

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E
TECNOLÓGICAS - HENRIQUE SANTILLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS MOLECULARES

**ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E
PRODUÇÃO DE PIGMENTOS TIPO MELANINA
DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE
MILHO (*Zea mays* L.)**

VALÉRIA MARIA DE QUEIROZ RESPLANDES

ANÁPOLIS - GO
2016

VALÉRIA MARIA DE QUEIROZ RESPLANDES

**ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E
PRODUÇÃO DE PIGMENTOS TIPO MELANINA
DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE
MILHO (*Zea mays* L.)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação *Stricto
sensu* em Ciências Moleculares da
Universidade Estadual de Goiás como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências Moleculares

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Cristina
Garcia Martin Didonet

Anápolis - GO
2016

Queiroz-Resplandes, Valéria Maria de.

Estudo de caracterização genética e produção de pigmentos tipo melanina de bactérias endofíticas isoladas de milho (*Zea mays* L.). – 2016.

128 folhas. il figuras.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Cristina Garcia Martin Didonet.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2016.

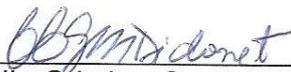
1. Marcador Molecular. 2. Inoculante. 3. Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas. 4. Bioproduto. I. Título.

ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E PRODUÇÃO DE PIGMENTOS
TIPO MELANINA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE MILHO
(*Zea mays* L.)

VALÉRIA MARIA DE QUEIROZ RESPLANDES

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Moleculares do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestra em Ciências Moleculares.

Aprovada em 31/05/2016 por:



Profa. Dra. Claudia Cristina Garcia Martin Didonet (UEG)



Profa. Dra. Luciane Madureira de Almeida (UEG)



Prof. Dr. André Luiz Araújo Pereira (UEG)

ANÁPOLIS – GO
MAIO 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me deu forças para realização desse trabalho.

Ao meu esposo Cesar, meu filho Isaac, meus pais Suelene e Walter, meu irmão Renato, pelo amor, carinho, motivação e apoio.

À Prof^a. Dr^a. Claudia Cristina Garcia Martin Didonet, por me orientar e contribuir grandemente para realização desse trabalho.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica de Microrganismos pela atenção e gentileza prestadas.

À CAPES pelo apoio financeiro e incentivo ao desenvolvimento da pesquisa.

À UEG pela oportunidade de aprimoramento científico e intelectual.

Aos professores componentes da banca examinadora, por aceitarem participar da avaliação desse trabalho.

“Mas em todas estas coisas somos mais do que vencedores, por aquele que nos amou. Porque estou certo de que, nem a morte, nem a vida, nem os anjos, nem os principados, nem as potestades, nem o presente, nem o porvir, nem a altura, nem a profundidade, nem alguma outra criatura nos poderá separar do amor de Deus, que está em Cristo Jesus nosso Senhor.”

Romanos 8:37-39

RESUMO

A inoculação em milho com Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (*Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria* - PGPR) pode melhorar o crescimento desse cultivar, diminuir o uso de fertilizantes nitrogenados e os custos da produção, além de diminuir os impactos negativos ao meio ambiente. Além disso, a produção de pigmentos, tais como a melanina, por essas bactérias pode ter aplicações comerciais promissoras em indústrias de alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e têxteis. O objetivo geral desse trabalho foi realizar um estudo de caracterização genética e bioquímica de 20 bactérias endofíticas isoladas de milho (*Zea mays* L.) cultivado no Cerrado goiano para observar a diversidade genética, identificar bactérias que possam ser utilizadas como inoculantes e verificar a produção de pigmentos tipo melanina (melanina-*like*) por essas bactérias. Para o estudo de diversidade foi realizada análise com os marcadores moleculares: região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA; regiões palindrômicas extragênicas repetidas (REP); genes *atpD*, *glnII* e 16S rRNA; restrição do gene 16S rRNA; gene *mela*. Foi realizado também o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA para identificar os isolados de milho. Para observar a produção de pigmentos melanina-*like*, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura batata líquido, com L-triptofano e sulfato de cobre, e posteriormente foi identificada a produção de pigmentos melanina-*like* através do pico de absorvância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 300, 350 e 400 nm. A concentração de pigmentos melanina-*like* foi calculada por uma reta padrão, obtida das leituras com melanina sintética em diferentes concentrações a 400 nm. Pela análise de similaridade utilizando os marcadores moleculares foi possível observar grande diversidade genética das bactérias estudadas que foi confirmada pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, pois foram identificadas bactérias de diferentes gêneros: *Agrobacterium*, *Burkholderia* e *Cedecea*. Essas bactérias identificadas poderão ser utilizadas na formulação de inoculantes para as variedades de milho cultivadas no Brasil. Quanto à produção de pigmentos, o isolado de milho MT45 apresentou alta produção de melanina-*like* e poderá ser utilizado na obtenção de bioprodutos.

Palavras-Chave: Marcador Molecular, Inoculante, Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas, Bioproduto.

ABSTRACT

Inoculation of maize with Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) can improve the growth of this cultivar, reduce the use of nitrogenous fertilizers and the costs of production, and reduce the negative impacts to the environment. Moreover, the production of pigments, such as melanin, by these bacteria might have promising commercial applications in food industries, pharmaceutical, cosmetics and textiles products. The general objective of this work was to study genetic and biochemical characterization of 20 endophytic bacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) grown in the Cerrado Goiás to observe the genetic diversity, identify bacteria that can be used as inoculants and check production melanin-like pigment by these bacteria. For the diversity study, analysis was performed with molecular markers: 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences, dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences (REP), genes *atpD*, *glnII* e 16S rRNA, 16S rRNA gene restriction; gene *melA*. It was also performed the partial 16S rRNA gene sequencing to identify isolated from maize. To observe the production of pigments melanin-like, bacteria were grown on potato liquid culture media, with L-tryptophan and copper sulfate, and was subsequently identified the production of melanin-like pigments over the peak of absorbance in a spectrophotometer at wavelengths of 300, 350 and 400 nm. The concentration of melanin-like pigments was calculated from a standard line, from the readings obtained using synthetic melanin at different concentrations at 400 nm. By the similarity analysis using molecular markers was observed great genetic diversity of bacteria studied which was confirmed by partial sequencing of the 16S rRNA gene, because were identified bacteria of *Agrobacterium*, *Burkholderia* and *Cedecea* genera. These identified bacteria may be used in the inoculants formulation for maize varieties grown in Brazil. For pigment production, the maize isolated MT45 showed high production of melanin-like and may be used to obtain bioproducts.

Keywords: Molecular marker, Inoculant, Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria, Bioproduct.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Vias de formação de eumelanina (A) e feomelanina (B).30
- Figura 2:** Perfil eletroforético de amplificação por PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA de 20 bactérias isoladas de milho e sete de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080). Gel de agarose 1,7%. Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS).64
- Figura 3:** Perfil eletroforético de amplificação por PCR da região REP de 20 bactérias isoladas de milho e oito de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080). Gel de agarose 1,7%. Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS).67
- Figura 4:** Perfil eletroforético de amplificação por PCR da região *atpD* de 20 bactérias isoladas de milho e nove de referência - *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. leguminosarum* (SEMIA3012); *R. meliloti* (RM2011); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080). Gel de agarose 1,3%. Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS).70
- Figura 5:** Perfil eletroforético de amplificação por PCR da região *glnII* de 20 bactérias isoladas de milho e oito de referência - *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080). Gel de agarose 1,3%. Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS).72
- Figura 6:** Perfil eletroforético de amplificação por PCR da região 16S rRNA de 20 bactérias isoladas de milho e oito de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *R. etli* (CFN42); *R.*

galegae (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080). Gel de agarose 1,3%. Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS).....73

Figura 7: Perfil eletroforético dos fragmentos gerados pela análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) de 20 bactérias isoladas de milho e nove de referência - *Bradyrhizobium elkanei* (SEMIA6156); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Bradyrhizobium sp.* (SEMIA6157); *Rhizobium sp.* (SEMIA6145); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080). Gel de agarose 2%. Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS).....75

Figura 8: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard com base na análise dos marcadores moleculares (*atpD*, *glnII*, intergênica 16S-23S rRNA, REP e ARDRA) de 20 bactérias isoladas de milho e sete de referência - *Bradyrhizobium sp.* (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).79

Figura 9: A história evolutiva foi inferida usando o método UPGMA (SNEATH; SOKAL, 1973). A árvore ideal com a soma do comprimento dos ramos = 0.53572202 é mostrada. As percentagens de árvores idênticas, nas quais os taxa associados foram agrupados no teste de *bootstrap* (1000 réplicas), são mostradas ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método *Maximum Composite Likelihood* (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004) e estão em unidades do número de substituições de bases por local. A análise envolveu sequências de 24 nucleotídeos. Todas as posições contendo *gaps* e dados perdidos foram eliminadas. Houve um total de 495 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2015).82

Figura 10: Perfil eletroforético de amplificação por PCR da região *melA* de 20 bactérias isoladas de milho e oito estirpes de referência - *Bradyrhizobium sp.* (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici*

(SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080). Gel de agarose 1,3%. Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS)..... 100

Figura 11: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados por PCR da região *meIA* de 20 bactérias isoladas de milho e oito estirpes de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080)..... 102

Figura 12: Valores da absorbância em espectrofotômetro (DO) nos comprimentos de onda 300, 350 e 400 nm, do sobrenadante obtido com o cultivo de bactérias por 120h em caldo batata com L-triptofano 0,25 g.L⁻¹ e sulfato de cobre 0,008 g.L⁻¹, sob agitação (140 rpm) no escuro. 106

Figura 13: Produção de pigmentos melanina-*like* pelas bactérias crescidas por 120 horas em caldo batata com L-triptofano 0,25 g.L⁻¹ e sulfato de cobre 0,008 g.L⁻¹, sob agitação (140 rpm), no escuro..... 107

Figura 14: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados por PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA de 20 bactérias isoladas de milho e sete de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080)..... 112

Figura 15: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados da região REP por PCR de 20 bactérias isoladas de milho e oito de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080)..... 113

Figura 16: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados por PCR da região *atpD* de 20 bactérias isoladas de milho e nove

de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. leguminosarum* (SEMIA3012); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080)..... 114

Figura 17: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados por PCR da região *glnII* de 20 bactérias isoladas de milho e oito de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080)..... 115

Figura 18: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos gerados pela análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) de 20 bactérias isoladas de milho e nove de referência - *Bradyrhizobium elkanei* (SEMIA6156); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *B. sp.* (SEMIA6157); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080)..... 116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies e estirpes de bactérias utilizadas como referência no estudo.....	54
Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos e condições de amplificação utilizadas para as diferentes regiões.	58
Tabela 3: Concentração dos reagentes utilizados para o preparo das reações de amplificação (PCR) para cada região gênica.	59
Tabela 4: Perfis das bactérias isoladas do milho e de referência obtidos com a análise dos marcadores moleculares.	77
Tabela 5: Bactérias endofíticas isoladas de milho sequenciadas parcialmente para o gene 16S rDNA utilizando o oligonucleotídeo Y3, e identificação por homologia com sequências deste gene para as bactérias contidas no banco de dados NCBI.	81
Tabela 6: Análise dos fragmentos gerados pela reação de PCR da região <i>melA</i> de 20 bactérias isoladas de milho e oito estirpes de referência.	101
Tabela 7: Valores de pH, absorvância das células a 600 nm (DO_{600}), biomassa ($g.L^{-1}$) e concentração dos pigmentos melanina- <i>like</i> produzidos ($mg.mL^{-1}$) de bactérias crescidas por 120 horas em caldo batata com L-triptofano $0,25 g.L^{-1}$ e sulfato de cobre $0,008 g.L^{-1}$, sob agitação (140 rpm), no escuro.	104
Tabela 8: Análise dos fragmentos gerados pela reação de PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA de 20 bactérias isoladas de milho e sete de referência.	117
Tabela 9: Análise dos fragmentos gerados pela reação de PCR da região REP de 20 bactérias isoladas de milho e oito de referência.....	119
Tabela 10: Análise dos fragmentos gerados pela reação de PCR da região <i>atpD</i> de 20 bactérias isoladas de milho e nove de referência.	121
Tabela 11: Análise dos fragmentos gerados pela reação de PCR da região <i>glnII</i> de 20 bactérias isoladas de milho e oito de referência.....	123

Tabela 12: Fragmentos gerados pela análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) de 20 bactérias isoladas de milho e nove de referência..... 125

Tabela 13: Valores da absorvância em espectrofotômetro (DO) nos comprimentos de onda 300, 350 e 400 nm, do sobrenadante obtido com o cultivo de bactérias por 120h em caldo batata com L-triptofano 0,25 g.L⁻¹ e sulfato de cobre 0,008 g.L⁻¹, sob agitação (140 rpm) no escuro. 127

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2.2.1	Capítulo 1	19
2.2.2	Capítulo 2	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO EM PLANTAS	21
3.2	CULTIVO DO MILHO	22
3.3	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO ATMOSFÉRICO	24
3.4	BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS	25
3.5	RIZÓBIOS EM NÃO LEGUMINOSAS	27
3.6	BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS	27
3.7	PRODUÇÃO DE MELANINA EM BACTÉRIAS	29
3.8	TÉCNICAS MOLECULARES NOS ESTUDOS GENÉTICOS DE BACTÉRIAS DO SOLO	32
3.8.1	Organização do Genoma Bacteriano	33
3.8.2	Estudos com Marcadores Moleculares	34
3.8.2.1	Região Espaçadora Intergênica 16S-23S rRNA	35
3.8.2.2	Sequências de DNA Repetitivo	36
3.8.2.3	Genes <i>Housekeeping</i>	37
3.8.2.4	Gene 16S rRNA	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

CAPÍTULO 1 - ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE MILHO (<i>Zea mays</i> L.)		50
4.1	INTRODUÇÃO	51
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.2.1	Material Vegetal e Isolamento dos Microrganismos	53
4.2.2	Isolamento dos Microrganismos e Coleção de Culturas	53
4.2.3	Material Biológico.....	54
4.2.4	Armazenamento e Manutenção das Bactérias	55
4.2.5	Extração do DNA Total.....	55
4.2.6	Análise por Eletroforese em Gel de Agarose.....	57
4.2.7	Caracterização Genética dos Fragmentos Gerados por PCR	57
4.2.8	Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)	60
4.2.9	Análise dos Fragmentos Obtidos por Amplificação e Restrição	60
4.2.10	Purificação do Fragmento Amplificado do Gene 16S rRNA	61
4.2.11	Sequenciamento do Gene 16S rRNA.....	61
4.2.12	Edição das Sequências e Comparação em Banco de Dados.....	62
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.3.1	Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região Espaçadora Intergênica 16S-23S rRNA	63
4.3.2	Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região REP	66
4.3.3	Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região <i>atpD</i>	69
4.3.4	Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região <i>glnII</i>	71

4.3.5	Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região 16S rRNA	73
4.3.6	Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)	74
4.3.7	Análise dos Dados Utilizando os Marcadores Moleculares.....	76
4.3.8	Sequenciamento do Gene 16S rRNA	80
4.4	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
	CAPÍTULO 2 - ESTUDO DE PRODUÇÃO DE PIGMENTOS TIPO MELANINA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE MILHO (<i>Zea mays</i> L.)	90
5.1	INTRODUÇÃO	91
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	93
5.2.1	Material Biológico.....	93
5.2.2	Armazenamento e Manutenção das Bactérias	93
5.2.3	Extração do DNA Total.....	94
5.2.4	PCR da região <i>melA</i>	95
5.2.5	Análise dos Fragmentos Obtidos por Amplificação e Restrição	96
5.2.6	Produção de Melanina	96
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
5.3.1	Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região <i>melA</i>	99
5.3.2	Produção de Melanina	103
5.4	CONCLUSÃO	108
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
	ANEXOS.....	112

1 INTRODUÇÃO GERAL

A agricultura contemporânea, por suas grandes demandas para produção principalmente de alimentos, tem proposto muitas tecnologias sustentáveis de produção. Uma das áreas de estudo que tem proporcionado fontes de técnicas ambientalmente corretas de produção é a microbiologia agrícola, que tem identificado muitos microrganismos presentes no solo que estão associados às plantas. Muitas bactérias já foram identificadas colonizando o interior e o exterior de órgãos de plantas podendo ter efeitos benéficos, neutros ou prejudiciais ao crescimento dos vegetais. As Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (*Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria* - PGPR) são um dos tipos de bactérias associadas às plantas e em geral não são patogênicas, podendo atuar diretamente nas plantas, promovendo o crescimento, ou indiretamente, como agentes de controle biológico de doenças (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Os efeitos benéficos dessas bactérias nas plantas podem ser observados pelo aumento de área foliar, altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas e matéria seca, redução do tempo de aclimatização, maior sobrevivência de mudas, controle de doenças e aumento de produtividade. As principais bactérias promotoras de crescimento em plantas empregadas na agricultura são espécies de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Agrobacterium*, *Enterobacter cloacae*, entre outras (MARIANO *et al.*, 2004).

Alguns dos mecanismos pelos quais as PGPR podem melhorar o crescimento das plantas são: solubilização de fosfato; fixação biológica de nitrogênio atmosférico; inibição da formação de biofilme; produção de fitohormônios; atividade antifúngica; produção de compostos orgânicos voláteis; simbioses benéficas planta-microrganismo (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Dessa forma essas bactérias têm sido utilizadas como inoculante em várias plantas de importância agrícola como cana-de-açúcar, feijão, soja, arroz, milho entre outras. O milho é uma das plantas mais importantes cultivadas no continente

americano e no Brasil. Entre os cereais de grãos é um dos mais valiosos, devido enorme potencial de utilização. É usado na alimentação humana, na produção animal e ainda há uma grande quantidade de subprodutos que podem ser obtidos a partir dos grãos, com destaque para o etanol usado como combustível, principalmente nos Estados Unidos (LOPES *et al.*, 2008).

O nitrogênio é um dos nutrientes essenciais mais importantes para o cultivo do milho. Na maioria das vezes a quantidade disponível no solo é insuficiente para suprir a demanda por nitrogênio, sendo necessária a complementação com fertilizante nitrogenado para melhorar a sua produtividade. Essa fertilização aumenta os custos de produção e ainda traz impactos negativos ao meio ambiente (ACOSTA, 2009).

As bactérias fixadoras de nitrogênio, também chamadas de diazotróficas, podem ser utilizadas como alternativa para nutrição nitrogenada no cultivo de gramíneas de importância econômica, como, por exemplo, o milho. A utilização dessas bactérias visa diminuir o uso de insumos sem diminuir a produtividade. Uma alternativa para reduzir a necessidade de utilização de fertilizantes nitrogenados para o cultivo do milho é a utilização de inoculantes contendo bactérias diazotróficas. O uso dessas bactérias contribui para promoção do crescimento da planta, acúmulo de massa seca e resistência a pragas. Contudo, para que isso ocorra há a necessidade de ampliação de estudos de interação entre plantas e bactérias diazotróficas, para melhor utilização dessas bactérias na inoculação (ALVES, 2007).

Dessa maneira, atualmente pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de tornar viável práticas alternativas ao uso de fertilizantes nitrogenados convencionais, com o desafio de produzir tecnologia acessível e barata aos produtores. A fixação biológica do nitrogênio e a utilização de bactérias promotoras de crescimento em gramíneas têm se mostrado uma opção interessante sob os aspectos econômico e ambiental, apresentando resultados promissores em muitos estudos (CONCEIÇÃO *et al.*, 2011).

As ferramentas moleculares são muito úteis nos estudos em microbiologia e auxiliam na identificação e nos estudos de diversidade das bactérias presentes no solo associadas às plantas. Alguns exemplos dessas ferramentas são o uso de

marcadores moleculares, o sequenciamento de genes, entre outras (IKEDA *et al.*, 2013).

Muitas informações são geradas nos estudos que buscam entender a interação planta/bactéria. Dentre esses, os estudos da organização do genoma de bactérias do solo mostram que ele é complexo e variável, indicando grande diversidade nos tipos e estratégias de interação dessas bactérias com as plantas (MARTIN-DIDONET *et al.*, 2000; SOARES-RAMOS *et al.*, 2003; WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2011). O entendimento da organização genética promove um conhecimento básico dos genes da microbiota associada à planta e auxilia na elucidação dos mecanismos de interação planta-bactéria.

Além de promover o crescimento em plantas, algumas PGPR têm sido relatadas na literatura como produtoras do pigmento melanina pela enzima tirosinase. A produção desse pigmento parece não estar relacionada à promoção do crescimento em plantas, mas estudos envolvendo a produção desse pigmento podem identificar bactérias promissoras na obtenção de bioprodutos, pois tanto a melanina quanto a tirosinase possuem importantes aplicações comerciais. Um exemplo de PGPR produtoras de melanina são as que pertencem à ordem *Rhizobiales* (CUBO *et al.*, 1988).

Assim os estudos de caracterização genética e bioquímica de bactérias endofíticas associadas às raízes de plantas de milho, cultivadas no Cerrado goiano, contribuem na seleção de estirpes bacterianas mais eficientes para serem utilizadas na formulação de inoculantes nas variedades de milho cultivadas no Brasil. É possível também obter produtos provenientes dessas bactérias, como, por exemplo, pigmentos melanina-*like* e a enzima tirosinase, com aplicações comerciais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização genética e bioquímica de 20 bactérias endofíticas isoladas de milho (*Zea mays* L.) do Cerrado goiano.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Capítulo 1

- 1 Avaliar a diversidade genética de 20 bactérias endofíticas isoladas de milho (*Zea mays* L.) do Cerrado goiano, baseada em marcadores moleculares:
 - a. Região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA;
 - b. Regiões palindrômicas extragênicas repetidas (REP - *Repetitive Extragenic Palindromic*);
 - c. Genes *atpD*, *glnII* e 16S rRNA;
 - d. Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA - *Amplified 16S Ribossomal DNA Restriction Analysis*) com endonuclease *HaeIII*;
- 2 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

2.2.2 Capítulo 2

- 1 Identificar a presença e avaliar a diversidade genética do gene relacionado à produção de melanina (*melA*) em 20 bactérias endofíticas isoladas de milho (*Zea mays* L.) do Cerrado goiano;
- 2 Avaliar a capacidade de produção de pigmentos tipo melanina (*melanina-like*) em 20 bactérias endofíticas isoladas de milho (*Zea mays* L.) do Cerrado goiano.

3 REFERENCIAL TEÓRICO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO EM PLANTAS

Interações planta-microrganismos abrangem uma ampla gama de relações em que um ou ambos os organismos podem ter um efeito benéfico, neutro ou negativo sobre o outro parceiro (FARRAR; BRYANT; COPE-SELBY, 2014). Rizobactérias promotoras do crescimento em plantas (*Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria* - PGPR) são bactérias de vida livre que colonizam plantas ativamente, exercendo efeitos benéficos sobre o desenvolvimento das plantas por uma grande variedade de mecanismos. A PGPR pode (i) promover o crescimento das plantas utilizando seu próprio metabolismo (solubilizando fosfatos, produzindo hormônios, fixando nitrogênio, entre outros) ou afetando diretamente o metabolismo da planta (aumentando a absorção de água e sais minerais, promovendo o crescimento e desenvolvimento celular por fitohormônio exógeno, etc.), melhorando o desenvolvimento radicular, aumentando a atividade enzimática da planta ou "ajudando" outros microrganismos benéficos para melhorar a sua ação nas plantas; (ii) ou pode promover o crescimento através da supressão de patógenos de plantas (PÉREZ-MONTAÑO *et al.*, 2014).

Introdução e exploração de rizobactérias promotoras do crescimento em plantas na agricultura melhora a fertilidade do solo, a produtividade agrícola e reduz o impacto negativo de fertilizantes químicos no ambiente. Houve um progresso na última década em utilizar PGPR em uma variedade de plantas como milho, arroz, trigo, soja e feijão (PÉREZ-MONTAÑO *et al.*, 2014; ZAHID *et al.*, 2015).

Há vários trabalhos descrevendo a associação de PGPR com o milho. Dentre os gêneros descritos estão *Azospirillum* (MEHNAZ; WESELOWSKI; LAZAROVITS, 2007), *Bacillus* (KAVAMURA *et al.*, 2013), *Bradyrhizobium* (LIAN *et al.*, 2002),

Burkholderia (ZHAO *et al.*, 2014), *Enterobacter* (MORALES-GARCÍA *et al.*, 2011), *Gluconacetobacter* (TIAN *et al.*, 2009), *Herbaspirillum* (BALDANI *et al.* 1986), *Klebsiella* (IKEDA *et al.*, 2013), *Paenibacillus* (VON DER WEID *et al.*, 2002), *Pantoea* (GOND *et al.*, 2015), *Pseudomonas* (CHAUDHRY *et al.*, 2015), *Rhizobium* (CHABOT *et al.*, 1996), *Serratia* (KOO; CHO, 2009), *Xanthomonas* (LAMBERT *et al.*, 1987), etc.

3.2 CULTIVO DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é muito utilizado na alimentação humana e de animais. Além disso, constitui matéria-prima básica para produtos industrializados, criando e movimentando grandes complexos industriais onde empregos são gerados e favorecendo a fixação e manutenção do homem no campo (ALVES, 2007).

Originário da América, o milho espalhou-se por outras regiões logo após o descobrimento desse continente. Hoje é um dos cereais mais cultivados em todos os continentes e sua produção só perde para a do trigo e do arroz. É um dos alimentos mais nutritivos que existem. Puro ou como ingrediente de outros produtos, é uma importante fonte energética para o homem. O milho traz em sua composição vitaminas A e do complexo B, proteínas, lipídeos, carboidratos, sais minerais (cálcio, ferro, fósforo, potássio) e amido. As cascas dos grãos são ricas em fibras (ABIMILHO, 2015).

A produção de milho tem crescido nas últimas décadas, principalmente nos Estados Unidos, maior produtor mundial, na China e no Brasil. O Japão e a União Europeia são os principais importadores mundiais de milho. Os Estados Unidos veem na produção de etanol de milho, a solução para livrar-se da dependência do petróleo. No processo de destilação, ocorre uma separação entre o álcool produzido e os resíduos do processo. Os resíduos, depois de centrifugados e secos, transformam-se em coprodutos da produção de etanol, um farelo rico em proteínas, que pode ser usado na composição de rações (CALDARELLI; BACCHI, 2010).

No Brasil, terceiro maior produtor mundial de milho, a menor parte do cultivo do grão é para atender ao consumo humano. O principal destino da safra são as indústrias de rações para animais. O milho é plantado principalmente nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul. O grão é transformado em óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose e flocos para cereais matinais (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2015).

O cultivo do milho é uma atividade que vem crescendo muito no Brasil, em função da lucratividade e da diversificação de seu uso. Com o crescimento da atividade e para atender a um mercado cada vez mais exigente, torna-se necessário utilizar tecnologias de cultivo apropriadas (PEREIRA FILHO, 2002).

O plantio ocorre praticamente durante o ano todo. Para facilitar, a cultura foi denominada de acordo com a época de plantio: milho safra ou primeira safra, plantado de agosto a dezembro; e milho safrinha ou segunda safra, plantado de janeiro a maio. O período mais expressivo para o plantio ocorre na safra, mas o milho safrinha vem ganhando espaço, desde a década de 80, como alternativa viável de atividade econômica e de produto para consumo próprio no período de outono-inverno (PEDRINHO, 2009).

A cadeia produtiva do milho é uma das mais importantes do agronegócio brasileiro e responde por 37% da produção nacional de grãos (CALDARELLI; BACCHI, 2010). No Brasil, segundo estimativa de março de 2016, a produção total desse cereal foi 84,659 milhões de toneladas. A área total plantada foi 15,480 milhões de hectares e a produtividade foi de 5.469 kg por hectare. Esses dados são referentes ao milho total, primeira e segunda safras. O preço internacional do milho na Bolsa de Chicago em março de 2016 foi de US\$ 137,78 por tonelada. No ano de 2015 as exportações foram de 28,9 milhões de toneladas (CONAB, 2016).

A demanda por alimentos, ração animal, e matérias-primas para aplicações em bioenergia e biorefinação, está aumentando com o crescimento populacional, a urbanização e a riqueza. Sistemas de produção vegetal devem ser melhorados para produzir altos rendimentos. Soluções biológicas têm representado alternativas para fertilizantes e pesticidas derivados de petroquímicos com redução de custos e aumento da produtividade (FARRAR; BRYANT; COPE-SELBY, 2014).

3.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO ATMOSFÉRICO

O nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas é o nitrogênio, por ser um constituinte dos ácidos nucleicos e de proteínas, moléculas fundamentais para todos os processos biológicos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). As principais fontes de nitrogênio são: o solo, a partir da decomposição da matéria orgânica; fertilizantes e insumos ricos em compostos nitrogenados; e nitrogênio atmosférico. Somente as bactérias fixadoras de nitrogênio são capazes de realizar a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (HUNGRIA; ARAÚJO, 1994).

Embora o nitrogênio atmosférico (N_2) constitua, aproximadamente, 80% dos gases atmosféricos, nenhum animal ou planta consegue utilizá-lo como nutriente, devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos do N_2 . Os gases atmosféricos difundem-se para o espaço poroso do solo e o N_2 consegue ser aproveitado por bactérias que ali habitam graças à ação da enzima chamada dinitrogenase, que é capaz de romper a tripla ligação do N_2 e reduzi-lo a amônia (NH_3). Essas bactérias fixadoras de N_2 , também denominadas diazotróficas, se associam a diversas espécies de plantas (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é realizada por bactérias de diversos grupos filogenéticos. Essas bactérias podem viver livres em diversos ecossistemas, estabelecer simbioses com leguminosas ou estar associadas às plantas, sendo nesse último caso denominadas de diazotróficas associativas. Os estudos com bactérias diazotróficas são de grande importância, devido à contribuição para o fornecimento de nitrogênio a diversos ecossistemas, naturais ou manejados (MOREIRA *et al.*, 2010).

A produtividade do cultivo de plantas tem sido garantida pela utilização de quantidades substanciais de fertilizantes nitrogenados, mas o uso excessivo desses fertilizantes representa riscos de contaminação ambiental e aumento nos custos de produção (ROESCH *et al.*, 2005).

A inoculação é o processo em que bactérias fixadoras de nitrogênio são adicionadas às sementes das plantas antes da semeadura. A inoculação é feita com o inoculante, um caldo com elevada concentração de bactérias, misturado a um

veículo (MENDES; REIS JUNIOR; DA CUNHA, 2010). A inoculação com bactérias diazotróficas é uma opção atraente, pois ao reduzir as necessidades de fertilizantes nitrogenados poderá diminuir a poluição e amenizar os altos custos desse insumo no cultivo de gramíneas, como o milho, suprimindo parcialmente a necessidade de nitrogênio. A identificação dessas bactérias e a realização de testes que confirmem sua capacidade de promover o crescimento em plantas de uma cultura são passos necessários para projetar inoculantes microbianos eficazes (CONCEIÇÃO *et al.*, 2011; PAUNGFOO-LONHIENNE *et al.*, 2014).

3.4 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

De acordo com a classificação filogenética a maior parte das bactérias fixadoras de nitrogênio são proteobactérias. Na subdivisão alfa-proteobacteria, incluem-se os gêneros *Rhodospirillum*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Mesorhizobium*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*. Na subdivisão beta-proteobacteria estão bactérias dos gêneros *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Alcaligenes*, *Azoarcus*. Na subdivisão gamma-proteobacteria está classificada uma minoria de bactérias diazotróficas, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Serratia*. No filo Firmicutes encontram-se os gêneros *Clostridium*, *Bacillus* e *Paenibacillus*. (REIS; TEIXEIRA, 2015).

A relação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e plantas leguminosas (família de plantas a qual pertencem a soja, o feijão, a ervilha entre outras) é chamada de simbiose. A simbiose é caracterizada pela formação de estruturas especializadas nas raízes, chamadas nódulos, nos quais ocorre a FBN. Essas bactérias, denominadas rizóbios (alfa-proteobactérias da ordem *Rhizobiales*), realizam fixação do nitrogênio atmosférico em compostos orgânicos que são utilizados pelas plantas, o que elimina ou diminui a necessidade de uso de adubos nitrogenados (MENDES; REIS JUNIOR; DA CUNHA, 2010).

Os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* são capazes de desenvolver simbiose formando nódulos na raiz de leguminosas. A importância dessa associação é devido ao elevado nível de dinitrogênio molecular fixado, a eficiência do processo, e o interesse econômico, social e ecológico das plantas envolvidas. A fixação simbiótica de nitrogênio ocorre nos nódulos originados nas raízes de leguminosas como consequência da infecção microssimbionte. Nos nódulos, as bactérias são transformadas em bacterióides, que são capazes de utilizar fotoassimilados como energia, elétrons, e fontes de carbono para realizar a transformação de N_2 para amônia. Após esse processo, amônia é incorporada ao metabolismo da planta. Todo o processo envolve uma interação complexa entre os dois parceiros (bactérias e plantas) (MERCADO-BLANCO; TORO, 1996).

Bactérias capazes de fixar o nitrogênio atmosférico já foram encontradas em associação com gramíneas, como o milho, o trigo e a cana-de-açúcar. Nessas plantas, não ocorre formação de nódulos nas raízes e as quantidades fixadas de nitrogênio são mais baixas. Sendo assim não é possível dispensar a utilização de adubos nitrogenados nessas lavouras. Como não há a formação de nódulos, as bactérias localizam-se na região rizosférica, na superfície das raízes ou dentro dos tecidos das raízes, colmos e folhas, e são conhecidas como bactérias endofíticas (MENDES; REIS JUNIOR; DA CUNHA, 2010).

Um número relativamente pequeno de interações benéficas planta-microrganismo são bem conhecidas e exploradas. Outras permanecem pouco estudadas e representam um reservatório inexplorado para melhorar a produção vegetal. Pode haver aplicações para estirpes bacterianas como biopesticidas e biofertilizantes microbianos para aumentar a produção de biomassa em culturas. Esses microrganismos compreendem um recurso com genomas microbianos de reduzida complexidade e características adaptativas de grande interesse para uma ampla variedade de aplicações (FARRAR; BRYANT; COPE-SELBY, 2014).

3.5 RIZÓBIOS EM NÃO LEGUMINOSAS

O Brasil é um dos países pioneiros em utilização de bactérias diazotróficas como produtos comerciais compostos por bactérias do solo chamadas rizóbios, que formam estruturas especializadas nas raízes das plantas para a redução e o repasse do nitrogênio em uma forma assimilável para as leguminosas. Entretanto, estudos apontam que alguns desses microrganismos, tais como *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium etli*, têm habilidade de colonizar as raízes de plantas não leguminosas, sugerindo outro mecanismo de estimulação para o crescimento e desenvolvimento da planta (PEDRINHO, 2009).

Devido à sua grande capacidade colonizadora, bactérias do gênero *Rhizobium* podem ser usadas em não leguminosas para melhorar o crescimento das culturas (QURESHI *et al.*, 2013). A vantagem do uso de rizóbios como PGPR em não leguminosas vem de sua segurança, devido ausência de qualquer potencial de risco associado com a sua utilização em leguminosas por muitas décadas (CHABOT *et al.*, 1996). Há várias pesquisas em que bactérias do gênero *Rhizobium* são encontradas associadas ao milho. Alguns exemplos são *R. leguminosarum* (CHABOT *et al.*, 1996), *R. etli* (GUTIÉRREZ-ZAMORA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2001) e *R. tropici* (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2004).

3.6 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Bactérias fixadoras de nitrogênio colonizadoras de gramíneas podem ser agrupadas em organismos da rizosfera, endófitos facultativos e endófitos obrigatórios. Organismos da rizosfera são todas as espécies que colonizam a superfície da raiz, tais como *Azotobacter paspali*, *Beijerinckia* sp. Endófitos facultativos são bactérias que podem colonizar a superfície e interior das raízes principalmente espécies de *Azospirillum*, exceto *Azospirillum halopraeferans*. Endófitos obrigatórios são capazes de colonizar o interior da raiz e tecidos aéreos das plantas, como *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* sp. e *Azoarcus* sp. Os

endófitos obrigatórios têm atraído atenção, pois a capacidade de colonizar o interior da planta e localizar-se em locais protegidos de oxigênio ou outros fatores tornam o grupo mais promissor de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas e outras plantas não leguminosas (BALDANI *et al.*, 1997).

As maiores taxas de FBN ocorrem em leguminosas noduladas por endosimbiontes, um modelo já bem documentado de associação de planta-bactérias diazotróficas. No entanto, também foi mostrado que culturas economicamente importantes, como, por exemplo, de milho, podem obter uma parte substancial do seu nitrogênio via FBN, interagindo com bactérias diazotróficas endofíticas. Um dos resultados mais relatados dessa associação é a promoção do crescimento das plantas. Além de fixar nitrogênio, essas bactérias podem também produzir hormônios de crescimento da planta, e algumas espécies são relatadas para melhorar a absorção de nutrientes e aumentar a tolerância da planta a estresses. Assim, esse tipo particular de associação planta-bactéria consiste de um sistema benéfico natural a ser explorado (CARVALHO *et al.*, 2014).

Nos últimos anos tem havido um crescente interesse no estudo da ocorrência, do potencial de colonização e da utilização de bactérias endofíticas para promoção de crescimento e controle biológico de doenças de plantas. Essas bactérias não estão sujeitas à competição por nutrientes que normalmente ocorrem no solo da rizosfera e têm maior eficiência, pois ao contrário das colonizadoras de rizosfera, já estão internamente no sistema radicular, onde os compostos bioativos sintetizados por elas encontram-se prontamente disponíveis às plantas. A associação planta-bactéria endofítica consiste numa interação íntima, na qual a planta fornece os nutrientes e habitat, enquanto a bactéria irá promover o crescimento e sanidade da planta (MARIANO *et al.*, 2004).

Os gêneros de bactérias associativas em plantas mais conhecidos são *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pantoea* e *Serratia* (MOREIRA *et al.*, 2010).

Roesch (2003) realizou um estudo para avaliar a ocorrência e a distribuição de diazotróficos associados a cultivares de milho no estado do Rio Grande do Sul. Através de isolamento de bactérias em meios específicos, quantificação da fixação

biológica do nitrogênio e análise da produção de substâncias promotoras de crescimento de plantas, detectou a presença de bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* colonizando o solo da rizosfera, as raízes e colmo das plantas.

Alves (2007) realizou um trabalho para testar o efeito da promoção de crescimento de estirpes pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho. Foi avaliada a produtividade de grãos e o teor de nitrogênio dos grãos. Os resultados obtidos mostraram que a aplicação do inoculante incrementou a produtividade de milho em até 34%. Também houve contribuições para a nutrição nitrogenada através da FBN.

3.7 PRODUÇÃO DE MELANINA EM BACTÉRIAS

Muitas bactérias têm sido descritas como produtoras de melanina, um composto de interesse econômico. Essa substância exerce funções variadas nos microrganismos que a produzem. Muitas dessas funções estão relacionadas à proteção contra injúrias externas e vantagens ambientais (KURIAN; BHAT, 2014; SOLANO, 2014).

Em alguns microrganismos a produção de melanina tem sido ligada à patogenicidade e virulência em seus respectivos hospedeiros (animais ou plantas) (KEITH *et al.*, 2007). Em *Burkholderia cenocepacia*, a produção de melanina confere proteção à bactéria e é responsável por diminuir a reação do sistema imune em pacientes com fibrose cística (ZUGHAIER; RYLEY; JACKSON, 1999).

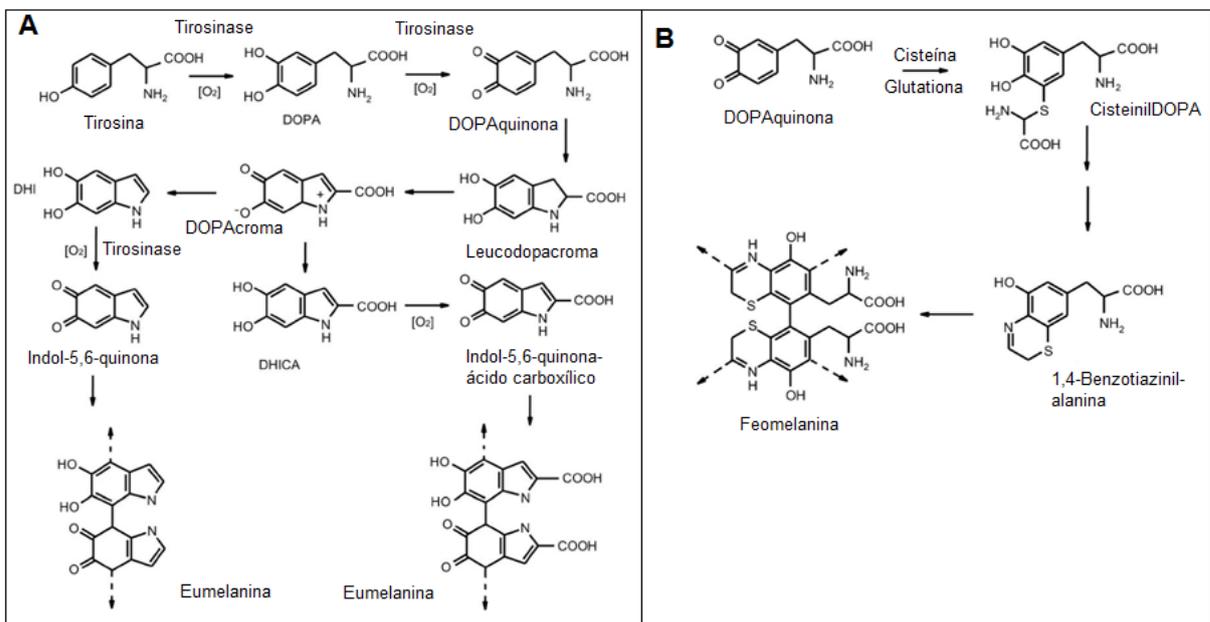
Na agricultura, o papel da produção de melanina em rizóbios ainda não está claro. Uma hipótese é que a tirosinase pode atuar na detoxificação de compostos polifenólicos que se acumulam nos nódulos senescentes (CUBO *et al.*, 1997). Também foi observado maior teor de matéria orgânica em plantas associadas à rizóbios produtores de melanina (FONTOURA *et al.*, 2011).

Os pigmentos melanina-*like* são polímeros multifuncionais encontrados na natureza. Possuem alto peso molecular, são insolúveis ou pouco solúveis em água e

se formam através da polimerização oxidativa de compostos fenólicos. Os três principais tipos de melanina reconhecidos são: eumelaninas, pigmentos de cor preta ou marrom, formadas por um processo complexo de polimerização envolvendo quinonas e radicais livres; feomelaninas, pigmentos amarelos ou vermelhos, derivadas a partir de tirosina e cisteína; e alomelaninas, grupo mais heterogêneo e menos estudado, formadas a partir de precursores livres de nitrogênio (HAMILTON; GOMEZ, 2003; KURIAN; BHAT, 2016).

Como existe uma variedade na estrutura e na ocorrência de melanina, a sua biogênese não é um processo único e universal. Estudos em vários organismos levaram a vários esquemas biossintéticos com uma característica geral em todas as vias: na fase inicial ocorre a oxidação, catalisada por enzima, de compostos fenólicos precursores para formar quinonas; e na fase final ocorre a polimerização irregular de quinonas (Figura 1) (SOLANO, 2014).

Figura 1: Vias de formação de eumelanina (A) e feomelanina (B).



Fonte: PLONKA; GRABAKA, 2006.

A tirosinase é uma das enzimas associadas com a produção de melanina e que está presente em animais, plantas e microrganismos. Essa enzima utiliza o oxigênio molecular (O_2) para catalisar duas reações enzimáticas diferentes: a

hidroxilação de monofenóis a o-difenóis (atividade monofenolase) e a oxidação de o-difenóis para o-quinonas (atividade difenolase). As quinonas reagem espontaneamente entre si formando melanina (SEO; SHARMA; SHARMA, 2003; FAIRHEAD; THÖNY-MEYER; 2012).

A produção de tirosinase e a síntese de melanina são naturalmente induzidas por estresses exógenos, tais como o calor e estresse hiperosmótico, e por compostos específicos, tais como tirosina e presença de cobre, um metal que é cofator essencial (FACCIO *et al.*, 2012).

Estirpes recombinantes de *Escherichia coli* têm sido geradas por transformação genética para produção de melanina e também para caracterização da enzima tirosinase. Esses estudos fornecem informações úteis sobre a diversidade bioquímica dessas enzimas e seu potencial para aplicação na indústria (CABRERA-VALLADARES *et al.*, 2006; SABIDO *et al.*, 2013).

Análises do genoma das bactérias produtoras de melanina demonstram grande variabilidade quanto aos genes que codificam a enzima tirosinase. Cubo e colaboradores (1988) demonstraram que os genes *mel* que codificam tirosinase estão presentes em plasmídeos, tanto simbióticos quanto não simbióticos, de rizóbios e que em algumas estirpes a produção de melanina não é essencial para nodulação ou fixação de nitrogênio.

Bactérias produtoras de pigmentos podem ser provenientes de várias fontes ambientais. Vários meios de crescimento podem ser utilizados para isolar diferentes tipos dessas bactérias. Os pigmentos produzidos pelas bactérias podem ser separados, utilizando extração por solvente, e caracterizados, por várias técnicas analíticas, como por exemplo, HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography* - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013).

Tirosinases microbianas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas comerciais. Possuem aplicações: na tecnologia ambiental, pois a síntese de o-difenóis por essa enzima é uma capacidade catalítica utilizada para desintoxicação de águas de esgoto contendo fenol e de solos contaminados e também como biosensor no monitoramento de fenol; nas indústrias farmacêuticas são utilizadas para produção de L-DOPA, compostos estrogênicos, produção de repelentes de mosquitos; nas indústrias cosméticas, como agente de auto bronzeamento; nas

indústrias alimentares para produção de aditivos alimentares; entre outras (FACCIO *et al.*, 2012; ZAIDI *et al.*, 2014).

O pigmento melanina sintetizado pela tirosinase tem aplicações como: proteção contra radiação; transportador de droga; antioxidante; agente antiviral, inibindo a replicação do vírus da imunodeficiência adquirida tipo 1 e 2 (HIV-1 e HIV-2), imunógeno, produção de nanoestruturas de prata e ouro (ZAIDI *et al.*, 2014; KURIAN; BHAT, 2016).

Apesar da importância do estudo dos genes relacionados à produção de pigmentos tipo melanina (*melanina-like*) em bactérias, esses são escassos. A utilização de marcadores moleculares para a detecção dos genes relacionados a essa via de produção em microrganismos associados a plantas no Cerrado pode fornecer grande informação, além de identificar diferentes bactérias produtoras que poderão ser utilizadas na formulação de bioprodutos.

3.8 TÉCNICAS MOLECULARES NOS ESTUDOS GENÉTICOS DE BACTÉRIAS DO SOLO

As diversas espécies de rizóbios podem ser classificadas utilizando testes morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e simbióticos. Contudo, as técnicas de biologia molecular vêm ganhando um espaço crescente nos estudos de taxonomia de rizóbios devido ao fato de constituírem um grupo filogeneticamente heterogêneo. Os estudos de caracterização genética e a identificação de estirpes eficientes e competitivas auxiliam no processo que leva a formulação de inoculantes (CHUEIRE *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A fixação de N₂ por PGPR desempenha papel fundamental na sustentabilidade agrícola. A avaliação da diversidade genética de rizóbios está contribuindo para o conhecimento mundial da biodiversidade de microrganismos do solo e para a utilidade das coleções de rizóbios, e está desenvolvendo estratégias de longo prazo para aumentar as contribuições da fixação do nitrogênio para a produtividade agrícola. Nas últimas décadas, o uso de técnicas moleculares tem

contribuído muito para aumentar o conhecimento da diversidade de rizóbios (OGUTCU *et al.*, 2009).

Somente com a aplicação de ferramentas da biologia molecular foi possível detectar uma grande diversidade bacteriana que não havia sido observada antes por meio de testes morfológicos e fisiológicos. A partir disso os estudos de diversidade têm sido focados no DNA bacteriano. As técnicas moleculares utilizadas baseiam-se no isolamento do DNA bacteriano e na amplificação de genes marcadores que são comparados entre si e utilizados para a descrição da filogenia dos microrganismos. Além disso, esses genes amplificados podem ser utilizados na identificação desses microrganismos através do sequenciamento. Na agricultura há um interesse em detectar a diversidade de bactérias associadas às plantas devido ao fato de que essas bactérias podem promover o crescimento de plantas (ROESCH, 2007).

3.8.1 Organização do Genoma Bacteriano

Os estudos empregando técnicas moleculares mostram que os genomas bacterianos normalmente são particionados em vários *replicons* que são estruturas dinâmicas propensas à mutação e rearranjos genômicos, fato que contribui para a evolução do genoma (MAVINGUI *et al.*, 2002). Os rizóbios são um dos tipos de PGPR muito estudadas e apresentam grande complexidade do genoma. Uma das suas características gerais é a existência de uma grande quantidade de DNA extra-cromossômico, chamados plasmídeos. Esses plasmídeos variam em número (1 a 10) e tamanho, mas em geral eles são de massa molecular elevada (100 a 300 Mda), atingindo uma massa molecular > 1.000 Mda como ocorre em *R. meliloti* com os chamados megaplasmídeos. Eles podem constituir uma grande porcentagem do genoma da célula, por exemplo, até 45% do genoma de *R. etli* (MARTINEZ; ROMERO; PALACIOS, 1990; MARTÍNEZ-ROMERO, 1994).

Em algumas espécies de rizóbios, a maioria dos genes essenciais requeridos no processo simbiótico estão localizados em plasmídeos, que são denominados plasmídeos simbióticos ou pSyms. No entanto, a maioria dos rizóbios possuem plasmídeos que não são essenciais para o estabelecimento de um estado simbiótico

completo, esses são chamados de não-Psym, crípticos ou simplesmente grandes plasmídeos (MERCADO-BLANCO; TORO, 1996). Em um estudo sobre a arquitetura do genoma em *Rhizobium* sp. estirpe NGR234 foi observado que seu genoma é constituído por três *replicons*: o plasmídeo simbiótico (536,165 pares de base - pb), o megaplasmídeo (> 2.000 kilobases - kb) e o cromossomo (> 3.700 kb) (MAVINGUI *et al.*, 2002).

Através do uso de marcadores moleculares e do sequenciamento de genes em vários microrganismos associados às plantas, é possível um maior entendimento da expressão dos genes relacionados à interação das PGPR com as plantas e os diferentes ambientes. Essas abordagens indicam a importância de estudos que abordem a estrutura do genoma para possíveis utilizações biotecnológicas e como contribuição no entendimento das expressões genéticas desses grupos de PGPR (LÓPEZ-LEAL, *et al.*, 2014).

3.8.2 Estudos com Marcadores Moleculares

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma das técnicas empregadas no estudo do ácido desoxirribonucleico (DNA). A PCR realiza amplificação de pequenos segmentos específicos do genoma com a utilização de oligonucleotídeos (sequências iniciadoras) que possuem sequências complementares às sequências localizadas em locais específicos do genoma. O ciclo da PCR compõe a desnaturação do DNA, o anelamento dos oligonucleotídeos e a extensão do fragmento de DNA pela ação da enzima termoestável *Taq* DNA polimerase (isolada originalmente do microrganismo *Thermus aquaticus*) Esse ciclo é repetido várias vezes, permitindo amplificação em grande número da sequência específica e obtenção de várias cópias de determinada região do DNA (SAIKI *et al.*, 1985).

A alta sensibilidade da PCR é devido aos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação. O fato de o código genético ser degenerado permite que diferentes trincas de nucleotídeos codifiquem uma mesma proteína. Oligonucleotídeos iniciadores são chamados degenerados quando são formados por uma mistura de sequências, ao invés de uma única sequência específica, e

permitem cobrir todas as possibilidades de códons responsáveis pela síntese de uma proteína. Oligonucleotídeos degenerados são muito úteis quando se deseja estudar espécies que não apresentam seu código genético sequenciado e também quando há alta incidência de polimorfismos gênicos entre os organismos a serem estudados, sendo uma estratégia bem eficiente em estudos genéticos (OLIVEIRA, *et al.*, 2015).

Marcadores moleculares são características do DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente. A amplificação do DNA é um dos principais tipos de marcadores moleculares disponíveis que permite detectar diferenças entre os microrganismos, revelando variabilidade ao nível de DNA, e observar a diversidade genética de bactérias. É também uma etapa importante para o sequenciamento de genes (MILACH, 1998).

3.8.2.1 Região Espaçadora Intergênica 16S-23S rRNA

Análise da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA é um método de análise que fornece estimativas de diversidade microbiana. O método envolve a amplificação por PCR, a partir de DNA bacteriano total, da região espaçadora entre os genes da subunidade pequena (16S) e grande (23S) do rRNA, com os oligonucleotídeos direcionados para regiões conservadas dos genes 16S e 23S e explora a heterogeneidade do comprimento da região espaçadora intergênica. Na região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA de rizóbios foram identificadas sequências codificando tRNA específicos (tRNA^{Ile} e tRNA^{Ala}). Essa região exibe heterogeneidade significativa no comprimento e sequência de nucleotídeos. Com a realização da eletroforese do produto da PCR (uma mistura de fragmentos) o resultado é um padrão de bandas complexas que fornece um perfil específico e heterogêneo. O sequenciamento dessa região é utilizado em análises filogenéticas (FISHER; TRIPLET, 1999; KWON *et al.*, 2005).

Polimorfismos de comprimento dentro da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA têm sido descritos como marcadores genéticos estáveis para o estudo de filogenia bacteriana. Os oligonucleotídeos são complementares às sequências

altamente conservadas que flanqueiam as regiões espaçadoras entre os genes 16S e 23S rRNA. Polimorfismos no comprimento do DNA amplificado distinguem isolados não relacionados de uma mesma espécie permitindo estabelecer relações filogenéticas entre os organismos estudados (KOSTMAN *et al.*, 1992; LIGUORI *et al.*, 2011).

3.8.2.2 Sequências de DNA Repetitivo

Sequências repetitivas intercaladas em genomas procarióticos podem ser amplificadas por PCR para obter *fingerprinting* genômico (rep-PCR). Oligonucleotídeos complementares às sequências repetitivas intercaladas permitem à amplificação de fragmentos de DNA de tamanhos diferentes que consistem em sequências que se situam entre esses elementos. Os fragmentos podem ser fracionados por eletroforese com o estabelecimento de padrões de *fingerprint* de DNA específicos para as estirpes bacterianas individuais. Esses padrões podem ser comparados para estimar graus relativos de similaridade entre os isolados e ajudar a determinar se os isolados são relacionados. Exemplos de sequências de DNA repetitivo conservadas evolutivamente são BOX, ERIC e REP (VERSALOVIC *et al.*, 1994). Ampla distribuição desses elementos de DNA repetitivos nos genomas de vários microrganismos permite a rápida identificação de espécies bacterianas e estirpes, e são úteis para a análise de genomas procarióticos (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991).

Sequências palindrômicas extragênicas repetidas (REP - *Repetitive Extragenic Palindromic*) de DNA bacteriano são encontradas não apenas em repetições entre genes do mesmo operon, mas também em ocorrências individuais e entre diferentes operons. A função dos elementos REP não está completamente determinada, mas estão envolvidos em processos importantes, como transcrição e estabilidade do mRNA ou processamento, possuem relação com elementos de transposição e papel na evolução do genoma bacteriano, sendo uma ótima ferramenta para estudos filogenéticos (GILSON *et al.*, 1984; TOBES; PAREJA, 2006).

3.8.2.3 Genes *Housekeeping*

Os genes *housekeeping*, que codificam proteínas com funções conservadas, são altamente conservados entre as bactérias da ordem *Rhizobiales*. Esses genes são amplificados e sequenciados para refinar a análise filogenética. Alguns exemplos de genes *housekeeping* que codificam proteínas importantes são o gene *atpD*, que codifica a cadeia-beta da ATP sintase; o gene *dnaK*, que codifica uma proteína chaperona; o gene *glnII*, que codifica glutamina sintetase II; e o gene *recA* que codifica a proteína de recombinação RecA (MENNA; BARCELLOS; HUNGRIA, 2009).

O complexo ATP sintase está localizado na membrana plasmática de células procarióticas e catalisa a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico. O operon *atp* possui nove genes que codificam as subunidades da enzima ATP sintase. As sequências de aminoácidos das nove subunidades são muito similares entre os organismos (SANTANA *et al.*, 1994).

Rizóbios possuem duas isoformas de glutamina sintetase: I, codificada pelo gene *glnA*, e II, codificada pelo gene *glnII* (CARLSON; MARTIN; CHELM, 1987). A glutamina sintetase atua no metabolismo do nitrogênio, pois assimila a amônia, produto da fixação de N₂ pela enzima nitrogenase, e fornece glutamina para a síntese de proteínas da célula (HOSTED; ROCHEFORT; BENSON, 1993).

3.8.2.4 Gene 16S rRNA

A comparação das sequências de rRNA é uma ferramenta poderosa para deduzir relações filogenéticas e evolutivas entre as bactérias, arqueobactérias e organismos eucarióticos (WEISBURG *et al.*, 1991). Análises das sequências de regiões altamente conservadas do genoma bacteriano, tal como o gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal (rRNA), têm sido utilizadas como um método universal para classificação microbiana e para estabelecer relações evolucionárias entre organismos (ROESCH, 2007). Como resultado do uso generalizado da PCR e

do sequenciamento de DNA, o sequenciamento do gene 16S rRNA tem desempenhado um papel fundamental na identificação precisa de isolados bacterianos e da descoberta de novas bactérias (WOO *et al.*, 2008).

Para amplificação e sequenciamento do gene 16S é necessário escolher um segmento longo e variável suficiente para permitir conclusões confiáveis ao comparar com outras bactérias. Os oligonucleotídeos são complementares a sequências conservadas. O gene 16S rRNA (corresponde às posições 20-1.507 em *Escherichia coli*) pode ser amplificado com os oligonucleotídeos Y1 *forward*, que corresponde às posições 20 a 43 do gene 16S rRNA de *E. coli*, e Y3 *reverse*, que corresponde às posições 1.482 a 1.507 do gene 16S rRNA de *E. coli* (YOUNG *et al.*, 1991; CRUZ *et al.*, 2001).

O acoplamento de abordagens tradicionais com o sequenciamento para avaliar a ecologia e a fisiologia de organismos trará novas perspectivas para entender a vida microbiana na rizosfera. Desvendar o microbioma da rizosfera também tem potencial para melhorar a proteção das culturas e para descobrir numerosos microrganismos ainda desconhecidos do solo, funções e genes para diversas aplicações. Programas de melhoramento de plantas são direcionados para desvendar a base molecular das interações entre microrganismos da rizosfera e plantas (MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013).

Outro estudo que permite observar as variações na sequência de diferentes operons para o gene 16S rRNA é a análise de polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição (RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*) de sequências de 16S rRNA amplificadas pela PCR. A análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) por várias endonucleases é útil para análise rápida de numerosos isolados e permite estimar relações genéticas e diferenciar espécies (LAGUERRE *et al.*, 1994).

Diante do exposto, foi realizado nesse trabalho um estudo com 20 bactérias endofíticas isoladas de milho cultivado no Cerrado goiano para: avaliar a diversidade genética, através da amplificação por PCR de genes marcadores; identificar os isolados, através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA; e avaliar a produção de pigmentos melanina-*like*. A partir dos resultados obtidos foi possível identificar preliminarmente a microbiota associada a essa planta, bem como

observar isolados com alta produção de melanina, sendo possível inferir que esses microrganismos apresentam diversidade genética e metabólica e que esses poderão ser utilizados para estudos futuros de interação planta/solo/ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO. Milho. O Cereal que enriquece a alimentação humana. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/milho/cereal>>. Acesso em: 18 mar. 2015.

ACOSTA, J. A. A. **Dinâmica do nitrogênio sob sistema plantio direto e parâmetros para o manejo da adubação nitrogenada no milho**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2009. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

ALVES, G. C. **Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em genótipos de milho**. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, Jan. 1986.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, Apr. 2012.

CABRERA-VALLADARES, N.; MARTÍNEZ, A.; PIÑERO, S.; LAGUNAS-MUÑOZ, V. H.; TINOCO, R.; ANDA, R.; VÁZQUEZ-DUHALT, R.; BOLÍVAR, F.; GOSSET, G. Expression of the *melA* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 772-779, 2006.

CALDARELLI, C. E.; BACCHI, M. R. P. **Fatores de influência no preço do milho no Brasil**. Brasília - DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 174 p.

CARLSON, T. A.; MARTIN, G. B.; CHELM, B. K. Differential Transcription of the Two Glutamine Synthetase Genes of *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 12, p. 5861-5866, Dec. 1987.

CARVALHO, T. L.; BALSEMÃO-PIRES, E.; SARAIVA, R. M.; FERREIRA, P. C.; HEMERLY, A. S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 19, p. 5631-5642, Aug. 2014.

CHABOT, R.; ANTOUN, H.; KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP, C. J. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2767-2772, Aug. 1996.

CHAUDHRY, V.; BHATIA, A.; BHARTI, S. K.; MISHRA, S. K.; CHAUHAN, P. S.; MISHRA, A.; SIDHU, O. P.; NAUTIYAL, C. S. Metabolite profiling reveals abiotic stress tolerance in Tn5 mutant of *Pseudomonas putida*. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. 1-14, Jan. 2015.

CHUEIRE, L. M. O. ; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n.5, p. 833-840, 2003.

CONCEIÇÃO, O. P.; RESENDE, A. V.; MARRIEL, I. E.; FURTINI NETO, A. E.; BATISTA, R. O.; GOTT, R. M.; HICKMANN, C. Resposta do milho à inoculação com bactérias diazotróficas em solo de alto potencial produtivo no cerrado. In: XXXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 2011, Uberlândia. **Resumo Expandido**. Uberlândia: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2011. p. 1-3.

CRUZ, L. M.; DE SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). **Applied And Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2375-2379, May 2001.

CUBO, T.; ROMERO, F.; VINARDELL, J. M.; RUIZ-SAINZ, J. E. Expression of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli melA* Gene in Other Rhizobia Does Not Require the Presence of the *nifA* Gene. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 24, n. 2, p. 195- 203, 1997.

CUBO, M. T.; BUENDIA-CLAVERIA, A. M.; BERINGER, J. E.; RUIZ-SAINZ, J. E. Melanin Production by *Rhizobium* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1812-1817, July 1988.

FACCIO, G.; KRUUS, K.; SALOHEIMO, M.; THÖNY-MEYER, L. Bacterial tyrosinases and their applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1749-1760, Dec. 2012.

FAIRHEAD, M.; THÖNY-MEYER, L. Bacterial tyrosinases: old enzymes with new relevance to biotechnology. **New Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 183-191, Jan. 2012.

FARRAR, K.; BRYANT, D.; COPE-SELBY N. Understanding and engineering beneficial plant–microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, n. 9, p. 1193-1206, Dec. 2014.

FISHER, M. M.; TRIPLETT, E. W. Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4630-4636, Oct. 1999.

FONTOURA, R. A.; FRIZZO, M. L. S.; DE SÁ, E. L. S.; OSÓRIO FILHO, B. D.; TONON, B. C.; BINZ, A.; DA SILVA, M. C.; CAMARGO, F. A. O.; SELBACH, P. A. Rizóbios nativos do Rio Grande do Sul simbioticamente eficientes em *Lotus glaber*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 3, p. 440-446, Mar. 2011.

GILSON, E.; CLÉMENT, J. M.; BRUTLAG, D.; HOFNUNG, M. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. **The EMBO Journal**, v. 3, n. 6, p. 1417-1421, 1984

GOND, S. K.; TORRES, M. S.; BERGEN, M. S.; HELSEL, Z.; WHITE, J. F. Induction of salt tolerance and up-regulation of aquaporin genes in tropical corn by rhizobacterium *Pantoea agglomerans*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 392-399, Apr. 2015.

GUTIÉRREZ-ZAMORA, M. L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Biotechnology**, v. 91, n. 2-3, p. 117-126, Oct. 2001.

HAMILTON, A. J.; GOMEZ, B. L. Melanins in fungal pathogens. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 91-96, 2003.

HOSTED, T. J.; ROCHEFORT, D. A.; BENSON, D. R. Close Linkage of Genes Encoding Glutamine Synthetases I and II in *Frankia alni* CplI. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 11, p. 3679-3684, June 1993.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 542 p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I, C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p.

IKEDA, A. C.; BASSANI, L. L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; CORDEIRO, V. K.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M. B. R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L. V.

Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 1, p. 154-160, 2013.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; AVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, May 2013.

KEITH, K. E.; KILLIP, L.; HE, P.; MORAN, G. R.; VALVANO, M. A. *Burkholderia cenocepacia* C5424 Produces a Pigment with Antioxidant Properties Using a Homogentisate Intermediate. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 24, p. 9057-9065, Dec. 2007.

KOO, S. Y.; CHO, K. S. Isolation and characterization of a plant growth-promoting rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 11, p. 1431-1438, Nov. 2009.

KOSTMAN, J. R.; EDLIND, T. D.; LIPUMA, J. J.; STULL, T. L. Molecular Epidemiology of *Pseudomonas cepacia* Determined by Polymerase Chain Reaction Ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 8, p. 2084-2087, Aug. 1992.

KURIAN, N. K.; BHAT, S. G. **Bacterial Melanins**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/264237824_Bacterial_Melanins>. Acesso em 17 maio 2016.

KWON, S.; PARK, J.; KIM, J.; KANG, J.; CHO, Y.; LIM, C.; PARKER, M. A.; LEE, G. B. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 263-270, 2005.

LAMBERT, B.; LEYNS, F.; ROOYEN, L. V.; GOSSELE, F.; PAPON, Y.; SWINGS, J. Rhizobacteria of Maize and Their Antifungal Activities. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 1866-1871, Aug. 1987.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid Identification of Rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 56-63, Jan. 1994.

LIAN, B.; SOULEIMANOV, A.; ZHOU, X.; SMITH, D. L. *In vitro* induction of lipochitooligosaccharide production in *Bradyrhizobium japonicum* cultures by root extracts from non-leguminous plants. **Microbiological Research**, v. 157, n. 3, p. 157-160, 2002.

LIGUORI, A. P.; WARRINGTON, S. D.; GINTHER, J. L.; PEARSON, T.; BOWERS, J.; GLASS, M. B.; MAYO, M.; WUTHIEKANUN, V.; ENGELTHALER, D.; PEACOCK, S. J.; CURRIE, B. J.; WAGNER, D. M.; KEIM, P.; TUANYOK, A. Diversity of 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Reveals Phylogenetic Relationships in *Burkholderia pseudomallei* and Its Near-Neighbors. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. 1-8, Dec. 2011.

LOPES, A. A. C. REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; ALVES, G. C.; MARRIEL, I. E.; REIS, V. M. Efeito da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sobre a produtividade do milho nos períodos de safra e safrinha. In: IX SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO e II SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2008, Brasília. **Anais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008.

LÓPEZ-LEAL, G.; TABCHE, M. L.; CASTILLO-RAMÍREZ, S.; MENDOZA-VARGAS, A.; RAMÍREZ-ROMERO, M. A.; DÁVILA, G. RNA-Seq analysis of the multipartite genome of *Rhizobium etli* CE3 shows different replicon contributions under heat and saline shock. **BMC Genomics**, v.15, p.770, 2014.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MARTIN-DIDONET, C. C. G.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; KLEINA, M.; REGO, F. G. M.; RIGO, L. U.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Genome structure of the genus *Azospirillum*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 14, p. 4113-4116, July 2000.

MARTINEZ, E.; ROMERO, D.; PALACIOS, R. The *Rhizobium* Genome. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 9, n. 1, p. 59-93, 1990.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. **Developments in Plant and Soil Sciences**, v. 57, p. 11-20, 1994.

MAVINGUI, P.; FLORES, M.; GUO, X.; DÁVILA, G.; PERRET, X.; BROUGHTON, W. J.; PALACIOS, R. Dynamics of Genome Architecture in *Rhizobium* sp. Strain NGR 234. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 1, p. 171-176, Jan. 2002.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 2805-2809, Dec. 2007.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634-663, Sep. 2013.

MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B.; DA CUNHA, M. H. **20 perguntas e respostas sobre fixação biológica de nitrogênio**. Planaltina - DF: Embrapa Cerrados, 2010. 19 p.

MENNA, P.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 12, p. 2934-2950, 2009.

MERCADO-BLANCO, J.; GARCIA, F.; FERNANDEZ-LOPEZ, M.; OLIVARES, J. Melanin production by *Rhizobium meliloti* GR4 is linked to nonsymbiotic plasmid pRmeGR4b: cloning, sequencing, and expression of the tyrosinase gene *mepA*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 17, p. 5403-5410, 1993.

MERCADO-BLANCO, J.; TORO, N. Plasmids in Rhizobia: The Role of Nonsymbiotic Plasmids. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 9, n. 7, p. 535-545, 1996.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA: Aplicações no melhoramento de plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 5, p.14-17, 1998.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Vegetal. Culturas. Milho. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>>. Acesso em: 04 mar. 2015.

MORALES-GARCÍA, Y. E.; JUÁREZ-HERNÁNDEZ, D.; ARAGÓN-HERNÁNDEZ, C.; MASCARUA-ESPARZA M. A.; BUSTILLOS-CRISTALES, M. R.; FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; MARTINEZ-CONTRERAS R. D.; MUNOZ-ROJAS, J. Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 43, n. 4, p. 287-293, Oct.-Dec. 2011.

MOREIRA, F. M. S. M.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1; n. 2, p. 74-99, 2010.

OGUTCU, H.; ADIGUZEL, A.; GULLUCE, M.; KARADAYI, M.; SAHIN, F. Molecular Characterization of *Rhizobium* Strains Isolated from Wild Chickpeas Collected from High Altitudes in Erzurum-Turkey. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 14, n. 2, p. 4294-4300, 2009.

OLIVEIRA, A. M. R.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M.; SILVEIRA, J. R. P.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B. Caracterização da região espaçadora 16-23S rDNA para diferenciação de estirpes de rizóbios utilizadas na produção de inoculantes comerciais no Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p. 1423-1429, ago. 2012.

OLIVEIRA, E. M. M.; DE OLIVEIRA, T. C.; SOUZA, A. M.; SANTOS, T. F.; LIMA, I. S. **Desenho de Primers Degenerados através de Bioinformática**. Brasília, DF: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2015. 4 p. (Embrapa Agroindústria de Alimentos. Comunicado Técnico 208).

PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; LONHIENNE, T. G. A.; YEOH, Y. K.; WEBB, R. I.; LAKSHMANAN, P.; CHAN, C. X.; LIM, P. E.; RAGAN, M. A.; SCHMIDT, S.; HUGENHOLTZ, P. A new species of *Burkholderia* isolated from sugarcane roots promotes plant growth. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 142-154, 2014.

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.)**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2009. Tese (Doutorado em Microbiologia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2009.

PEREIRA FILHO, I. A. **O cultivo do milho verde**. Sete Lagoas - MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 217 p.

PÉREZ-MONTAÑO F.; ALÍAS-VILLEGAS, C.; BELLOGÍN, R. A.; DEL CERRO, P.; ESPUNY, M. R.; JIMÉNEZ-GUERRERO, I.; LÓPEZ-BAENA, F. J.; OLLERO, F. J.; CUBO, T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research**, v. 169, n. 5-6, p. 325-336, May-Jun. 2014.

QURESHI, M. A.; SHAHZAD, H.; IMRAN, Z.; MUSHTAQ, M.; AKHTAR, N.; ALI, M. A.; MUJEEB, F. Potential of *Rhizobium* species to enhance growth and fodder yield of maize in the presence and absence of L-tryptophan. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 23, n. 5, p. 1448-1454, 2013.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. **Fixação Biológica de Nitrogênio - Estado da Arte**. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/biotacap6ID-cgUrYruYKy.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2015.

ROESCH, L. F. W. **Ocorrência e distribuição de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de milho**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

ROESCH, L. F. Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 924-927, jul./ago., 2005.

ROESCH, L. F. W. **Diversidade de bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho cultivadas no estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. **Archives of Microbiology**, v. 181, n. 5, p. 337-344, May 2004.

SABIDO, A.; MARTÍNEZ, L. M.; DE ANDA, R.; MARTÍNEZ, A.; BOLÍVAR, F.; GOSSET, G. A novel plasmid vector designed for chromosomal gene integration and expression: Use for developing a genetically stable *Escherichia coli* melanin production strain. **Plasmid**, v. 69, n. 1, p. 16-23, Jan. 2013.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, Dec. 1985, p. 1350-1354.

SANTANA, M.; IONESCU, M. S.; VERTES, A.; LONGIN, R.; KUNST, F.; DANCHIN, A.; GLASER, P. *Bacillus subtilis* F₀F₁ ATPase: DNA Sequence of the *atp* Operon and Characterization of *atp* Mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 22, p. 6802-6811, Nov. 1994.

SEO, S.; SHARMA, V. K.; SHARMA, N. Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2837-2853, 2003.

SOARES-RAMOS, J. R. L. Comparative molecular analysis of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 537-543, 2003.

SOLANO, F. Melanins: Skin Pigments and Much More - Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. **New Journal of Science**, v. 2014, p. 1-29, 2014.

TIAN, G.; PAULS, P.; DONG, Z.; REID, L. M.; TIAN, L. Colonization of the nitrogen-fixing bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* in a large number of Canadian corn plants. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 89, n. 6, p. 1009-1016, 2009.

TOBES, R.; PAREJA, E. Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for Insertion Sequence elements. **BMC Genomics**, v. 7, n. 62, p. 1-12, 2006.

VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A., AHMAD, W. A. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1065-1079, 2013.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

VON DER WEID, I.; DUARTE, G. F.; VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L. *Paenibacillus brasilensis* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2147-2153, Nov. 2002.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, Jan. 1991.

WISNIEWSKI-DYÉ, F.; BORZIAK, K.; KHALSA-MOYERS, G.; ALEXANDRE, G.; SUKHARNIKOV, L. O.; WUICHET, K.; HURST, G. B.; MCDONALD, W. H.; ROBERTSON, J. S.; BARBE, V.; CALTEAU, A.; ROUY, Z.; MANGENOT, S.; PRIGENT-COMBARET, C.; NORMAND, P.; BOYER, M.; SIGUIER, P.; DESSAUX, Y.; ELMERICH, C.; CONDEMINE, G.; KRISHNEN, G.; KENNEDY, I.; PATERSON, A. H.; GONZÁLEZ, V.; MAVINGUI, P.; ZHULIN, I. B. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 12, p. 1-13, Dec. 2011.

WOO, P. C.; LAU, S. K.; TENG, J. L.; TSE, H.; YUEN, K. Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 10, p. 908-934, 2008.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the Phototrophic Rhizobium Strain BTAi1 by Polymerase Chain Reaction-Based Sequencing of a 16S rRNA Gene Segment. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 7, p. 2271-2277, Apr. 1991.

ZAHID, M.; ABBASI, M. K.; HAMEED, S.; RAHIM, N. Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir

and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays* L.). **Frontiers Microbiology**, v. 6, p. 1-10, Mar. 2015.

ZAIDI, K. U.; ALI, A. S.; ALI, S. A.; NAAZ, I. Microbial Tyrosinases: Promising Enzymes for Pharmaceutical, Food Bioprocessing, and Environmental Industry. **Biochemistry Research International**, p. 1-16, 2014.

ZHAO, K.; PENTTINEN, P.; ZHANG, X.; AO, X.; LIU, M.; YU, X.; CHEN, Q. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 76-82, Jan 2014.

ZUGHAIER, S. M.; RYLEY, H. C.; JACKSON, S. K. A Melanin Pigment Purified from an Epidemic Strain of *Burkholderia cepacia* Attenuates Monocyte Respiratory Burst Activity by Scavenging Superoxide Anion. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 2, p. 908-913, Feb. 1999.

**CAPÍTULO 1 - ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA
DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE MILHO (*Zea
mays* L.)**

4.1 INTRODUÇÃO

O milho é uma das culturas mais importantes do mundo. Seu cultivo exige grande utilização de fertilizantes nitrogenados, portanto, estratégias destinadas a otimizar a produção de grãos e diminuir custos com fertilizantes são muito relevantes. Bactérias endofíticas têm um elevado potencial para aumentar a produtividade de grãos de milho por meio da fixação biológica de nitrogênio e/ou promoção de crescimento, nesse último caso, aumentando a absorção de água e nutrientes pelas plantas (IKEDA *et al.*, 2013). Assim, a caracterização de bactérias associadas com a cultura do milho fornece informações valiosas para o conhecimento da interação planta-bactéria, além da possibilidade de reconhecer as estratégias que podem beneficiar a produção do milho (IKEDA *et al.*, 2013).

A contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) pelas bactérias associativas não é tão significativa à nutrição vegetal quanto às simbioses rizóbio-leguminosas, mas mesmo baixa, ela representa uma grande economia nos custos de produção (MOREIRA *et al.*, 2010). No entanto, os sistemas agrícolas atuais são na maioria dependentes de insumos industrializados, como adubos nitrogenados, e não exploram o grande potencial das bactérias, tanto para a FBN quanto para outros mecanismos de promoção do crescimento vegetal. Estudos que promovam esse conhecimento devem ser estimulados visando não só uma agricultura de baixo custo e de baixo impacto ambiental, mas também o potencial biotecnológico que essas bactérias apresentam (MOREIRA *et al.*, 2010).

Em contraste com o conhecimento molecular extenso da simbiose rizóbio-leguminosas, existem dados limitados sobre as interações endofíticas e/ou associativas em gramíneas e outras plantas não leguminosas. As abordagens genômicas comparativas e o sequenciamento de genes contribuem para decifrar mecanismos moleculares envolvidos nessas associações como sinais nas plantas e bactérias, receptores envolvidos, mediadores celulares e genes alvo. Os recentes avanços na compreensão de interações endofíticas trazem alternativas para fixação de nitrogênio em plantas não leguminosas (SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013).

A expansão do mercado de bioinoculantes leva a conclusão que as bactérias poderão ser comercializadas isoladamente ou em misturas, para promoção de crescimento de várias espécies de plantas; para obtenção de suprimento adicional de nitrogênio e ainda para indução de resistência sistêmica contra múltiplos patógenos (MARIANO *et al.*, 2004).

Assim o estudo genético de bactérias associadas a raízes de plantas de milho cultivadas no Cerrado, fornecem informações sobre a microbiota e indicam um possível uso dos isolados estudados na formulação de inoculantes ou ainda de bioprodutos para serem utilizados no cultivo de milho em Goiás.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Material Vegetal e Isolamento dos Microrganismos

As plantas de milho foram obtidas de campos experimentais de sistema orgânico de produção mantido pela Embrapa Arroz e Feijão em Santo Antônio de Goiás, GO. As coletas foram feitas em junho de 2009, com plantas de milho da variedade Sol da Manhã na fase vegetativa, com cerca de 35 dias após a germinação. Para o preparo do extrato as raízes de milho foram retiradas das plantas, lavadas em água estéril e submetidas à esterilização superficial através da imersão por 3 minutos em solução de hipoclorito de sódio (2,5%) (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995) seguido de 10 lavagens em água estéril. Depois as raízes esterilizadas foram maceradas em gral, na proporção 1g de raiz para 10 mL de água estéril e este consistiu o extrato que foi utilizado para as contagens em placas e para os isolamentos das bactérias.

4.2.2 Isolamento dos Microrganismos e Coleção de Culturas

O extrato foi submetido à inoculação em placas contendo meio sólido YMA (*Yeast-Manitol-Agar*) estéril (VINCENT, 1970), seletivo para rizóbios (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Para o preparo desse meio foram utilizados 10 g de manitol, 1 mL de fosfato de potássio dibásico 10%; 4 mL de fosfato de potássio monobásico 10%; 2 mL de sulfato de magnésio 10%; 1 mL de cloreto de sódio 10%; 0,4 g de extrato de levedura; 5 mL de azul de bromotimol 0,5% em 0,2N de hidróxido de potássio; 15 g de ágar e água destilada q.s.p. 1.000 mL. O pH foi ajustado para 6,8.

As placas foram incubadas em estufa de crescimento entre 48-72 horas a 30 °C. Após o crescimento, as colônias foram coletadas e semeadas por esgotamento e

seleção de colônias, como etapas de isolamento. Essas foram armazenadas a -4 °C em glicerol 30% estéril, para serem utilizadas nos experimentos posteriores. Os isolados fazem parte da Coleção de Culturas de Bactérias isoladas de plantas de milho do laboratório de Bioquímica de Microrganismos do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas - Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás.

4.2.3 Material Biológico

Para a caracterização genética, foram utilizados 20 isolados da Coleção de Culturas de Bactérias isoladas de plantas de milho (*Zea mays* L.) do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas - Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás (UEG). Para fins de controle e comparação, também foram utilizados rizóbios como bactérias de referência (Tabela 1).

Tabela 1: Espécies e estirpes de bactérias utilizadas como referência no estudo.

Espécie	Estirpe
<i>Bradyrhizobium elkanei</i>	BR2003 (SEMIA6156)
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	IG (SEMIA6157)
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	BR522
<i>Rhizobium etli</i>	BR10026 (CFN42)
<i>Rhizobium galegae</i>	BR10055
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	BR7606 (SEMIA3012)
<i>Rhizobium meliloti</i>	RM2011
<i>Rhizobium</i> sp.	BR2001 (SEMIA6145)
<i>Rhizobium tropici</i>	BR322 (SEMIA4077)
<i>Rhizobium tropici</i>	BR520 (SEMIA4080)

4.2.4 Armazenamento e Manutenção das Bactérias

Inicialmente as bactérias foram submetidas à cultura em placa de Petri com meio sólido YMA estéril (VINCENT, 1970) e mantidas à temperatura de 30°C para crescimento e análise de pureza. Para o preparo desse meio foram utilizados 10 g de manitol, 1 mL de fosfato de potássio dibásico 10%; 4 mL de fosfato de potássio monobásico 10%; 2 mL de sulfato de magnésio 10%; 1 mL de cloreto de sódio 10%; 0,4 g de extrato de levedura; 5 mL de azul de bromotimol 0,5% em 0,2N de hidróxido de potássio; 15 g de ágar e água destilada q.s.p. 1000 mL. O pH foi ajustado para 6,8 e o meio esterilizado por autoclavação.

Em seguida, as bactérias foram inoculadas em frascos com meio YM líquido e cultivadas sob agitação (140 rpm) a 28°C por 24 a 48 horas. O crescimento foi monitorado por determinação da absorbância a 600 nm (DO_{600}) em espectrofotômetro Biospectro SP-220. As culturas com DO_{600} entre 0,6 a 1 nm foram transferidas para micro-tubos, submetidas à centrifugação (13.000 rpm) por 2 minutos. O sedimento das células foi lavado em solução salina estéril 0,9% (NaCl, 0,9 g; água destilada q.s.p. 100 mL). Após adição de solução de glicerol estéril 30% (glicerol, 30 mL; água q.s.p. 100 mL) as células foram armazenadas à temperatura de -4°C. Esses materiais foram estocados em duplicata para a realização dos estudos.

4.2.5 Extração do DNA Total

O DNA dos 20 isolados e das bactérias de referência foi extraído como descrito por Ausebel, Brent e Kingston (1999), com modificações. As bactérias foram inoculadas em 10 mL de meio líquido YM e mantidas sob agitação de 120 rpm durante 24 a 48 horas à temperatura ambiente. Todo o volume da cultura foi centrifugado em alíquotas de 1,5 mL em tubos de microcentrífuga a 13.000 rpm durante dois minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células lavado com solução salina estéril 0,9%. O sobrenadante foi descartado e as células

suspensas em 600 μL de solução de lise de DNA estéril (50 μM Tris pH 7,6; 20 mM de EDTA; 400 mM de NaCl; 1% SDS), homogeneizadas suavemente, incubadas por 10 minutos a 80°C e transferidas para o banho de gelo por 5 minutos. Após essa etapa foi adicionado 3 μL de solução RNase (24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) às amostras, que foram incubadas a 37°C por 15 minutos e transferidas para o banho de gelo por 5 minutos. Foi adicionado 200 μL de NaCl 0,5 M estéril (1,46 g de NaCl; 50 mL de água destilada) à mistura, homogeneizada por inversão e acondicionada em banho de gelo por 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 5 °C 13.000 rpm durante 15 minutos, o sobrenadante transferido para um novo tubo já contendo 600 μL de isopropanol (P.A.) a temperatura ambiente e levado ao banho de gelo por 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 5 °C 13.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante descartado imediatamente. O volume residual do tubo foi suspenso em 600 μL de etanol 70%, centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos e o etanol descartado. O precipitado foi seco à temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas, em seguida, suspenso em 30 μL de água ultrapura estéril e estocado a -20 °C para ser utilizado em análises posteriores.

Nos isolados em que não foi possível o isolamento do DNA como descrito por Ausebel, Brent e Kingston (1999), foi utilizado outro método para extração do DNA bacteriano, o de lise alcalina das células, adaptado por Audy *et al.* (1996). As bactérias foram inoculadas em meio líquido YM e mantidas sob agitação de 120 rpm durante 24 a 48 horas à temperatura ambiente. Todo o volume da cultura foi centrifugado em alíquotas de 1,5 mL em tubos de microcentrífuga a 13.000 rpm durante dois minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células lavado com solução salina estéril 0,9%. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 0,5 mL de solução estéril de NaOH 0,5M (2 g de NaOH; água destilada q.s.p. 100 mL), ficando em repouso por 10 minutos, para a lise completa das células. Em seguida, 10 μL do material lisado foi coletado e diluído em 490 μL de solução estéril de Tris-HCl 20 mM pH 8.

4.2.6 Análise por Eletroforese em Gel de Agarose

A partir do método de eletroforese em gel de agarose foram realizadas as análises do DNA obtido nas extrações e dos fragmentos gerados por PCR. A determinação do perfil eletroforético do material genético foi realizada em gel de agarose, tampão TBE 0,5 X (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e tampão de corrida FSUDS (azul de bromofenol 0,25%, SDS 0,1%, Ficoll[®] 20% em T₁₀E₁) sendo adicionado às amostras de DNA na proporção de 1:1 (FSUDS:DNA). A concentração do gel de agarose variou de acordo com a amostra: 0,7 % para DNA total; 1,3 % para os genes *atpD*, *glnII*, 16S rRNA; 1,7 % para as regiões espaçadora intergênica 16S-23S rRNA e REP; 2,0 % para ARDRA. A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 0,5 X a 70 V. O tempo da corrida variou de acordo com a concentração do gel de agarose, entre 60 e 120 minutos.

Foi utilizado brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹) para corar o gel de agarose, por 10 a 15 minutos, que foi lavado em água destilada (15 minutos). As bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador UV acoplado a um sistema de fotodocumentação MultiDoc-it[®] (UVP). Os marcadores de tamanho molecular utilizados foram 100 pb e 1kb DNA Ladder[®] (BIOLABS).

4.2.7 Caracterização Genética dos Fragmentos Gerados por PCR

O DNA extraído das 20 bactérias isoladas do milho e de referência foi amplificado por PCR em termociclador Aeris (Esco) utilizando oligonucleotídeos para as regiões espaçadora intergênica 16S-23S rRNA, REP, *atpD*, *glnII* e 16S rRNA. Nas tabelas 2 e 3 estão descritos os oligonucleotídeos, as condições de amplificação e as concentrações dos reagentes utilizados. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese, corados e fotografados, conforme descrito no item anterior.

Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos e condições de amplificação utilizadas para as diferentes regiões.

Região	Oligonucleotídeos	Sequência (5'→ 3')	Tm	Referência	Condições de Amplificação
<i>atpD</i>	<i>atpD255F</i>	GCTSGGCCGCATCMTSAACGTC	67,4 °C	VINUESA <i>et al.</i> , 2005	2 min 95 °C, 35x (45 s 95 °C, 30 s 58 °C, 1 min 30 s 72°C), 7 min 72 °C
	<i>atpD782R</i>	GCCGACACTTCMGAACCNGCCTG	77,6 °C		
<i>glnII</i>	<i>glnII12F</i>	YAAGCTCGAGTACATYTTGGCT	55,0 °C	VINUESA <i>et al.</i> , 2005	4 min 95 °C, 30x (1 min 94 °C, 1 min 58 °C, 2 min 72°C), 7 min 72 °C
	<i>glnII689R</i>	TGCATGCCSGAGCCGTTCCA	77,1 °C		
Intergênica 16S-23S rRNA	pHR F	TGCGGCTGGATCACCTCCTT	61,3 °C	MASSOL-DEYA <i>et al.</i> , 1995	3 min 95 °C; 28x (45 s 94 °C, 45 s 62 °C, 1 min 30 s 72 °C); 5 min 72 °C
	p23 R	CCGGGTTTCCCCATTCGG	71,7 °C		
REP	REP1R-I F	IIICGICGICATCIGGC	32,2 °C	VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991	7 min 95 °C; 30x (1 min 94 °C, 1 min 40 °C, 8 min 65 °C), 15 min 65 °C
	REP2-I R	ICGICTTATCIGGCCTAC	41,9 °C		
16S rRNA	Y1 F	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	81,6 °C	YOUNG <i>et al.</i> , 1991;	3 min 95 °C, 28x (45 s 94 °C, 45 s 62 °C, 1 min 30 s 72 °C), 5 min 72 °C
	Y3 R	TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC	60,4 °C	CRUZ <i>et al.</i> , 2001	

Letras que indicam posições degeneradas: S representa citosina ou guanina; M representa adenina ou citosina; I representa adenina, timina ou citosina.; Y representa citosina ou timina. F: *forward*; R: *reverse*.

Tabela 3: Concentração dos reagentes utilizados para o preparo das reações de amplificação (PCR) para cada região gênica.

Reagentes	<i>atpD</i>	<i>glnII</i>	Intergênica 16S-23S rRNA	REP	16S rRNA
MgCl ₂	1,875 mM	3,75 mM	1,5 mM	2 mM	1,5 mM
dATP, dCTP, dTTP, dGTP (cada)	0,075 mM	0,1 mM	0,0625 mM	0,1 mM	0,0625 mM
Oligonucleotídeo (cada)	0,2 µM	0,2 µM	0,25 pmol	0,25 µM	0,25 pmol
<i>Taq</i> DNA polimerase por µL	0,05 U	0,075 U	0,05U	0,075 U	0,05U

4.2.8 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

Os fragmentos amplificados por PCR da região 16S foram avaliados pela técnica de ARDRA que consiste na utilização de enzimas de restrição com padrões de corte diferentes para observar diferentes sequências do gene 16S. Os dados obtidos foram utilizados para análises de similaridade. Assim, cada produto da PCR foi submetido ao corte com a enzima de restrição *HaeIII*. Para realizar a restrição foi utilizada 0,01 U da enzima *HaeIII*. A mistura foi aquecida em banho-maria a 37 °C por uma hora. Após a digestão, os fragmentos foram analisados por eletroforese, corados e fotografados conforme descrito anteriormente.

4.2.9 Análise dos Fragmentos Obtidos por Amplificação e Restrição

O uso do *software* VisionWorksLS (versão 6.3.3, 2007) do fotodocumentador digital permitiu a análise dos fragmentos da amplificação, estimando seus valores em pares de bases, comparados ao padrão 100 pb e 1kb DNA Ladder[®]. Esses valores foram dispostos em tabela para avaliação da presença e disposição dos fragmentos.

Foi construída uma matriz binária com os dados obtidos da análise dos fragmentos da PCR das regiões espaçadora intergênica 16S-23S rRNA, REP, *atpD*, *glnII* e dos fragmentos obtidos por ARDRA. Para cada posição de migração dos fragmentos obtidos foram atribuídos os valores 1 ou 0, indicando presença ou ausência de fragmento respectivamente. As bactérias foram agrupadas pelo método das médias das distâncias por UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Os valores gerados para cada bactéria foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo coeficiente de Jaccard (ROHLF, 1992), onde $J = a / (n - d)$, sendo “a” o número de combinações com a presença dos fragmentos, menos as combinações de ausência dos fragmentos, “d” é o número de combinações de

ausência de fragmentos e “n” é o número de combinações possíveis. Para essas análises foi utilizado o software NTSYSpc[®] (versão 2.02i ,1986-1998 Applied Biostatistics) que gerou um dendrograma de similaridade entre as bactérias analisadas, permitindo avaliar a diversidade.

4.2.10 Purificação do Fragmento Amplificado do Gene 16S rRNA

O produto da PCR do gene 16S rRNA foi transferido para um tubo de 500 µL, que continha o mesmo volume de polietilenoglicol (PEG 6000-8000, 20%; NaCl 2,5 M). Feita a homogeneização com micropipeta, a mistura foi incubada de 15 a 30 minutos a 37 °C. A mistura foi centrifugada a temperatura ambiente por 15 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado com micropipeta. Foi adicionado 125 µL de etanol 80% gelado pelas paredes do microtubo. Após um minuto de repouso a temperatura ambiente a mistura foi centrifugada por 2 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado com micropipeta. A lavagem do DNA com etanol foi realizada duas vezes. O tubo foi deixado à temperatura ambiente, ou estufa a 37 °C, para secagem do etanol. O produto da PCR purificado foi dissolvido em 15 µL de solução tampão T₁₀E₁ (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8) e deixado a temperatura ambiente por duas horas ou aquecido a 37 °C por 15 minutos.

4.2.11 Sequenciamento do Gene 16S rRNA

Para o sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos foi utilizado o oligonucleotídeos Y3, que amplificou um fragmento com tamanho em torno de 700 pb. Foi utilizado o método de terminação de cadeia, com a incorporação de dideoxinucleotídeos terminadores de cadeia marcados com fluoróforos, em sequenciador automático de DNA (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

A amostra purificada do produto da PCR do gene 16S rRNA foi submetida à amplificação com o *kit Big Dye Terminator*. Cada reação de sequenciamento foi ajustada para um volume final de 10 µL, com a utilização de 3,0 µL de tampão *Save Money* (200 mM Tris-HCl, pH 9,0; 5 mM de MgCl₂), 1,0 µL de *Big Dye Terminator*, 0,5 pmol de oligonucleotídeos (Y1, Y3), 3,0 µL do produto da PCR purificado e água ultrapura estéril para um volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram 1 min 96 °C, 30 ciclos (15 s 96 °C, 15 s 50 °C, 15 s 60 °C), 4 min 60 °C em termociclador Aeris (Esco).

As amostras foram purificadas após a amplificação. Cada amostra foi transferida para tubo de 500 µL ao qual foi adicionado 10 µL de água ultrapura estéril, 2 µL de acetato de amônio 7,5 M e 60 µL de isopropanol PA. A mistura foi homogeneizada por inversão e levada ao banho de gelo por 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante descartado imediatamente. Foi colocado 500 µL de etanol 70%, a mistura centrifugada a 13.000 rpm por 25 minutos e o etanol foi descartado. O precipitado foi seco no escuro, suspenso em 4 µL de formamida (grau biologia molecular) e a mistura colocada no aparelho de sequenciamento.

4.2.12 Edição das Sequências e Comparação em Banco de Dados

A edição das sequências obtidas foi realizada utilizando o *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.2.5 (HALL, 2005). As sequências foram submetidas ao banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) na opção BLAST, Nucleotide BLAST, que permite detectar similaridade de uma sequência biológica com sequências caracterizadas já existentes. As sequências também foram submetidas ao *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versão 7 (KUMAR *et al.*, 2001) para construção de um dendrograma de similaridade.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

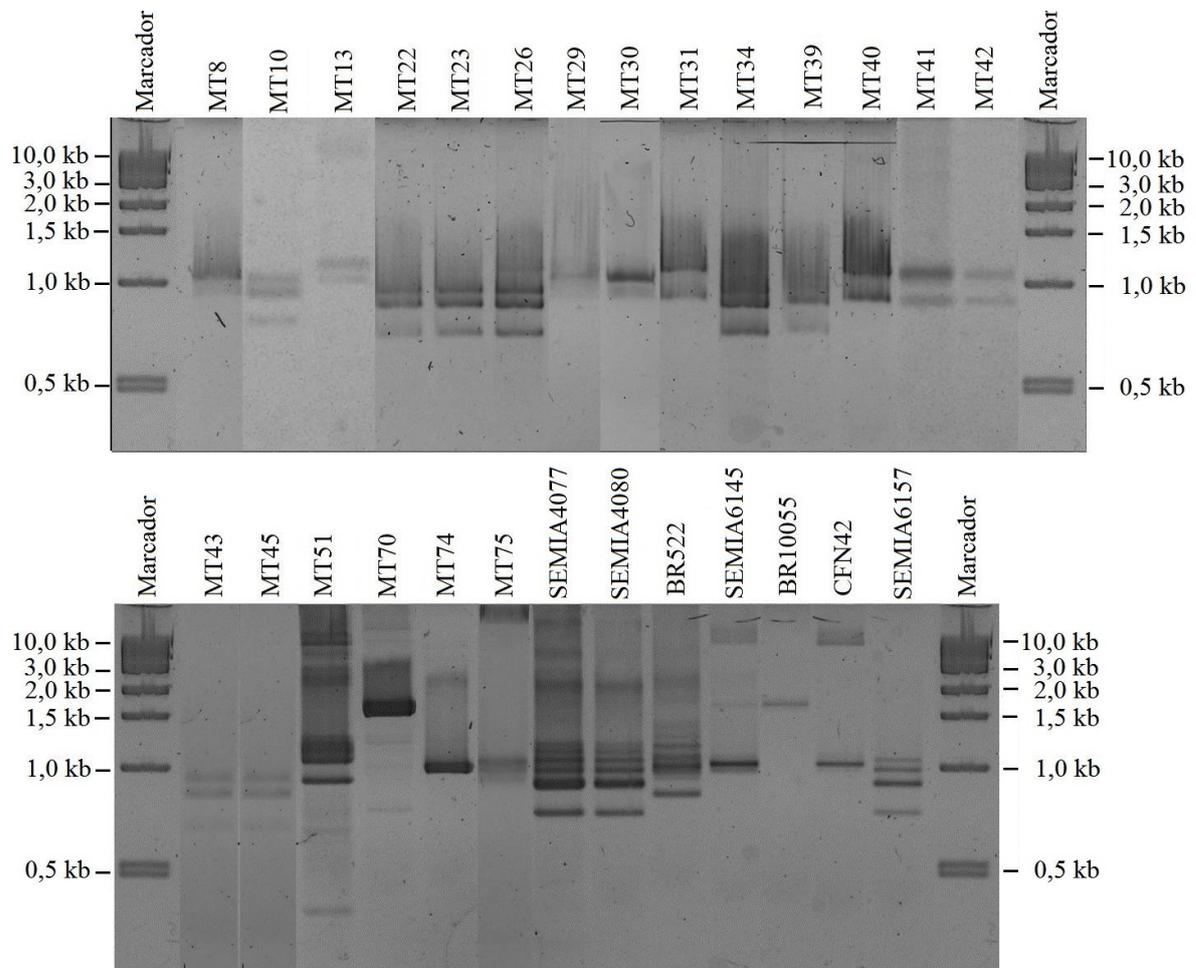
4.3.1 Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região Espaçadora Intergênica 16S-23S rRNA

Pela análise do perfil de bandas dos fragmentos amplificados com oligonucleotídeos para região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA foi possível identificar 14 perfis diferentes (Tabela 4) com a presença de uma a cinco bandas (Figura 2) de tamanhos entre 361 e 2.246 pb (Tabela 8 - Anexos).

23 bactérias apresentaram fragmentos de tamanho entre 900-999 pb (MT8; MT10; MT13; MT22; MT23; MT26; MT29; MT30; MT31; MT39; MT40; MT41; MT42; MT43; MT45; MT51; MT70; MT74; MT75; SEMIA4077; SEMIA4080; BR522; SEMIA6157). A bactéria SEMIA4080 apresentou o maior fragmento de tamanho de 2.246 pb e o isolado MT51 apresentou o menor fragmento de 361 pb (Tabela 8 - Anexos).

Pela análise de similaridade com os dados do perfil de bandas dessa região foi gerado o dendrograma no qual houve a formação de dez grupos de bactérias considerando uma porcentagem de 65% (Figura 14 - Anexos).

Figura 2: Perfil eletroforético de amplificação por PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA de 20 bactérias isoladas de milho e sete de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080). Gel de agarose 1,7%. Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS).



Estudos envolvendo amplificação por PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA de rizóbios, usando os oligonucleotídeos pHR e p23, obtiveram fragmentos de DNA com tamanhos compreendidos entre 535 e 1.630 pb (FERNANDES, M. F. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, 2003) e 400 e 1.400 pb (THÓRSSON; SVERRISSON; ANAMTHAWAT-JÓNSSON, 2000), demonstrando a heterogeneidade do número de pares de bases do espaço intergênico. Além da grande heterogeneidade no tamanho dos fragmentos da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA de rizóbios, Kwon e colaboradores (2005) também observaram que a maioria das estirpes possuía sequências diferentes entre si com

alta variação, sugerindo que essa região pode ser útil como um marcador para análise filogenética.

Em contraste aos genes do rRNA que são bastante conservados entre a maioria das espécies de procariotos, para a região espaçadora intergênica espera-se que existam cópias geralmente diferenciadas quanto ao tamanho e composição. Quando os produtos de amplificação apresentam apenas um fragmento, existe a possibilidade de que no genoma desse microrganismo exista apenas uma sequência-alvo ou que o tamanho das múltiplas cópias seja conservado (DOLZANI *et al.*, 1995).

Pela caracterização molecular da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA, os produtos de amplificação das bactérias isoladas de milho e de referência apresentaram-se de maneira diversa demonstrando a heterogeneidade do comprimento do espaço intergênico, fato também observado em estudos dessa região por outros pesquisadores.

Estudos da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA mostram que é possível diferenciar espécies e até mesmo algumas estirpes estreitamente relacionadas (THÓRSSON; SVERRISSON; ANAMTHAWAT-JÓNSSON, 2000; FERNANDES, M. F. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, 2003).

Os resultados apresentados nesse estudo mostraram que sequências da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA estão presentes no genoma de todas as bactérias estudadas e que elas possuem de um a cinco operons para esses genes. A análise parcial utilizando apenas o marcador da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA, mostrou que as bactérias de referência da mesma espécie, mas de estirpes diferentes (*Rhizobium tropici* - SEMIA4077; *R. tropici* - SEMIA4080), apresentaram perfil de bandas idêntico entre si e não foi possível diferenciar essas estirpes pela análise dessa região. Os outros rizóbios que são de espécies diferentes apresentaram perfil diferente entre si. As bactérias isoladas do milho não tiveram perfil igual ao de nenhum controle.

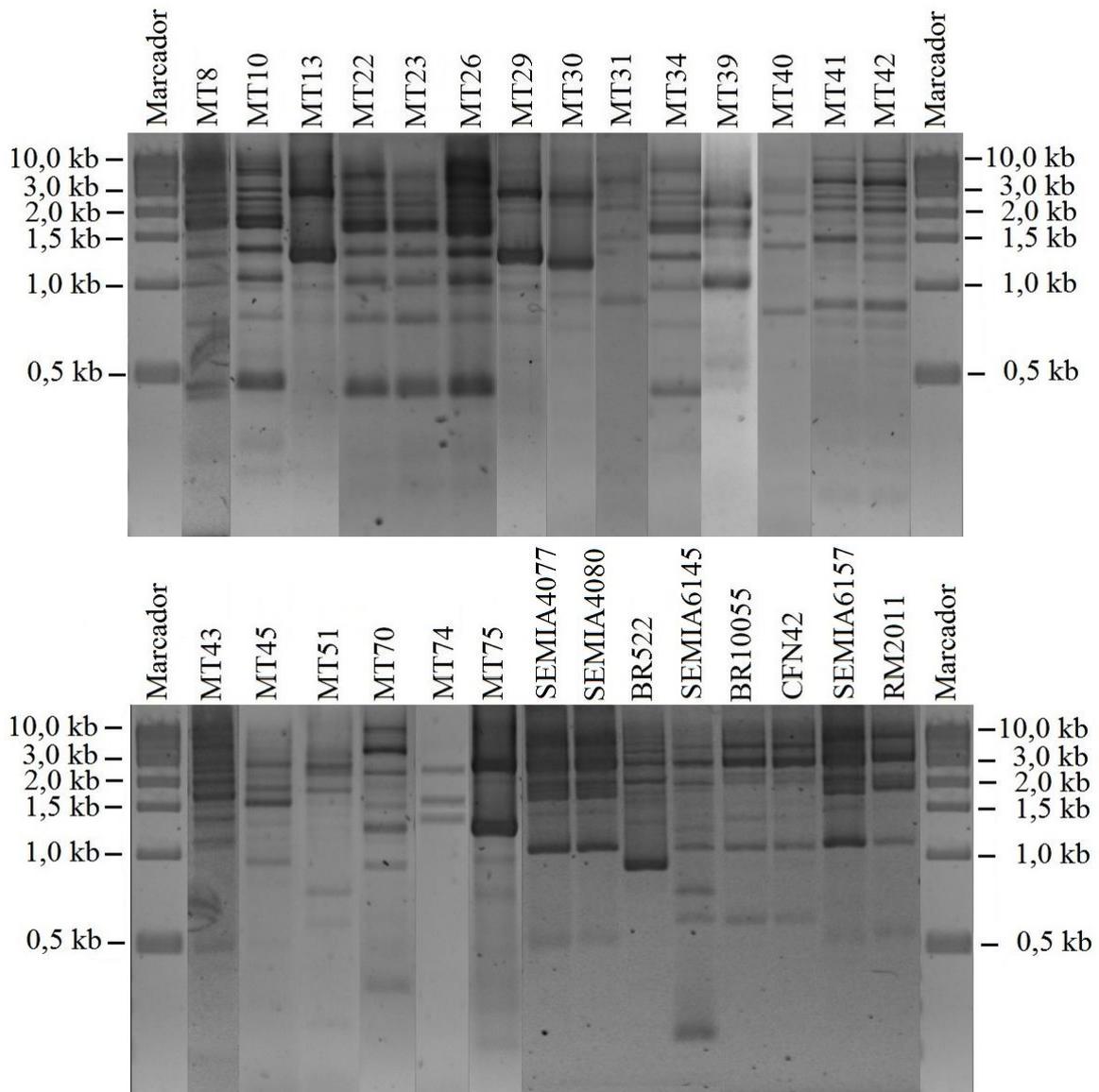
4.3.2 Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região REP

Pela caracterização molecular por PCR de DNA repetitivo disperso com oligonucleotídeos correspondentes a sequências REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) foram detectados 24 perfis diferentes (Tabela 4) de duas a nove bandas (Figura 3) de tamanhos entre 248 e 5.432 pb (Tabela 9 - Anexos).

23 bactérias apresentaram fragmentos de tamanho entre 1.000-1.299 pb (MT8; MT10; MT13; MT22; MT23; MT26; MT29; MT30; MT34; MT39; MT42; MT43; MT45; MT51; MT70; MT75; SEMIA4077; SEMIA4080; SEMIA6145; BR100055; CFN42; SEMIA6157; RM 2011). A bactéria CFN42 apresentou o maior fragmento de tamanho de 5.432 pb e SEMIA6145 apresentou o menor fragmento de 248 pb (Tabela 9 - Anexos).

Através da análise de similaridade com os dados do perfil de bandas dessa região foi gerado um dendrograma no qual houve a formação de dez grupos de bactérias considerando uma porcentagem de 65% (Figura 15 - Anexos).

Figura 3: Perfil eletroforético de amplificação por PCR da região REP de 20 bactérias isoladas de milho e oito de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080). Gel de agarose 1,7%. Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS).



Versalovic, Koeuth e Lupski (1991) realizaram amplificação com oligonucleotídeos REP1R-I e REP2-I para sequências REP com diversas espécies e estirpes de bactérias e obtiveram *fingerprints* genômicos específicos para espécies e estirpes.

De Bruijn (1992) realizou amplificação com oligonucleotídeos REP1R-I e REP2-I para *Escherichia coli* e bactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Pseudomonas*. Os padrões nos géis de agarose resultantes dos produtos da PCR foram altamente específicos para cada espécie e estirpe. O tamanho dos produtos de amplificação variou de 300 a 5.000 pb. Seus resultados mostraram que o método REP-PCR pode ser utilizado como uma ferramenta poderosa para análise genética molecular de bactérias e taxonomia bacteriana, pois fornece *fingerprint* de gênero individual, espécies e estirpes e pode ajudar a determinar relações filogenéticas.

Ogutcu e colaboradores (2009) realizaram amplificação com os oligonucleotídeos REP1R-I e REP2-I em estirpes de *Rhizobium leguminosarum* subsp. *ciceri* para determinar diferenças genotípicas. Os *fingerprints* genômicos mostraram que cada estirpe bacteriana apresentou um padrão de bandas único, com 4 a 9 fragmentos com tamanhos variados entre 300 e 4.500 pb. Os resultados mostraram uma alta diversidade intra-espécie e que o método é uma boa escolha para a caracterização genotípica e análise filogenética.

Os resultados apresentados nesse estudo mostraram que sequências REP estão presentes no genoma de todas as bactérias estudadas. Os produtos de amplificação obtidos nesse estudo foram de 248 a 5.432 pb, tamanhos aproximados aos obtidos nas pesquisas citadas acima. A análise parcial utilizando apenas o marcador REP-PCR mostrou que houve uma alta diversidade genética entre as bactérias isoladas do milho e de referência, pois quase todas as bactérias apresentaram perfis únicos de DNA (Figura 4; Tabela 9 - Anexos). A análise dessa região permitiu diferenciar bem a maioria das bactérias isoladas do milho entre si, pois apresentaram perfis diferentes e somente MT10, MT22 e MT34 tiveram perfis idênticos. As bactérias de referência da mesma espécie, mas de estirpes diferentes (*R. tropici* - SEMIA4077; *R. tropici* - SEMIA4080), apresentaram perfis de bandas idênticos entre si e não foi possível diferenciar essas estirpes pela análise dessa região. *Bradyrhizobium* sp SEMIA6157 e *R. meliloti* RM2011 são de espécies diferentes mas apresentaram padrão de bandas idênticos entre si, e não foi possível diferenciar essas espécies pela análise dessa região.

4.3.3 Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região *atpD*

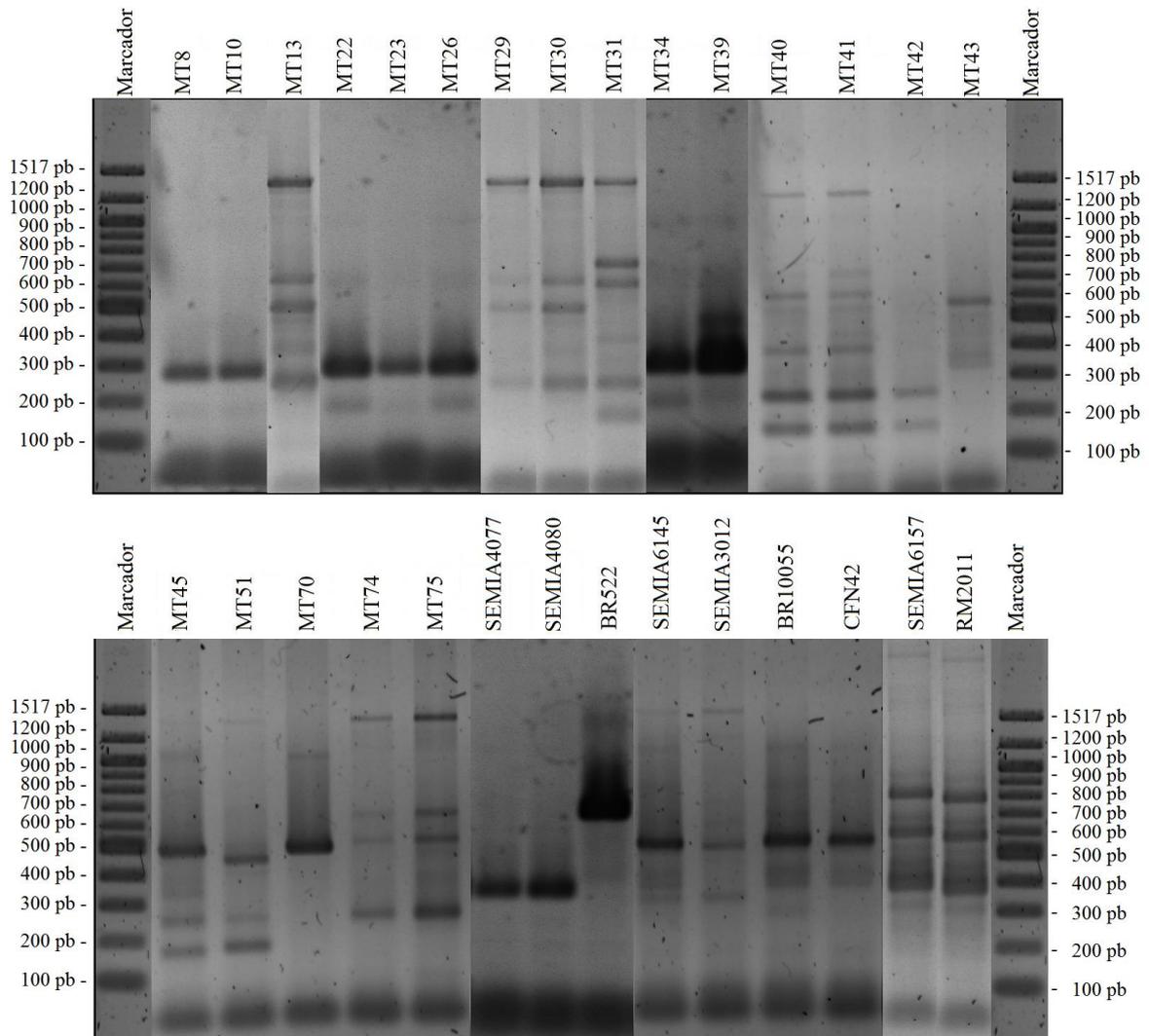
Pela análise do perfil de bandas dos fragmentos amplificados com oligonucleotídeos para região *atpD* foi possível identificar 15 perfis (Tabela 4) com uma a sete bandas (Figura 4) de tamanhos entre 149 e 1.604 pb (Tabela 10 - Anexos).

17 bactérias apresentaram fragmentos de tamanho entre 500-599 pb (MT13; MT29; MT30; MT39; MT40; MT41; MT43; MT45; MT70; MT74; MT75; SEMIA6145; SEMIA3012; BR10055; CFN42; SEMIA6157; RM2011). A bactéria de referência SEMIA3012 apresentou o maior fragmento com tamanho de 1.604 pb e MT40 apresentou o menor fragmento de 149 pb (Tabela 10 - Anexos).

Pela análise de similaridade com os dados do perfil de bandas dessa região foi gerado o dendrograma no qual houve a formação de 12 grupos de bactérias considerando uma porcentagem de 65% (Figura 16 - Anexos).

Utilizando os oligonucleotídeos *atpD255F* e *atpD782R*, Vinuesa e colaboradores (2005) e Zhang e colaboradores (2008), amplificaram um fragmento de 550 pb em rizóbios. Pelos resultados obtidos, das 20 bactérias testadas 17 apresentaram fragmentos de tamanho entre 500-599 pb na amplificação com os oligonucleotídeos *atpD255F* e *atpD782R*, tamanho que corresponde ao descrito na literatura. Não foram encontrados estudos com perfil eletroforético da amplificação do gene *atpD*, o que impossibilitou comparação com os resultados obtidos. Esses resultados indicam que os oligonucleotídeos utilizados podem não ser muito adequados para serem utilizados em bactérias que não sejam da ordem Rhizobiales, apesar de ter sido identificado heterogeneidade de amplificação e a determinação de 16 grupos de perfis para essa região gênica, o que auxiliou na observação da variação genética dos isolados.

Figura 4: Perfil eletroforético de amplificação por PCR da região *atpD* de 20 bactérias isoladas de milho e nove de referência - *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. leguminosarum* (SEMIA3012); *R. meliloti* (RM2011); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080). Gel de agarose 1,3%. Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS).



4.3.4 Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região *glnII*

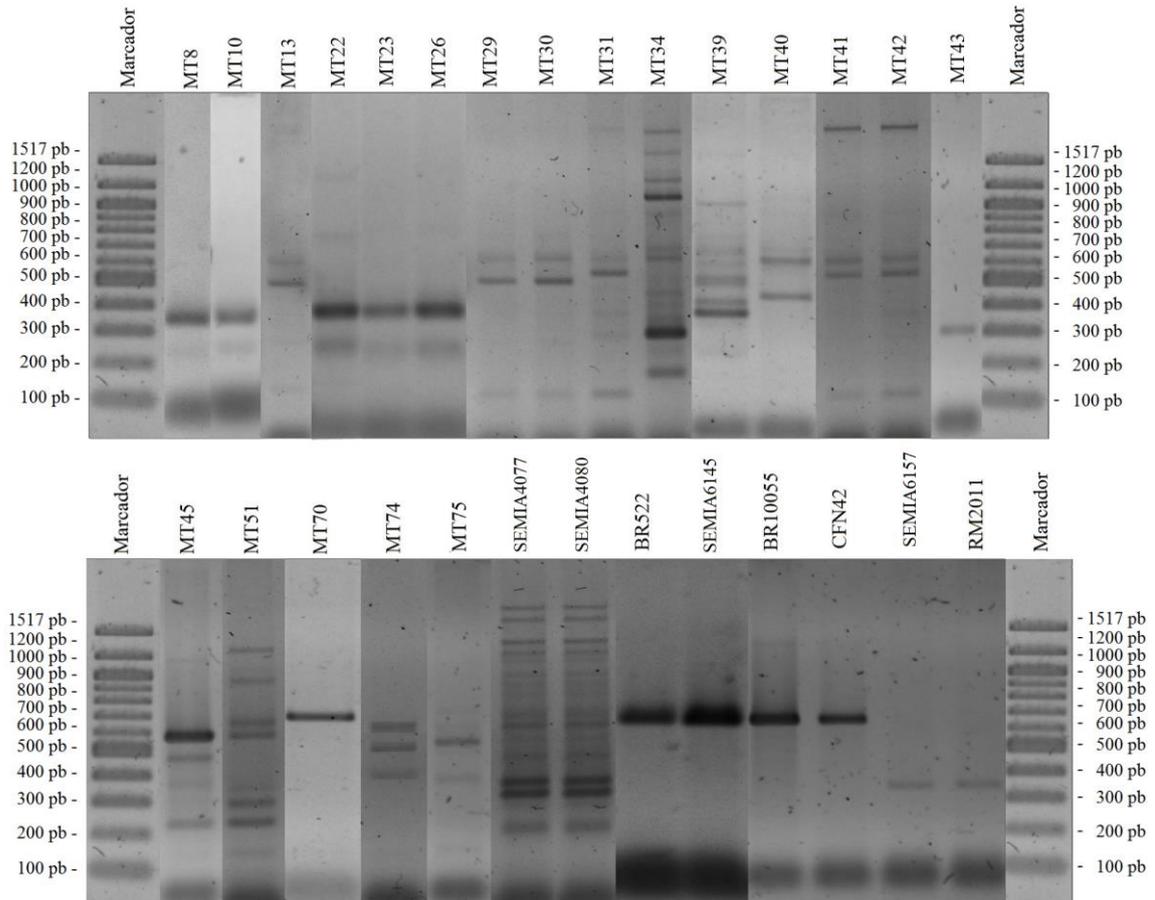
Pela análise do perfil de bandas dos fragmentos amplificados com oligonucleotídeos para região *glnII* foi possível identificar 15 perfis diferentes (Tabela 4) de uma a oito bandas (Figura 5) de tamanhos entre 112 e 2.042 pb (Tabela 11 - Anexos).

20 bactérias apresentaram fragmentos de tamanho entre 600-699 pb (MT13; MT22; MT29; MT30; MT31; MT34; MT39; MT40; MT41; MT42; MT45; MT51; MT70; MT74; SEMIA4077; SEMIA4080; BR522; SEMIA6145; BR10055; CFN42). A bactéria SEMIA4077 apresentou o maior fragmento de tamanho de 2.042 pb e MT29 apresentou o menor fragmento de 112 pb (Tabela 11 - Anexos).

Pela análise de similaridade com os dados do perfil de bandas dessa região foi gerado o dendrograma no qual houve a formação de 12 grupos de bactérias considerando uma porcentagem de 59% (Figura 17 - Anexos).

Shamseldin e colaboradores (2008) amplificaram um fragmento de cerca de 650 pb com os oligonucleotídeos *glnII*12F e *glnII*689R para rizóbios. Nesse estudo, 20 bactérias (MT13; MT22; MT29; MT30; MT31; MT34; MT39; MT40; MT41; MT42; MT45; MT51; MT70; MT74; SEMIA4077; SEMIA4080; BR522; SEMIA6145; BR10055; CFN42) apresentaram fragmentos de tamanho entre 600-699 pb na amplificação com os oligonucleotídeos *glnII*12F e *glnII*689R, tamanho que corresponde ao descrito na literatura. Não foram encontrados estudos com perfil eletroforético da amplificação do gene *glnII*, o que impossibilitou comparação com os resultados obtidos. Esses resultados indicam uma heterogeneidade na composição genética dessa região, ou que possa haver mais de um operon para o gene *gln*, ou ainda a presença de amplificação inespecífica. Somente poderemos indicar o motivo da presença de vários fragmentos de amplificação pelo sequenciamento dos fragmentos amplificados.

Figura 5: Perfil eletroforético de amplificação por PCR da região *glnII* de 20 bactérias isoladas de milho e oito de referência - *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080). Gel de agarose 1,3%. Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS).

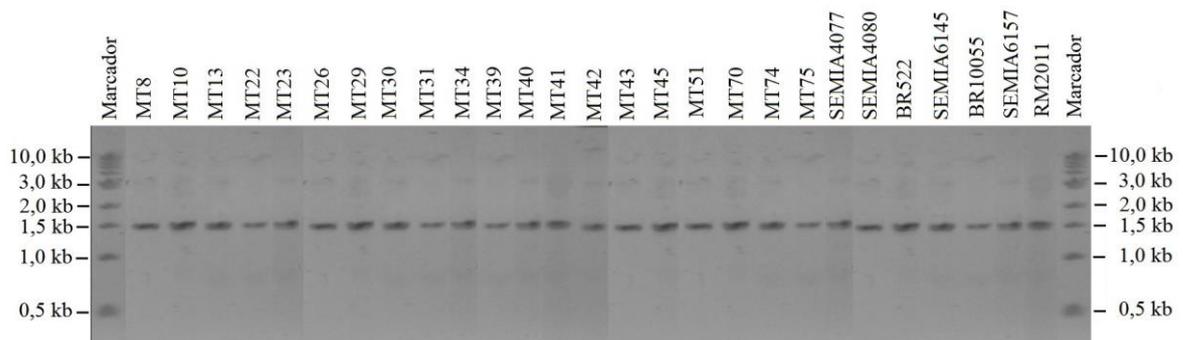


4.3.5 Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região 16S rRNA

Todas as bactérias estudadas amplificaram com os oligonucleotídeos Y1 e Y3. Os produtos de amplificação da região 16S rRNA foram um único fragmento de aproximadamente 1.500 pb (Figura 6). Esse tamanho de fragmento corresponde ao esperado, pois os oligonucleotídeos utilizados flanqueiam quase todo o gene que apresenta tamanho médio de 1.500 pb para as bactérias em geral (LAGUERRE *et al.*, 1994; CRUZ *et al.*, 2001).

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada com a finalidade de preparar o material para a identificação dos isolados através do sequenciamento parcial desse gene. O produto do amplificado do gene 16S rRNA também foi utilizado para análise de restrição do DNA ribossomal amplificado.

Figura 6: Perfil eletroforético de amplificação por PCR da região 16S rRNA de 20 bactérias isoladas de milho e oito de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080). Gel de agarose 1,3%. Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS).



4.3.6 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

Pela restrição do gene 16S rRNA com endonuclease *HaeIII* foram obtidos vários fragmentos. Foi possível identificar 12 perfis diferentes (Tabela 4) de duas a cinco bandas (Figura 7) com tamanhos entre 130 e 839 pb (Tabela 12 - Anexos).

22 bactérias apresentaram fragmentos de tamanho entre 300-499 pb (MT8; MT10; MT13; MT22; MT23; MT26; MT29; MT30; MT31; MT34; MT39; MT40; MT41; MT42; MT43; MT45; MT51; MT74; MT75; SEMIA4077; SEMIA6157; RM2011). O isolado MT13 apresentou o maior fragmento de tamanho de 839 pb e o isolado MT43 apresentou o menor fragmento de 130 pb (Tabela 12 - Anexos).

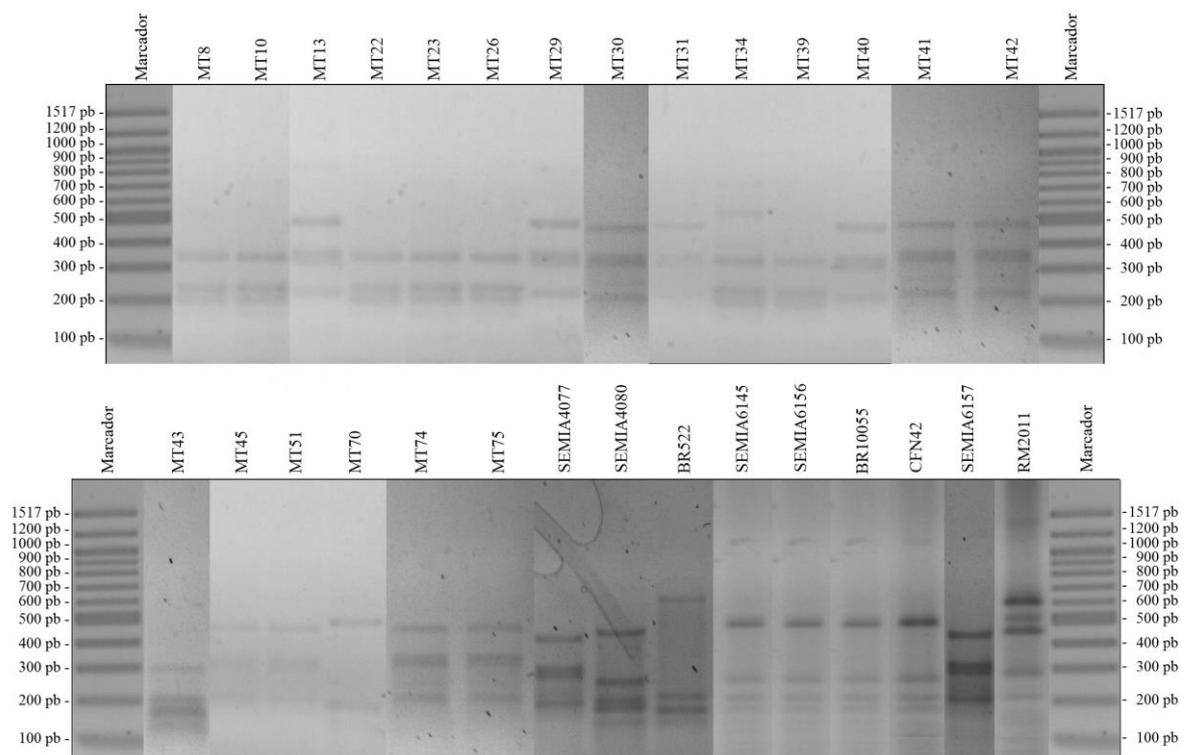
Através da análise de similaridade com os dados dos fragmentos obtidos pela restrição do gene 16S rRNA foi gerado um dendrograma no qual houve a formação de sete grupos de bactérias considerando uma porcentagem de 59% (Figura 18 - Anexos).

Variações no gene 16S rRNA podem ser estimadas por RFLP. Laguerre e colaboradores (1994) observaram variações suficientes que permitiram identificar espécies individuais e diferenciar gêneros de rizóbios através de RFLP com várias endonucleases. Também observaram polimorfismo ao nível intra-espécie. Devido à natureza conservada das sequências de 16S rRNA o método pode ser limitado para diferenciar espécies estreitamente relacionadas (LAGUERRE *et al.*, 1994).

Os perfis obtidos com a restrição do gene 16S rRNA amplificado das bactérias isoladas do milho e dos rizóbios foram comparados entre si, sendo que a análise parcial utilizando apenas a enzima *HaeIII* permitiu diferenciar as bactérias. Houve polimorfismo entre os isolados de milho e entre as espécies de rizóbios utilizadas como referência. As estirpes de referência que apresentaram perfis diferentes entre si da espécie *Rhizobium* foram *R. tropici* (SEMIA4077), *R. tropici* (SEMIA4080) e *R. meliloti* (RM2011) e da espécie *Bradyrhizobium* foram *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA6156) e *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157). As bactérias dessas espécies puderam ser diferenciados no tratamento com endonuclease *HaeIII*. Já as bactérias *Rhizobium* sp. (SEMIA6145), *R. galegae*

BR10055 e *R. etli* (CFN42) apresentaram padrões de restrição idênticos entre si e não puderam ser diferenciadas no tratamento com a endonuclease *HaeIII*.

Figura 7: Perfil eletroforético dos fragmentos gerados pela análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) de 20 bactérias isoladas de milho e nove de referência - *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA6156); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Rhizobium* sp. (SEMIA6145); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080). Gel de agarose 2%. Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (BIOLABS).



4.3.7 Análise dos Dados Utilizando os Marcadores Moleculares

Os diferentes perfis observados para cada marcador molecular (intergênica 16S-23S rRNA, REP, *atpD*, *glnII* e ARDRA) na análise por eletroforese em gel de agarose foram listados na Tabela 4 sendo que para cada perfil observado foi atribuído um agrupamento. Foi observado polimorfismo ao nível intra-espécie para rizóbios e também entre as bactérias isoladas do milho. O maior número de diferentes grupos foi obtido para a PCR da região REP com 24 grupos e o menor para o resultado da análise de ARDRA com 12 grupos.

Por meio do agrupamento dos dados obtidos com as ampliações das regiões espaçadora intergênica 16S-23S rRNA, REP, *atpD* e *glnII* e com a restrição do gene 16S rRNA, obteve-se índices de similaridade (Figura 8) correspondentes entre as 20 bactérias isoladas do milho e sete rizóbios de referência- *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).

Considerando uma porcentagem de 59% de similaridade, houve a formação de 15 grupos de bactérias (Figura 8). Os grupos que apresentaram maior grau de variabilidade foram II (MT43), III (MT45), IV (MT39), V (MT51), VI (MT34), VIII (*Bradyrhizobium* sp. SEMIA6157), X (MT75), XI (MT31), XIII (MT70) e XV (*Mesorhizobium mediterraneum* BR522). No grupo VII houve a maior similaridade (87%) entre *Rhizobium tropici* (SEMIA4077) e *R. tropici* (SEMIA4080). No grupo XIV *R. etli* (CFN42) e *R. galegae* (BR10055) foram semelhantes 80% entre si e ambas foram semelhantes 67% com *R. sp.* (SEMIA6145) (Figura 8). Foi possível observar maior grau de semelhança entre bactérias do mesmo gênero (*Rhizobium*), e uma menor semelhança entre bactérias de diferentes gêneros (*Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium*). As bactérias isoladas do milho mais semelhantes entre si pertenceram aos grupos I (MT8, MT10, MT22, MT23, MT26), IX (MT13, MT29, MT30, MT40) e XII (MT41, MT42 e MT74). Houve baixa semelhança entre as bactérias isoladas do milho e os rizóbios o que indicou que provavelmente esses isolados não pertençam à ordem *Rhizobiales*.

Tabela 4: Perfis das bactérias isoladas do milho e de referência obtidos com a análise dos marcadores moleculares.

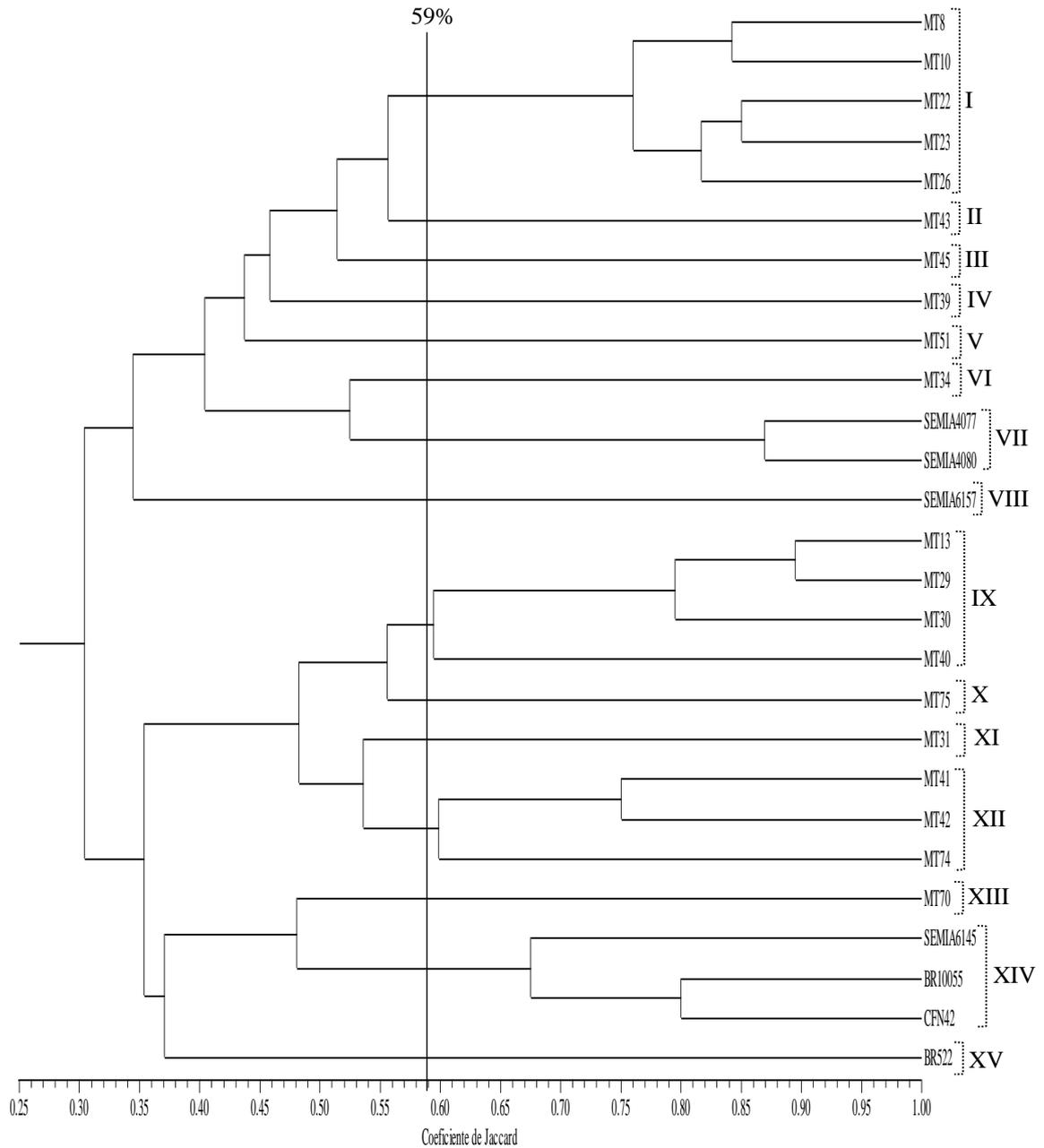
Amostras	intergênica 16S-23S rRNA	REP	<i>atpD</i>	<i>glnII</i>	ARDRA
MT8	A	A	A	A	A
MT10	B	B	A	A	A
MT13	A	C	B	B	B
MT22	C	B	A	C	A
MT23	C	D	A	A	A
MT26	C	E	A	A	A
MT29	A	F	B	B	B
MT30	A	G	B	B	C
MT31	A	H	C	D	D
MT34	D	B	D	E	E
MT39	E	I	E	F	F
MT40	A	J	F	G	D
MT41	A	K	F	H	C
MT42	A	L	G	H	C
MT43	C	M	E	I	G
MT45	C	N	H	J	D
MT51	F	O	I	K	D
MT70	G	P	J	L	H
MT74	H	Q	B	M	C
MT75	A	R	B	N	C
SEMIA4077	I	S	K	O	C
SEMIA4080	I	S	K	O	I
BR522	J	T	L	L	J
SEMIA6145	K	U	M	L	K
SEMIA3012	*	*	E	*	*
SEMIA6156	*	*	*	*	K

Amostras	intergênica 16S- 23S rRNA	REP	<i>atpD</i>	<i>glnII</i>	ARDRA
BR10055	L	V	N	L	K
CFN42	M	W	N	L	K
SEMIA6157	N	X	O	I	D
RM2011	*	X	O	I	L

* Isolados não amplificados para a região estudada.

Bactérias de referência: *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *B. elkanii* (SEMIA6156); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. leguminosarum* (SEMIA3012); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).

Figura 8: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard com base na análise dos marcadores moleculares (*atpD*, *glnII*, intergênica 16S-23S rRNA, REP e ARDRA) de 20 bactérias isoladas de milho e sete de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).



4.3.8 Sequenciamento do Gene 16S rRNA

A disponibilidade de numerosas sequências de nucleotídeos dos genes 16S rRNA, depositadas em bancos de dados públicos, permitiu a identificação das bactérias. Foram identificadas bactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Burkholderia* e *Cedecea*. Os resultados do alinhamento entre as sequências amplificadas e as sequências descritas no banco de dados mostraram similaridade acima de 99% o que indica confiabilidade para os resultados.

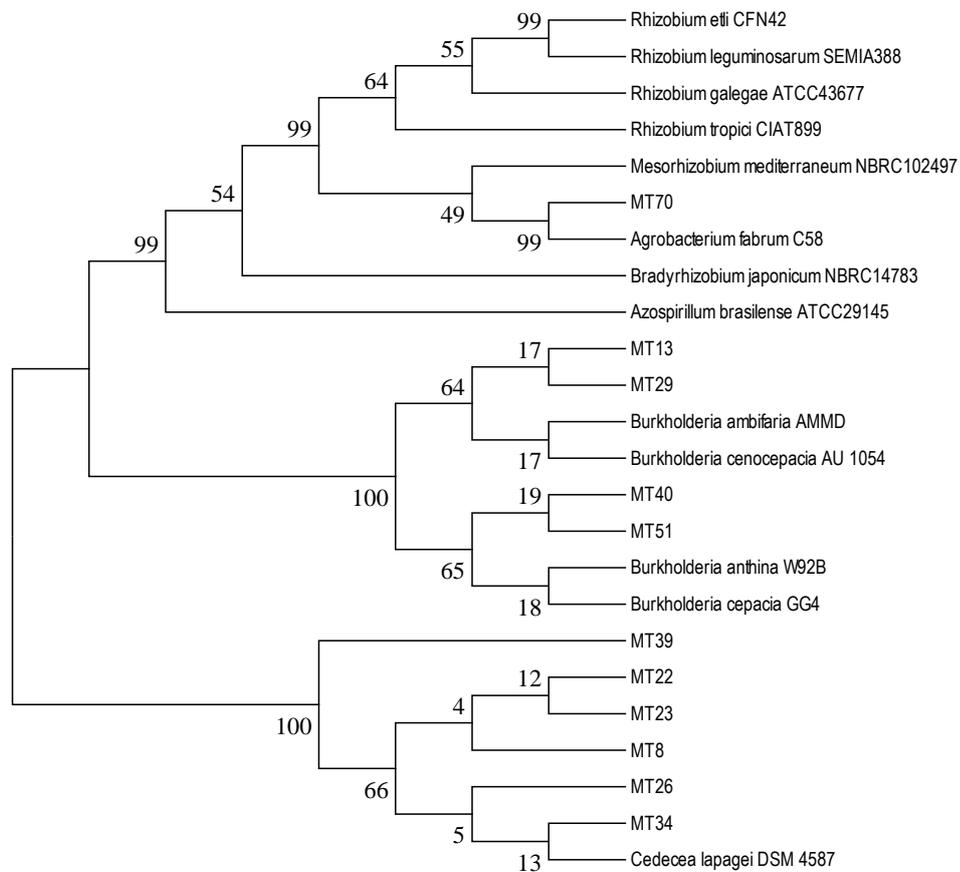
Não foi possível realizar o sequenciamento do gene 16S rRNA de todas as bactérias estudadas sendo que foram obtidas sequências para 11 das 20 bactérias isoladas de milho. No sequenciamento foram obtidos em média sequências de 511 a 711 pb (Tabela 5) que foram utilizadas para as análises de comparação (NCBI) e para a confecção de um dendrograma de similaridade (Figura 9). Pela comparação das sequências utilizando a região final do gene 16S rRNA (oligonucleotídeo Y3) utilizando a ferramenta Blast Nucleotide foi possível inferir que 55% são bactérias do gênero *Cedecea*, 36% do gênero *Burkholderia* e 9 % do gênero *Agrobacterium*. Os parâmetros de comparação utilizados no NCBI e a porcentagem de identidade com sequências do banco são indicados na tabela 5.

As sequências das bactérias isoladas de milho obtidas com o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foram comparadas com sequências *out group* disponíveis no banco de dados NCBI que correspondem ao mesmo gene (Figura 9). Pela análise de agrupamento utilizando as sequências dos 11 isolados foi observada a formação de três agrupamentos que foram entre as classes alfa-proteobacteria (*Agrobacterium fabrum*, *Azospirillum brasiliense*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Mesorhizobium mediterraneum*, *Rhizobium* spp.), beta-proteobacteria (*Burkholderia* spp.) e gamma-proteobacteria (*Cedecea lapagei*).

Tabela 5: Bactérias endofíticas isoladas de milho sequenciadas parcialmente para o gene 16S rDNA utilizando o oligonucleotídeo Y3, e identificação por homologia com sequências deste gene para as bactérias contidas no banco de dados NCBI.

Isolados	Pares de bases (pb) sequenciados	Espécies	Similaridade e-value	NCBI Reference Sequence	% ID
MT8	511	<i>Cedecea lapagei</i> DSM 4587	0.0	NR_126318.1	100%
MT13	560	<i>Burkholderia ambifaria</i> AMMD	0.0	NR_074687.1	100%
MT22	580	<i>Cedecea lapagei</i> DSM 4587	0.0	NR_126318.1	100%
MT23	661	<i>Cedecea lapagei</i> DSM 4587	0.0	NR_126318.1	99%
MT26	651	<i>Cedecea lapagei</i> DSM 4587	0.0	NR_126318.1	99%
MT29	631	<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054	0.0	NR_074686.1	100%
MT34	711	<i>Cedecea lapagei</i> DSM 4587	0.0	NR_126318.1	100%
MT39	701	<i>Cedecea lapagei</i> DSM 4587	0.0	NR_126318.1	99%
MT40	701	<i>Burkholderia anthina</i> W92B	0.0	NR_104975.1	100%
MT51	571	<i>Burkholderia cepacia</i> GG4	0.0	NR_102848.1	100%
MT70	671	<i>Agrobacterium fabrum</i> C58	0.0	NR_074266.1	100%

Figura 9: A história evolutiva foi inferida usando o método UPGMA (SNEATH; SOKAL, 1973). A árvore ideal com a soma do comprimento dos ramos = 0.53572202 é mostrada. As percentagens de árvores idênticas, nas quais os taxa associados foram agrupados no teste de *bootstrap* (1000 réplicas), são mostradas ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método *Maximum Composite Likelihood* (TAMURA; NEI; KUMAR, 2004) e estão em unidades do número de substituições de bases por local. A análise envolveu sequências de 24 nucleotídeos. Todas as posições contendo *gaps* e dados perdidos foram eliminadas. Houve um total de 495 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2015).



Com relação à análise de sequências de microrganismos associados à raízes de plantas de milho no Brasil, bactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Burkholderia* e *Cedecea* estão descritas na literatura.

Pedrinho (2009) identificou a presença de bactérias do gênero *Agrobacterium* associadas ao milho, dos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Bactérias do gênero *Agrobacterium*, alfa-proteobactérias da família *Rhizobiaceae*, são descritas na literatura como de vida livre, associadas com plantas (fitopatogênicas ou não) e também patogênicas em humanos imunocomprometidos (AUJOULAT *et al.*, 2011).

Agrobacterium spp. têm sido utilizadas para criar plantas transgênicas de muitas espécies importantes economicamente, inclusive o milho, através da transformação genética. Essas bactérias causam tumores vegetais e possuem o plasmídeo Ti (indutor de tumor), que pode se replicar independentemente do genoma da bactéria e possui duas regiões importantes para a transferência de genes da bactéria para a planta (GELVIN, 2003).

Agrobacterium tumefaciens C58 é um patógeno de plantas capaz de transferir um segmento definido de DNA para uma planta hospedeira, gerando um tumor (*crown gall* ou galha-de-coroa). Substituindo os genes indutores de tumores, é possível a introdução de qualquer gene desejado para a planta. Assim, *A. tumefaciens* tem sido fundamental para o desenvolvimento da genética de plantas modernas e biotecnologia agrícola (GOODNER *et al.*, 2001).

Através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, Ikeda e colaboradores (2013) identificaram bactérias do gênero *Burkholderia* associadas as raízes de milho do estado de Paraná. O gênero *Burkholderia*, beta-proteobactérias da família *Burkholderiaceae*, contém espécies que interagem com plantas, promotoras do crescimento ou fitopatogênicas, e também espécies patogênicas oportunistas, que causam infecções em humanos imunocomprometidos (ANGUS *et al.*, 2014).

Burkholderia ambifaria, *B. anthina* e *B. cenocepacia* pertencem ao complexo *B. cepacia*. A estirpe de *B. cepacia* SCAUK0330, considerada uma PGPR, foi isolada a partir da rizosfera do milho, na China. Essa estirpe mostrou atividade solubilizadora de fosfato e antagonismo *in vitro* contra nove fungos patogênicos, indicando que o isolado seria um bom candidato para ser utilizado como

biofertilizante e agente de controle biológico sob uma ampla variedade de condições ambientais (ZHAO *et al.*, 2014).

Cerigioli (2005) identificou a espécie *Cedecea lapagei* em associação com raízes de milho do estado de São Paulo, um dos poucos relatos existentes na literatura. Dos testes realizados por Cerigioli (2005) para o isolado 18R1b/A (*Cedecea lapagei*), esse foi positivo para fixação biológica de nitrogênio em condições de microaerofilia (meio livre de nitrogênio NFb semi-sólido), mas não apresentou amplificação do gene *nifH*, provavelmente porque os oligonucleotídeos utilizados não foram adequados para essa espécie (CERIGIOLI, 2005). Esse relato corrobora a ocorrência de bactérias do gênero *Cedecea* associadas endofiticamente a plantas de milho. *Cedecea lapagei*, gamma-proteobactéria da família *Enterobacteriaceae*, tem sido raramente associada com infecções em humanos, principalmente imunocomprometidos, como bacteremia (DALAMAGA *et al.*, 2008), peritonite (DAVIS; WALL, 2006) e pneumonia (YETKIN, 2008).

Foi possível observar grande diversidade genética entre as bactérias endofíticas isoladas de milho cultivado no Cerrado goiano. Foram identificados isolados com potencial para serem usados como promotores do crescimento e também em transformação genética para melhoramento do milho. Os isolados de maior interesse poderão ser utilizados para estudos posteriores e formulação de inoculantes para cultivo de milho no Cerrado goiano, visando uma agricultura de baixo custo e baixo impacto ambiental.

4.4 CONCLUSÃO

Foram identificados em média 15 agrupamentos na análise baseada no uso de marcadores moleculares (regões intergênica 16S-23S rRNA e REP, genes *atpD*, *glnII* e 16S rRNA, ARDRA) para as 20 bactérias endofíticas isoladas de milho indicando uma alta heterogeneidade genética das bactérias estudadas. O uso desses marcadores mostrou que as amostras estudadas são divergentes, porém não permitiu sua identificação.

Foram identificadas 11 das 20 bactérias endofíticas isoladas de milho através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, com predominância dos gêneros *Cedeceae* e *Burkholderia*. A identificação da espécie dos isolados é importante para selecionar e recomendar estirpes candidatas ao uso na formulação de inoculante.

A maioria das informações que constam na literatura descrevem bactérias do gênero *Cedeceae* como patógenos em humanos imunocomprometidos, mas nesse estudo foi descrito o segundo relato da associação dessas bactérias a plantas de milho no Brasil, indicando que é uma bactéria encontrada no solo associada a plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGUS, A. A.; AGAPAKIS, C. M.; FONG, S.; YERRAPRAGADA, S.; SANTOS, P. E.; YANG, P.; SONG, N.; KANO, S.; CABALLERO-MELLADO, J.; FARIA, S. M.; DAKORA, F. D.; WEINSTOCK, G.; HIRSCH, A. M. Plant-Associated Symbiotic *Burkholderia* Species Lack Hallmark Strategies Required in Mammalian Pathogenesis. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1-12, Jan. 2014.
- AUDY, P.; BRAAT, C.E.; SAINDON, G.; HUANG, H.C.; LAROCHE, A. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. **Phytopathology**, v. 86, p. 361-366, 1996.
- AUJOULAT, F.; JUMAS-BILAK, E.; MASNOU, A.; SALLÉ, F.; FAURE, D.; SEGONDS, C.; MARCHANDIN, H.; TEYSSIER, C. Multilocus Sequence-Based Analysis Delineates a Clonal Population of *Agrobacterium (Rhizobium) radiobacter (Agrobacterium tumefaciens)* of Human Origin. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 10, p. 2608-2618, May 2011.
- AUSEBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E. Short Protocols in Molecular Biology. **John Wiley & Sons**, New York, v. 3, n. 4, p. 1-11, 1999.
- CERIGIOLI, M. M. Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento. São Carlos. Universidade Federal de São Carlos, 2005. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2005.
- CRUZ, L. M.; DE SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied And Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2375-2379, May 2001.
- DALAMAGA, M.; KARMANIOLAS, K.; ARSENIS, G.; PANTELAKI, M.; DASKALOPOULOU, K.; PAPADAVID, E.; MIGDALIS, I. *Cedecea lapagei* bacteremia following cement-related chemical burn injury. **Burns**, v. 34, n. 8, p. 1205-1207, 2008.
- DAVIS, O.; WALL, B. M. "Broom Straw Peritonitis" secondary to *Cedecea lapagei* in a liver transplant recipient. **Peritoneal Dialysis International**, v. 26, n. 4, p. 512-513, 2006.
- DE BRUIJN, F. J. Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction To Fingerprint the Genomes of *Rhizobium meliloti* Isolates and Other

Soil Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 2180-2187, July 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa Agrobiologia, 1995, 60 p.

DOLZANI, L.; TONIN, E.; LAGATOLLA, C.; PRANDIN, L.; MONTI-BRAGADIN, C. Identification of *Acinetobacter* Isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* Complex by Restriction Analysis of the 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1108-1113, May 1995.

FERNANDES, M. F. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 8, p. 911-920, ago. 2003

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 1, p. 16-37, Mar. 2003.

GOODNER, B., HINKLE, G., GATTUNG, S., MILLER, N., BLANCHARD, M., QUROLLO, B., GOLDMAN, B.S., CAO, Y., ASKENAZI, M., HALLING, C., MULLIN, L., HOUMIEL, K., GORDON, J., VAUDIN, M., IARTCHOUK, O., EPP, A., LIU, F., WOLLAM, C., ALLINGER, M., DOUGHTY, D., SCOTT, C., LAPPAS, C., MARKELZ, B., FLANAGAN, C., CROWELL, C., GURSON, J., LOMO, C., SEAR, C., STRUB, G., CIELO, C. AND SLATER, S. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, v. 294, p. 2323-2328, Dec. 2001.

HALL, T. BioEdit. Biological sequence alignment editor for Windows95/98/NT/2K/XP.(2005). Disponível em: <<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>>.

IKEDA, A. C.; BASSANI, L. L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; CORDEIRO, V. K.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M. B. R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L. V. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 1, p. 154-160, 2013.

KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I. B., NEI, M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, 1244-1245, 2001.

KWON, S.; PARK, J.; KIM, J.; KANG, J.; CHO, Y.; LIM, C.; PARKER, M. A.; LEE, G. B. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer

region sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 263-270, 2005.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid Identification of Rhizobia by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 56-63, Jan. 1994.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MASSOL-DEYA, A. A.; ODELSON, D. A.; HICKEY, R. F.; TIEDJE, J. M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16–23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: Akkermans, A. D. L.; Van Elsas, J. D. V.; De Bruijn, F. J. (Ed.). **Molecular Microbial Ecology Manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 1-8, 1995.

MOREIRA, F. M. S. M.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1; n. 2, p. 74-99, 2010.

OGUTCU, H.; ADIGUZEL, A.; GULLUCE, M.; KARADAYI, M.; SAHIN, F. Molecular Characterization of *Rhizobium* Strains Isolated from Wild Chickpeas Collected from High Altitudes in Erzurum-Turkey. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 14, n. 2, p. 4294-4300, 2009.

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.)**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2009. Tese (Doutorado em Microbiologia), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2009.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc - