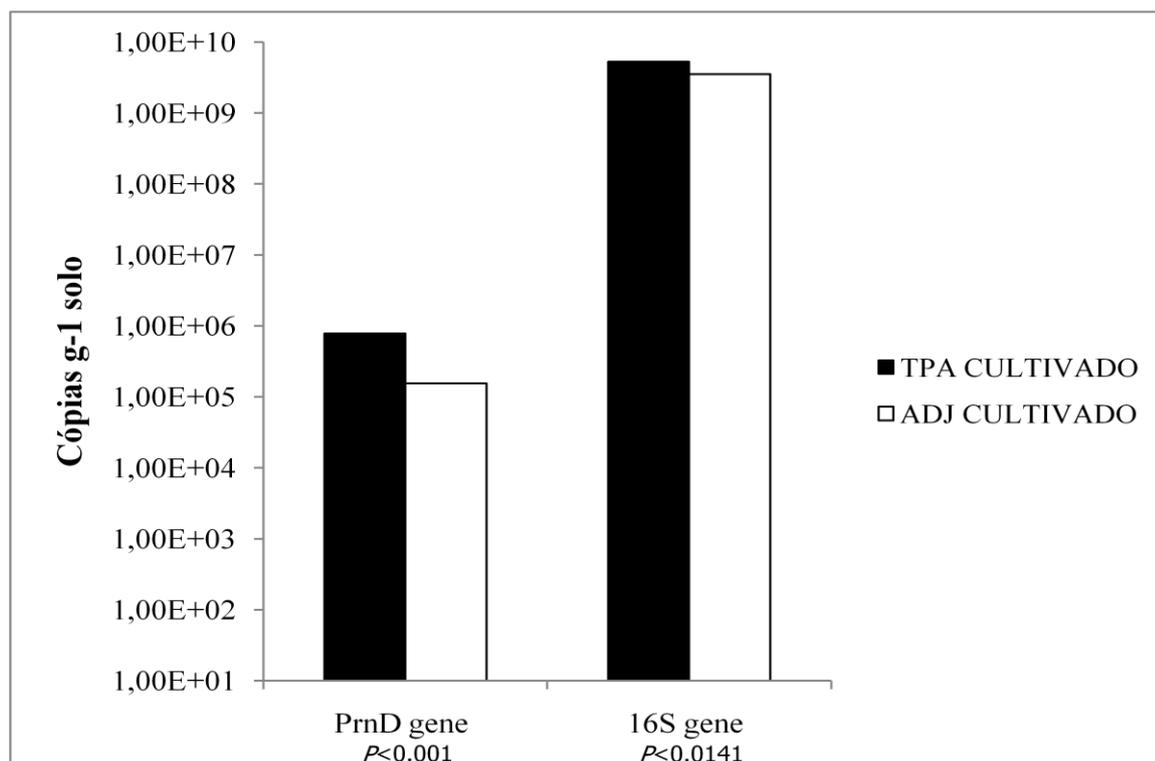


Figura 17 - Quantificação de PCR em tempo real dos genes *prnD* e 16S rRNA em cópias por grama de solo no sítio Caldeirão Cultivado dos solos TPA e ADJ

5.3.4 Influência da química do solo na abundância dos genes *prnD* e 16S rRNA

A correlação dos parâmetros dos solos com a quantificação dos genes estudados foi analisada no programa STATISTICA 10 (Statsoft, Tulsa, OK). A análise foi feita correlacionando os dados de atributos químicos do solo e a abundância dos genes *prnD* e 16S rRNA para cada sítio.

No sítio Caldeirão Capoeira, as concentrações dos genes: *prnD* e 16S rRNA foram relacionados com os mesmos fatores (pH, P, Ca, Mg, Al, SB, t, V, m, Fe, Zn, Mn e Cu). O carbono, matéria orgânica, potássio, sódio e a CTC a pH 7,0 não tiveram correlação e/ou valor de P (probabilidade do acaso) significativo. Para o gene *prnD* as correlações significativas foram negativas, exceto para alumínio, ferro e índice de saturação por alumínio (m). Em relação ao gene 16S, somente ocorreu correlação negativa para alumínio, valor de m e ferro (Tabela 8).

Tabela 8 - Correlação entre quantificações dos genes *prnD* e 16S rRNA e fatores do solo do sítio Caldeirão Capoeira

	<i>prnD</i>		16S	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
pH-H ₂ O	-0.90	0.015	0.95	0.004
C	-0.46	0.353	0.48	0.337
Matéria orgânica	-0.46	0.353	0.48	0.336
P Total	-0.89	0.019	0.85	0.030
K	-0.64	0.175	0.59	0.214
Na	0.49	0.320	-0.49	0.323
Cálcio	-0.92	0.009	0.93	0.007
Mg	-0.97	0.001	0.99	0.000
Alumínio	0.89	0.016	-0.94	0.005
H+Al	0.58	0.231	-0.65	0.166
SB	-0.93	0.007	0.94	0.005
t	-0.90	0.016	0.90	0.015
T	-0.77	0.075	0.75	0.087
V	-0.97	0.002	1.00	0.000
m	0.95	0.003	-0.99	0.000
Fe	0.99	0.000	-0.99	0.000
Zn	-0.94	0.006	0.97	0.001
Mn	-0.95	0.004	0.96	0.002
Cu	-0.97	0.001	0.98	0.001

P<0,05 em destaque

No sítio Caldeirão Cultivado praticamente todas as variáveis do solo correlacionaram significativamente com a abundância do gene *prnD*, exceto os fatores potássio e H+Al. O gene 16S rRNA foi relacionado com menos fatores do solo sendo eles: o carbono, matéria orgânica, cálcio, CTC a pH 7,0, zinco e ferro, entretanto, o último apresentou uma correlação

negativa. Na Tabela 9 mostra a correlação entre as abundância dos genes *prnD* e 16S rRNA e as variáveis do solo.

Tabela 9 - Correlação entre quantificações dos genes *prnD* e 16S rRNA e fatores do solo do sítio Caldeirão Cultivado

	<i>prnD</i>		16S	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
pH-H ₂ O	0.8546	0.030	0.7214	0.106
C	0.9470	0.004	0.8138	0.049
Matéria orgânica	0.9532	0.003	0.8229	0.044
P Total	0.8595	0.028	0.7033	0.119
K	0.5348	0.274	0.3211	0.535
Na	0.8749	0.022	0.7781	0.068
Cálcio	0.9643	0.002	0.8148	0.048
Mg	0.8500	0.032	0.6831	0.135
Alumínio	-0.8653	0.026	-0.7544	0.083
H+Al	0.3114	0.548	0.5658	0.242
SB	0.9564	0.003	0.8017	0.055
t	0.9555	0.003	0.7955	0.058
T	0.9798	0.001	0.8569	0.029
V	0.9404	0.005	0.7901	0.061
m	-0.8703	0.024	-0.7632	0.077
Fe	-0.9746	0.001	-0.8671	0.025
Zn	0.9968	0.000	0.9481	0.004
Mn	0.8505	0.032	0.6717	0.144
Cu	0.8772	0.022	0.7304	0.099

P<0,05 em destaque

O método de PCR quantitativo em tempo real é uma ferramenta apropriada para a detecção e quantificação direta de genes em amostras ambientais como o solo, permitindo a amplificação específica do *amplicom* numa amostra contendo um mix de DNA molde. A aplicação desta técnica permitiu uma melhor compreensão da ecologia e frequência de bactérias que contem o gene *prnD*. Além disso, utilizando PCR em tempo real para estudo do gene *prnD* no solo demonstrou que variáveis ambientais tais como química do solo podem afetar a abundância de bactérias que produzem pirrolnitrina.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho foi um dos primeiros a analisar a população de bactérias produtoras de pirrolnitrina em TPA e solos adjacentes, demonstrou que a abundância do gene *prnD* correlacionou de forma significativa com parâmetros químicos do solo tais como pH, fósforo, cálcio, magnésio e micronutrientes.

No total de 219 isolados (175 do gênero de *Burkholderia* e 44 *Pseudomonas*), a presença do gene *prnD*, detectado por PCR convencional, foi superior em *Burkholderia* que *Pseudomonas* correspondendo, em torno de 27% e 2%, respectivamente deste total de bactérias avaliadas.

O programa MOTHUR, utilizando um *cutoff* 0,05, reuniu 63 seqüências em 10 grupos. No teste de antagonismo (bioensaio), empregando um representante de cada grupo, demonstrou-se que isolados que carregam o gene *prnD* exibem diferenças significativas quanto à atividade antimicrobiana (antifúngica).

A análise filogenética mostrou que a maioria das seqüências do gene *prnD* dos isolados bacterianos deste estudo se agruparam separadamente das seqüências de referências do GenBank, indicando que existe diversidade genética do gene *prnD* em isolados de solos amazônicos e que são distintos dos depositados no banco de dados NCBI.

As TPAs tanto do sítio Caldeirão Capoeira como Caldeirão Cultivado apresentaram maior abundância do gene 16S rRNA em relação aos seus respectivos solos adjacentes.

Em relação ao gene *prnD*, em um ambiente de floresta como o sítio Caldeirão Capoeira, a TPA apresentou $2,48 \times 10^4$ cópias/g solo e seu solo adjacente $1,74 \times 10^5$ cópias/g solo. O sítio Caldeirão Cultivado, um ambiente utilizado para produção agrícola, a concentração do gene *prnD* foi significativamente maior ($7,83 \times 10^5$ cópias/ g solo) que seu solo adjacente ($1,54 \times 10^5$ cópias/ g solo).

REFERÊNCIAS

- AAGOT, N.; NYBROE, O.; NILSEN, P.; JOHNSEN, K. An altered *Pseudomonas* diversity is recovered from soil by using nutrient-poor *Pseudomonas*-selective soil extract media. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 5233-5239, 2001.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANZAI, Y.; KIM, H.; PARK, JU-Y.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonas* based on 16S rRNA sequence. **International Journal Systematic Evolucionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 1563-89, 2000.
- ANZAI, Y.; KODO, Y.; OYAIZU, H. The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas* and *Dseudomonas* supports synonymy of these three genera. **International Journal Systematic Evolucionary Microbiology**, Reading, v. 47, p. 249-51, 1997.
- ARIMA, K.; IMANAKA, H.; KOUSAKA, M.; FUKUDA, A.; TAMURA, G. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 28, p. 575-576, 1964.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; MACHERONI JUNIOR, W. Importância dos microrganismos endofíticos no controle de insetos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. cap. 3, p. 57-93.
- BATES, J. A.; TAYLOR, E. J. A.; KENYON, D. M.; THOMAS, J. E. The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seeds. **Molecular Plant Pathology**, New York, v. 2, p. 49-57, 2001.
- BENDER, C. L.; RANGASWAMY, V.; LOPER, J. E. Polyketide production by plant associated pseudomonads. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 175-196, 1999.
- BERG, G. Diversity of antifungal and plant-associated *Serratia plymuthica* strains. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, p. 952-960, 2000.
- BEVIVINO, A.; SARROCCO, S.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CANTALE, C.; CHIARINI, L. Characterization of a free-living maize rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 27, p. 225-237, 1998.
- BORNEMAN, J.; SKROCH, P. W.; O'SULLIVAN, K. M.; PALUS, J. A.; RUMJANEK, N. G.; JANSEN, J. L.; NIENHUIS, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, n. 6, p. 1935-1945, 1996.

- BONSALL, R. F.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. *in vitro* and in the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 951–955, 1997.
- BOWERS, J.; PARKE, J. Epidemiology of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control. **Phytopathology**, Lancaster, v. 83, p. 1466–1473, 1993.
- BURGBAGE, D. A.; SASSER, M.; LUMSDEN, D. A medium selective for *Pseudomonas cepacia*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 72, p. 706, 1982.
- BURKHEAD, K.; SCHISLER, D. A.; SLININGER, P. J. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in Culture and in colonized wounds of potatoes. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 60, p. 2031-2039, 1994.
- BURKHOLDER, W. H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, Lancaster, v. 40, p. 115–117, 1950.
- BURKHOLDER, W. H. Three bacterial plantpathogens. *Phytomonas caryophylli* sp.n., *Phytomonas alliicola* sp.n. and *Phytomonas manihotis*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 32, p. 141–149, 1942.
- BROUGHTON, L. C.; GROSS K. L. Patterns of diversity in plant and soil microbial communities along a productivity gradient in a Michigan old-field. **Oecologia**, Berlin, v. 125, p. 420-427, 2000.
- CAIN, C. C.; HENRY, A. T.; WALDO, R. H.; CASIDA, L. J.; FALKINHAM, J. O. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 4139–414, 2000.
- CAO, L.; QIU, Z.; YOU, J.; TAN, H.; ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* antagonists of fusarium wilt pathogen from surface-sterilize banana roots. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 247, p. 147–152, 2005.
- CARTWRIGHT, D. K.; CHILTON, W. S.; BENSON, D. M. Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5B., a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 43, p. 211–216, 1995.
- CÉBRON, A.; NORINI, M. P.; BEGUIRISTAIN, T.; LEYVAL, C. Real-time quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH_RHD α) genes from gram positive and gram negative bacteria in soil and sediment. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 73, p. 148-159, 2008.
- CHERNIN, L.; BRANDIS, A.; ISMAILOV, Z.; CHET, I. Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strain with a broad spectrum of antagonistic activity towards fungal and bacterial phytopathogens. **Current Microbiology**, New York, v. 32, p. 205–212, 1996.

CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V.; VAN DER BIJ, A. J.; VAN DER DRIFT, K. M. G. M.; SCHRIPSEMA, J.; KROON, B.; SCHEFFER, R. J.; KEEL, C.; BAKKER, P. A. H. M.; DE BRUIJN, F. J.; THOMAS-OATES, J. E.; LUGTENBERG, B. J. J. 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**, St Paul, v. 10, p. 79–86, 1998.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**. Oxford, v. 5, p. 719–729, 2003.

COENYE, T.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HENRY, D.; LIPUMA, J. J.; LAEVENS, S.; GILLIS, M.; SPEERT, D. P.; VANDAMME, P. *Burkholderia ambifaria* sp.nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. **International Journal Systematic Evolucionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 1481–1490, 2001.

COMPANT, S.; NOWAK, J.; COENYE, T.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 32, p. 607-626, 2008.

CORNELIS, P. Editor pseudomonas: **Genomics and Molecular Biology**. Caister: Academic Press, 2008.

CULLEN, D. W.; HIRSCH, P. R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 983-993, 1998.

DALMASTRI, C.; CHIARINI, L.; CANTALE, C.; BEVIVINI, A.; TABACCHIORINI, S. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. **Microbial Ecology**, New York, v. 38, p. 273-284, 1999.

DE SOUZA, J. T., RAAIJMAKERS, J. M. Polymorphism within the *prnD* and *PltC* genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin-producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 21-34, 2003.

EDEN, M. J.; BRAY, W.; HERRERA, L.; McEWAN, C. Terra Preta soil and their archeological context in the Caqueta Basin of Southeast Colombia. **American Antiquity**, Washington, DC, v. 49, p. 125-140, 1984.

EL-BANNA, N.; WINKELMANN, G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against *Streptomyces*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, p. 69-78, 1997.

ELSGAARD, L.; PETERSEN, S. O.; DEBOSZ, K. Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil. 1. Short-term effects on soil microbiology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 20, p. 1656-1663, 2001.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HIJJER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 175-185, 1998.

FALCÃO, N.; MOREIRA, A.; COMENFORD, N. B. A fertilidade dos solos de Terra Preta de Índio da Amazônia Central. In: TEIXEIRA, W. G.; KERN, D. C.; MADARI, B. E.; LIMA, H. N.; WOODS, W. (Org.). **As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas**. 1. ed. Manaus, AM: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. v. 1, p. 189-200.

FERNÁNDEZ, D. J.; BORREGO, M. M.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; LANDA, B. B. Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* in planta and soil by means of a improved specific and quantitative assay. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 46, p. 372-382, 2010.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 103, p. 626-631, 2006.

FILIP, Z. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 88, p. 169-174, 2002.

FRAVEL, D. R. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 26, p. 75-91, 1988.

FOTI, M.; SOROKIN, D.; ZACHAROVA, E.; PIMENOV, N.; KUENEN, J.; MUYZER, G. Bacterial diversity and activity along a salinity gradient in soda lakes of the Kulunda Steppe. **Extremophiles**, Berlin, v. 12, p. 133-145, 2008.

GARBEVA, P.; VOESENEK, K.; van ELSAS, J. D. Quantitative detection and diversity of the pyrrolnitrin biosynthetic locus in soil under different treatments. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1453-1463, 2004.

GEORGAKOPOULOS, D.; HENDSON, M.; PANOPOULOS, N. J.; SCHROTH, M. N. 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, v. 60, p. 2931-2938, 1994.

GERMAN, L. A geographical method for anthrosol characterization in Amazonia: contributions to methods and human ecological theory. In: GLASER, B.; WOODS, W. I. **Amazonian dark earth: exploration in space and time**. Berlin: Springer, 2004. p. 29-52.

GERTH, K.; TROWITZSCH, W.; WRAY, V.; HÖFLE, G.; IRSCHIK, H. REICHENBACH, H. Pyrrolnitrin from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 35, p. 1101-1103, 1982.

GIRVAN, M. S.; BULLIMORE, J.; PRETTY, J. N.; OSBORN, A. M.; BALL, A. S. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in Arable soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 9, p. 1800-1809, 2003.

GLASER, B.; BALASHOV, E.; HAUMAIER, L.; GUGGENBERGER, G.; ZECH, W. Black carbon in density fractions of anthropogenic soils of the Brazilian Amazon region. **Organic Geochemistry**, Oxford, v. 31, p. 668-678, 2000.

GREINER, O.; DAY, P. J.; BOSSSHARD, P. P.; IMERI, F.; ALTWEGG, M.; NADAL, D. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 39, p. 3129–3134, 2001.

GRUNTZIG, V.; NOLD, S. C.; ZHOU, J.; TIEDJE, J. M. *Pseudomonas stutzeri* nitrite reductase gene abundance in environmental samples measured by real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p.760–768, 2001.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a geographical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Woodbury, v. 8, p. 195-202, 1998.

HAAS, D. AND DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 307–319, 2005.

HAMMER, P. E.; HILL, D. S.; LAM, S. T.; VANPEE, K. H.; LIGON, J. M. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 2147–2154, 1997.

HANDELSMAN, J.; STABB, E. V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1855–1869, 1996.

HEBBAR, P. K.; MARTEL, M. H.; HEULIN, T. Suppression of pre-and post emergence damping-off in corn by *Burkholderia cepacia*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 29–36, 1998.

HEBBAR, K. P.; DAVEY, A. G.; MERRIN, J.; DART, P. J. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moniliforme*, a soil-borne fungal pathogen: colonization of rhizosphere and roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 24, p. 989-997, 1992.

HERMANSSON, A.; LINDGREN, P. E. Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 972-976, 2001.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HORNER-DEVINE, M. C.; CARNEY, K. M.; BOHANNAN, B. J. M. An ecological perspective on bacterial biodiversity. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 271, p. 113-122, 2004.

HU, F. P.; YOUNG, J. M. Biocidal activity in plant pathogenic *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Ralstonia* and *Xanthomonas* spp. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, p. 263–271, 1998.

HWANG, J.; CHILTON, W. S.; BENSON, D. M. Pyrrolnitrin production by *Burkholderia cepacia* and biocontrol of *Rhizoctonia* stem rot of poinsettia. **Biological Control**, Orlando, v. 25, p. 56–63, 2002.

IBEKWE, A. M.; GRIEVE, C. M. Detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, p. 421–43, 2003.

KANG, J. G.; SHIN, S. Y.; KIM, M. J.; BAJPAI, V.; MAHESHWARI, D. K.; KANG, S. C. Isolation and antifungal activities of 2-hydroxymethyl-chroman-4-one produced by *Burkholderia* sp. MSSP. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 57, p. 726–731, 2004.

KANG, Y. W.; CARLSON, R.; THARPE, W.; SCHELL, M. A. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 3939–3947, 1998.

KÄMPF, N.; KERN, D. C. O solo como registro de ocupação humana pré-histórica na Amazônia. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 6, p. 277–320, 2005.

KEEL, C.; WELLER, D. M.; NATSCH, A.; DÉFAGO, G.; COOK, R. J.; THOMAS, L. S. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, p. 552–563, 1996.

KERN, D. C.; D'AQUINO, G.; RODRIGUES, T. E.; FRANZÃO, F. J. L.; SOMBROEK, W.; MEYERS, T. M.; NEVES, E. G. Distribution of Amazonian Dark Earth in the Brazilian Amazon. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. (Ed.). **Amazonian dark earths: Origin, properties, management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. v. 1, p. 51–75.

KENNEDY, N. M.; GLEESON, D. E.; CONNOLLY, J.; CLIPSON, N. J. W. Seasonal and management influences on bacterial community structure in an upland grassland soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 53, p. 329–337, 2005.

KERN, D. C.; KÄMPF, N. Antigos assentamentos indígenas na formação de solos com Terra Preta Arqueológica na região de Oriximiná, Pará. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 13, p. 219–225, 1989.

KIM, J. S.; SPAROVEK, G.; LONGO, R. M.; MELO, W. J.; CROWELT, D. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 648–690, 2007.

KIRNER, S.; HAMMER, P. E.; HILL, D. S.; ALTMANN, A.; FISCHER, I.; WEISLO, L. J.; LANAHAN, M.; VAN PEE, K. H.; LIGON, J. M. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens*. **Journal Bacteriology**, Baltimore, v. 180, p. 1939–1943, 1998.

KING, E. B.; PARKE, J. L. Biocontrol of *Aphanomyces* root rot and *Pythium* damping-off by *Pseudomonas cepacia* AMMD on four pea cultivars. **Plant Disease**, St Paul, v. 77, p. 1185–1188, 1993.

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. J.; Trends between gene content and genome size in prokaryotic species with larger genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 101, n. 9, p. 3160-3165, 2004.

KURTBÖKE, D. I.; SWINGS, J.; STORMS, V. **Microbial genetic resources and biodiscovery**. London: WFCC Publications, 2004. 400 p.

JIAO, Y.; YOSHIHARA, T.; ICHIHARA, A.; ISHIKURI, S.; UCHINO, H. Structural identification of cepaciamide A, a novel fungitoxic compound from *Pseudomonas cepacia* D-202. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 37, p. 1039–1042, 1996.

LEE, C. H.; KIM, S.; HYUN, B.; SUH, J. W.; YON, C.; KIM, C.; LIM, Y.; KIM, C. Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. I. Taxonomy, production, isolation and biological activity. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 47, p. 1402–1405, 1994.

LIMA, H. N.; BENITES, V. M.; SHAEFER, C. E. R.; MMELO, J. W. V.; KER, J. C. Caracterizaco de acidos hmicos extraídos de Terra Preta de Índio. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE SUBSTANCIAS HUMICAS, 2001, Viçosa. **Resumos...** Viçosa: Departamento de Solos, UFV, 2001. p. 155-156.

LIMA, H. N.; SHAEFER, C. E. R.; MMELO, J. W. V.; GILKES, R. J.; KER, J. C. Pedogenesis and pré-Colombian land use of “Terra Preta Arthrosolos” (“Indian black earth”) of Westerns Amazonia. **Geoderma**, Amsterdam, v. 110, p. 1-17, 2002.

LIGON, J. M.; HILL, D. S.; HAMMER, P. E.; TORKEWITZ, N. R.; HOFMANN, D.; KEMPF, H.; van PEE, K. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. **Pest Management Science**, London, v. 56, p. 688–695, 2000.

LUDEMANN, H.; ARTH, I.; LIESACK, W. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 754-762, 2000.

MADANI, M.; SUBBOTIN, S. A.; MOENS, M. Quantitative detection of the potato cyst nematode, *Globodera pallida*, and the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, using Real-Time PCR with SYBR green I dye. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 19, p. 81-86, 2005.

MADARI, B. E. Matéria orgânica de Terra Preta do Índio da Amazônia; características e o papel da fertilidade do solo. In: TEIXEIRA, W. G.; KERN, D. C.; MADARI, B. E.; LIMA, H. N.; WOODS, W. (Org.). **Terra Preta, este volume**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2007.

MADARI, B. E.; CUNHA, T. J. F.; NOVOTNY, E. H.; MILORI, D. M. B. P.; MARTIN NETO, L.; BENITES, V. M.; COELHO, M. R.; SANTOS, G. A. A 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. (Org.). **As Terras Pretas de Índio da Amazônia: sua caracterização e uso deste conhecimento na criação de novas áreas**. 1. ed. Manaus, AM: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. v. 1, p. 172-188.

MADARI, B. E.; TEIXEIRA, W. G.; BENITES, V de M.; KERN, D. C.; FALCÃO, N. P. S. **Pesquisas sobre os solos antrópicos da Amazônia (Terra preta de Índio) e sua relevância agrônômica**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005. 27 p.

MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T. A.; GOLDBERG, J. B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nature Review Microbiology**, London, v. 3, p. 144–156, 2005.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G. *Burkholderia cepacia* complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, p. 1539–1551, 2008.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, p. 369-406, 1993.

MARSCHNER, P.; YANG, C. H.; LIEBEREI, R.; CROWLEY, D. E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1437-1445, 2001.

MAVRODI, O. V.; MAVRODI, D. V.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M. Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains in the rhizosphere by Real Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 73, n. 17, p. 5531-5538, 2007.

McLOUGHLIN, T. J.; QUINN, J. P.; BETTERMANN, A.; BOOKLAND, R. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 58, p. 1760–1763, 1992.

McSPADDEN-GARDENER, B. B.; SCHROEDER, K. L.; KALLOGER, S. E.; RAAIJMAKERS, J. M.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M. Genotypic and phenotypic diversity of pHLD-containing *Pseudomonas* isolated from the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 1939–1946, 2000.

MEYER, S. L. F.; MASSOUD, S. I.; CHITWOOD, D. J.; ROBETS, D. P. Evaluation of *Trichoderma virens* and *Burkholderia cepacia* for antagonistic activity against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, Leiden, v. 2, p. 871–879, 2000.

MILNER, J. L.; SILO-SUH, L.; LEE, J. C.; HE, H. Y.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, p. 3061–3065, 1996.

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

NEVES JUNIOR, F. A. **Qualidade física de solos com horizonte antrópico (Terra Preta de Índio) na Amazônia Central**. 2008. 94f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

OKANO, Y.; HRISTOVA, K. R.; LEUTENEGGER, C. M.; JACKSON, L. E.; DENISON, R. F.; GEBREYESUS, B.; LEBAUER, D.; SCOW, K. M. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p.1008–1016, 2004.

OKUBARA, P. A.; SCHROEDER, K. L.; PAULITZ, T. C. Real-time polymerase chain reaction: applications to studies on soilborne pathogens. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 27, p. 300–313, 2005.

O'NEILL, B.; GROSSMAN, J.; TSAI, S. M.; GOMES, J. E.; LEHMANN, J.; PETERSON, L.; NEVES, E.; THIES, J. E. Bacterial Community Composition in Brazilian Anthrosols and Adjacent Soils and adjacent Soils Characterized Using Culturing and Molecular Identification. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 23-35, 2009.

OPELT, K.; BERG, G. Diversity and antagonistic potential of bacteria associated with bryophytes from nutrient-poor habitats of the Baltic Sea Coast. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 6569–6579, 2004.

O'SULLIVAN, D. J.; O'GARA, F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp .involved in suppression of plant root pathogens. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 56, p. 662–676, 1992.

OWNLEY, B. H.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Influence of in situ and in vitro pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici by *Pseudomonas fluorescens* 2–79. **Phytopathology**, Lancaster, v. 82, p. 178–184, 1992.

PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment to biological control strains. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 225–258, 2001.

PARKE, J. L.; RAND, R. E.; JOY, A. E.; KING, E. B. Biological control of *Pythium* damping off and *Aphanomyces* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens* to seed. **Plant Disease**, St Paul, v. 75, p. 987–992, 1991.

PARKE, J. L. Population dynamics of *Pseudomonas cepacia* in the pea rhizosphere in relation to biocontrol of *Pythium*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 80, p. 1307–1311, 1990.

PFENDER, W. F.; KRAUS, J.; LOPER, J. E. A genomic region from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 required for pyrrolnitrin production and inhibition of *Pyrenophora tritici* repentis in wheat straw. **Phytopathology**, Lancaster, v. 83, p. 1223-1228, 1993.

PIETERSE, C. M. J.; VAN WEES, S. C. M.; HOFFLAND, E.; VAN PELT, J. A.; VAN LOON, L. C. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis related gene expression. **Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1225–1237, 1996.

RAAIJMAKERS, J. M.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 881–887, 1997.

RAAIJMAKERS, J. M.; VLAMI, M.; DE SOUZA, J. T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 537–547, 2002.

RAAIJMAKERS, J. M.; PAULITZ, C. T.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C.; MOENNE-LOCCOZ, Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 321, n. 1–2, p. 341–361, 2008.

RAEYMAEKERS, L. Basic principles of quantitative PCR. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 15, p. 115–122, 2000.

RAFFEL, S. J.; STABB, E. V.; MILNER, J. L.; HANDELSMAN, J. Genotypic and phenotypic analysis of zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus*. **Microbiology**, Reading, v. 142, p. 3425–3436, 1996.

RAMETTE, A.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; DÉFAGO, G. Polymorphism of the polyketide synthase gene *phlD* in biocontrol fluorescent *Pseudomonas* producing 2,4 diacetylphloroglucinol and comparison of *PhlD* with plant polyketide synthases. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 14, p. 639–652, 2001.

ROBERTS, D. P.; LOHRKE, S. M.; MEYER, S. L. F.; BYER, J. S.; BOWERS, J. H.; BAKER, C. J.; LI, W.; DE SOUZA, J. T.; LEWIS, J. A.; CHUNG, S. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soilborne diseases of cucumber. **Crop Protection**, Guildford, v. 24, p. 141–155, 2005.

RENELLA, G.; MENCH, M.; LAND, I. L.; NANNIPIERI, P. Microbial activity and hydrolase synthesis in long-term Cd-contaminated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 133–139, 2005.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, p. 406–425, 1987.

SANCHEZ, P. A.; COCHRANE, T. T. Soil constraints in relation to major farming systems in tropical America. In: INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. **Priorities for alleviating soil-related constraints to food production in the Tropics**. Los Baños: IRRI, 1980. p. 107–139.

SCHELLENBERG, B.; BIGLER, L.; DUDLER, R. Identification of genes involved in the biosynthesis of the cytotoxic compound glidobactin from a soil bacterium. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 1640–1650, 2007.

SCHENA, L.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; GALLITELLI, D. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 893–908, 2004.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; van HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introduction mother: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 75, p. 7537-7541, 2009.

SCHMIDT, S.; BLOM, J. F.; PERNTHALER, J.; BERG, G.; BALDWIN, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; EBERL, L. Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the *Burkholderia cepacia* complex, **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, p. 1422-1437, 2009.

SCHROEDER, K. L.; OKUBARA, J. T.; TAMBONG, C. A. LÉVESQUE, ; PAULITZ, T. C. Identification and quantification of pathogenic *Pythium* spp. from soils in eastern Washington using real-time polymerase chain reaction. **Phytopathology**, St Paul, v. 96, p. 637-647, 2006.

SHANAHAN, P.; O'SULLIVAN, D. J.; SIMPSON, P.; GLENNON, J. D.; O'GARA, F. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 58, p. 353–358, 1992.

SILVA, F. de A. S. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6., 1996, Cancun. **Anais...** Cancun: ASAE, 1996. p. 294-298.

SINGH, R. K.; MISHRA, R. P. M.; JAISWAL, H. K.; KUMAR, V.; PANDEY, S. P.; RAO, S. B.; ANNAPURNA, K. Isolation and identification of natural endophytic rhizobia from rice (*Oryza sativa* L.) through rDNA PCR-RFLP and sequence analysis. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 117–122, 2006.

SHARIFI-TEHRANI, A.; ZALA, M.; NATSCH, A.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; DÉFAGO, G. Biocontrol of soilborne fungal plant diseases by 2-4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 631–643, 1998.

SHOJI, J.; HINOO, H.; KATO, T.; HATTORI, T.; HIROOKA, K.; TAWARA, K. Isolation of cepafungin I, capafungin II and cepafungin III from *Pseudomonas* species. **Journal Antibiotics**, Tokyo, v. 43, p. 783–787, 1990.

SMITH, N. J. H. Arthrsol and human carrying capacity in Amazonia. **Annals of the Association of American Geographers**, Washington, DC, v. 70, p. 553-566, 1980.

SOMBROEK, W. G. **Amazonian soils**. A reconnaissance of the soils of the Brazilian Amazon. Wageningen: Centre of Agricultural Publication Documentation, 1966. 292 p.

SCHROTH, M. N.; HILDEBRAND, D. C.; PANOPULOS, N. Phytopathogenic pseudomonads and related plant-associated pseudomonads, In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLIEFER, H. (Ed.). **The prokaryotes**. Berlin: Springer, 1991. p. 3104-3131.

STIRLING, D. DNA extraction from fungi, yeast and bacteria, In: BARLETT, J. M. S.; STIRLING, D. (Ed.). **PCR Protocols**. 2. ed. Totowa: Humana Press, 2003. v. 226, p. 53-54.

TAKAI, K.; HORIKOSHI, K. Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probe. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 5066–5072, 2000.

TARUMA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

THOMASHOW, L. S.; BONSALE, R. F.; WELLER, D. M. Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ, In: HURSTCJ, KNUDSEN, G. R.; MCINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WALTER, M. V. (Ed.). **Manual of environmental microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 1997. p. 493–499.

THOMASHOW, L. S. Biological control of plant root pathogens. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 7, p. 343–347, 1996.

TRIPATHI, R. K.; GOTTLIEB, D. Mechanism of action of the antifungal antibiotic pyrrolnitrin. **Journal Bacteriology**, Baltimore, v. 100, p. 310–318, 1969.

TSAI, S. M.; CANNAVAN, F. S.; SILVA JUNIOR, J. P.; CHAVES, M. G.; PASSIANOTO, C.C.; BORGES, C. P. Diversidade bacteriana em terra preta de índio baseada em seqüenciamento do gene 16S rRNA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIENCIA DO SOLO, 29., 2003, Ribeirão Preto. **Resumos...** Ribeirão Preto: SBCS, 2003. 1 CD-ROOM.

VANDAMME, P.; OPELT, K.; KNÖCHEL, N.; BERG, C.; SCHÖNMANN, S.; DE BRANDT, E.; EBERL, L.; FALSEN, E.; BERG, G. *Burkholderia bryophyla* sp.nov. and *Burkholderia megapolitana* sp.nov., moss-associated species with antifungal and plant growth- promoting properties. **International Journal Systematic Evolucionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 2228–2235, 2007.

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; VANCANNEYT, M.; COENYE, T.; HOSTE, B.; COOPMAN, R.; REVETS, H.; LAUWERS, S.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; GOVAN, J. R. W. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp.nov. **International Journal of Systematic bacteriology**, Washington, DC, v. 47, p. 1188–1200, 1997.

VANLAERE, E.; LIPUMA, J. J.; BALDWIN, A.; HENRY, D.; DEBRANDT, E.; MAHENTHIRALINGAM, E. *Burkholderia latens* sp. nov. *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp.nov., *Burkholderia seminalis* sp.nov. *Burkholderia metallica* sp.nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. **International Journal Systematic Evolucionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 1580–1590, 2008.

VANLAERE, E.; BALDWIN, A.; GEVERS, D.; HENRY, D.; DEBRANDT, E.; LI PUMA, J. J.; MAHENTHIRALINGAM, E. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex comprises at least two novel species: *Burkholderia contaminans* sp.nov. and *Burkholderia lata* sp.nov. **International Journal Systematic Evolucionary Microbiology**, Reading, v. 59, p. 102–111, 2009.

VAN PEÉ, K.-H.; SALCHER, O.; LINGENS, F. Formation of pyrrolnitrin and 3-(29-amino-39-chlorophenyl) pyrrole from 7-chlorotryptophan. **Angewandte Chemie**, Weinheim, v. 19, p. 828-829, 1980.

VAN PELT, C.; VERDUIN, C. M.; GOESSENS, W. H. F.; VOS, M. C.; TUMMLER, B.; SEGONDS, C.; REUBSAET, F.; VERBRUGH, H.; van BELKUM, A. Identification of *Burkholderia* spp. In the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 37, p. 2158-2164, 1999.

VIAL, L.; GROLEAU, M.-C.; DEKIMPE, V.; DÉZIEL, E. *Burkholderia* diversity and versatility: Na inventory of the extracellular products. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, Korea, v. 17, p. 1407-1429, 2007.

VIEIRA, L. S. **Manual de ciência do solo**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1975. 464 p.

WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S ribosomal-RNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, London, v. 345, p. 63-65, 1990.

WELLER, D. M.; RAAIJMAKERS, J. M.; MCSPADDEN-GARDENER, B. B.; THOMASHOW, L. S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 309–348, 2002.

WHITTWER, C. T.; HERRMANN, M. G.; MOSS, A. A.; RASMUSSEN, R. P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **BioTechniques**, Natick, v. 22, p. 130-138, 1997.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 51, p. 221–271, 1987.

WOODS, W. I. Development of anthrosol research. In: LEHMANN, J.; KERN, D. C.; GLASER, B.; WOODS, W. I. **Amazonian dark earths: origin properties and management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 3-14.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANOIHOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen.nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia*. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 36, p. 1251–1275, 1992.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. *Pseudomonas spp. fluorescentes* – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 32 p. (Documentos, 127).

ZECH, W.; HAUMAIER, L.; HEMPFLING, R. Ecological aspects of soil organic matter in tropical land use. In: McCARTHY, P.; CLAPP, C. E.; MALCOM, R. L.; BLOOM, P. R. (Ed.). **Humic substance in soil and crop sciences**: selected readings. Madison: ASA; SSSA, 1990. p. 187-202.

APÊNDICE

Apêndice A - Isolados bacterianos da Coleção de Cultura do Laboratório de Biologia Celular e Molecular – CENA/USP empregados neste trabalho

ISOLADO	ORIGEM	DESCRIÇÃO^a
BCM_B-1	TPA	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-2	TPA	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
BCM_B-3	TPA	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-4	TPA	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
BCM_B-5	TPA	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD
BCM_B-6	TPA	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD
BCM_B-7	TPA	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-8	TPA	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-9	TPA	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-10	TPA	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-11	TPA	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-12	TPA	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-13	TPA	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-14	TPA	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-15	TPA	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
BCM_B-16	TPA	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
BCM_B-17	TPA	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD
BCM_B-18	TPA	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD
BCM_B-19	TPA	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-20	TPA	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD
BCM_B-21	TPA	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-22	TPA	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-23	TPA	<i>Burkholderia ferrariae</i>
BCM_B-24	TPA	<i>Burkholderia lata</i>
BCM_B-25	TPA	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-26	TPA	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-27	TPA	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-28	TPA	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-29	TPA	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-30	TPA	<i>Burkholderia</i> sp
BCM_B-31	ADJ	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-32	ADJ	<i>Burkholderia lata</i>
BCM_B-33	ADJ	<i>Burkholderia unamae</i>
BCM_B-34	ADJ	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
BCM_B-35	ADJ	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-36	ADJ	<i>Burkholderia ambifaria</i>
BCM_B-37	ADJ	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
BCM_B-38	ADJ	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
BCM_B-39	ADJ	<i>Burkholderia unamae</i>
BCM_B-40	ADJ	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-41	ADJ	<i>Burkholderia</i> sp.

BCM_B-42	ADJ	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-43	ADJ	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-44	ADJ	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-45	ADJ	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD
BCM_B-46	ADJ	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-47	ADJ	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD
BCM_B-48	ADJ	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-49	ADJ	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD
BCM_B-50	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-51	ADJ	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-52	ADJ	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-53	ADJ	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD
BCM_B-54	ADJ	<i>Burkholderia nodosa</i>
BCM_B-55	ADJ	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-56	ADJ	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-57	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-58	ADJ	<i>Burkholderia unamae</i>
BCM_B-59	ADJ	<i>Burkholderia anthina</i>
BCM_B-61	TPA	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-62	TPA	<i>Burkholderia bryophila</i>
BCM_B-63	TPA	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-64	TPA	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-65	TPA	<i>Burkholderia mimosarum</i>
BCM_B-66	TPA	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-67	TPA	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-68	TPA	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-69	TPA	<i>Burkholderia sartisoli</i>
BCM_B-70	TPA	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-71	TPA	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-72	TPA	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
BCM_B-73	TPA	<i>Burkholderia ginsengisoli</i>
BCM_B-74	TPA	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-75	TPA	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-76	TPA	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-77	TPA	<i>Burkholderia mimosarum</i>
BCM_B-78	TPA	<i>Burkholderia sartisoli</i>
BCM_B-79	TPA	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-80	TPA	<i>Burkholderia sartisoli</i>
BCM_B-81	TPA	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-82	TPA	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-83	TPA	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-84	TPA	<i>Burkholderia multivorans</i>
BCM_B-85	TPA	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-86	TPA	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-87	TPA	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-88	TPA	<i>Burkholderia gladioli</i>

BCM_B-89	TPA	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-90	TPA	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
BCM_B-91	TPA	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-92	TPA	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-93	TPA	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-94	TPA	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-95	TPA	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-96	ADJ	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-97	ADJ	<i>Burkholderia gladioli</i>
BCM_B-98	ADJ	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-99	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-100	ADJ	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-101	ADJ	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-102	ADJ	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-103	ADJ	<i>Burkholderia gladioli</i>
BCM_B-104	ADJ	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-105	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-106	ADJ	<i>Burkholderia gladioli</i>
BCM_B-107	ADJ	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-108	ADJ	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-109	ADJ	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-110	ADJ	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-111	ADJ	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-112	ADJ	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-113	ADJ	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-114	ADJ	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-115	ADJ	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-116	ADJ	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-117	ADJ	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-118	ADJ	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-119	ADJ	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-121	ADJ	<i>Burkholderia ginsengisoli</i>
BCM_B-122	ADJ	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-123	ADJ	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-124	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-125	ADJ	<i>Burkholderia mimosarum</i>
BCM_B-126	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-127	ADJ	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-128	ADJ	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-129	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-130	ADJ	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-131	ADJ	<i>Burkholderia</i> sp
BCM_B-132	ADJ	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-120	TPA	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-133	TPA	<i>Burkholderia phymatum</i>
BCM_B-134	TPA	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD

BCM_B-135	TPA	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-136	TPA	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-137	TPA	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-138	TPA	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-139	TPA	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-140	TPA	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-141	TPA	<i>Burkholderia sartisoli</i>
BCM_B-142	TPA	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-143	TPA	<i>Burkholderia phenazinium</i>
BCM_B-144	TPA	<i>Burkholderia phenazinium</i>
BCM_B-145	TPA	<i>Burkholderia ginsengisoli</i>
BCM_B-146	TPA	<i>Burkholderia</i> sp.
BCM_B-147	TPA	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-148	TPA	<i>Burkholderia ginsengisoli</i>
BCM_B-149	TPA	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-150	TPA	<i>Burkholderia sartisoli</i>
BCM_B-151	TPA	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-152	TPA	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-153	TPA	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-154	ADJ	<i>Burkholderia glumae</i>
BCM_B-155	ADJ	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-156	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-157	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-158	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-159	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-160	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-161	ADJ	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-162	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-163	ADJ	<i>Burkholderia ginsengisoli</i>
BCM_B-164	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-165	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-166	ADJ	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-167	ADJ	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-168	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-169	ADJ	<i>Burkholderia tropica</i>
BCM_B-170	ADJ	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-171	ADJ	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-172	ADJ	<i>Burkholderia caribensis</i>
BCM_B-173	ADJ	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_B-174	ADJ	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-175	ADJ	<i>Burkholderia cepacia</i>
BCM_B-176	ADJ	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
BCM_P-1	TPA	<i>Pseudomonas putida</i>
BCM_P-2	TPA	<i>Pseudomonas putida</i>
BCM_P-3	TPA	<i>Pseudomonas</i> sp.
BCM_P-4	TPA	<i>Pseudomonas</i> sp

BCM_P-5	TPA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BCM_P-6	TPA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BCM_P-7	TPA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BCM_P-8	TPA	<i>Pseudomonas</i> sp.
BCM_P-9	TPA	<i>Pseudomonas</i> sp.
BCM_P-10	TPA	<i>Pseudomonas</i> sp.
BCM_P-11	TPA	<i>Pseudomonas</i> sp.
BCM_P-12	TPA	<i>Pseudomonas</i> sp.
BCM_P-13	TPA	<i>Pseudomonas</i> sp.
BCM_P-14	TPA	<i>Pseudomonas putida</i>
BCM_P-15	TPA	<i>Pseudomonas</i> sp.
BCM_P-16	TPA	<i>Pseudomonas</i> sp.
BCM_P-17	TPA	<i>Pseudomonas</i> sp.
BCM_P-18	TPA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BCM_P-19	TPA	<i>Pseudomonas</i> sp.
BCM_P-20	TPA	<i>Pseudomonas</i> sp.
BCM_P-21	TPA	<i>Pseudomonas putida</i>
BCM_P-22	TPA	<i>Pseudomonas</i> sp.
BCM_P-23	TPA	<i>Pseudomonas monteilii</i>
BCM_P-24	TPA	<i>Pseudomonas putida</i>
BCM_P-25	TPA	<i>Pseudomonas mosselii</i>
BCM_P-26	TPA	<i>Pseudomonas mosselii</i>
BCM_P-27	TPA	<i>Pseudomonas koreensis</i>
BCM_P-28	TPA	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
BCM_P-29	TPA	<i>Pseudomonas putida</i>
BCM_P-30	TPA	<i>Pseudomonas putida</i>
BCM_P-31	TPA	<i>Pseudomonas putida</i>
BCM_P-32	TPA	<i>Pseudomonas putida</i>
BCM_P-33	TPA	<i>Pseudomonas putida</i>
BCM_P-34	TPA	<i>Pseudomonas fulva</i>
BCM_P-35	TPA	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
BCM_P-36	TPA	<i>Pseudomonas putida</i>
BCM_P-37	TPA	<i>Pseudomonas putida</i>
BCM_P-38	TPA	<i>Pseudomonas putida</i>
BCM_P-39	TPA	<i>Pseudomonas nitroreducens</i>
BCM_P-40	TPA	<i>Pseudomonas</i> sp.
BCM_P-41	ADJ	<i>Pseudomonas koreensis</i>
BCM_P-42	ADJ	<i>Pseudomonas putida</i>
BCM_P-43	ADJ	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>
BCM_P-44	ADJ	<i>Pseudomonas putida</i>

- a. Bactérias da Coleção do Laboratório do CENA. A identificação foi baseada no seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA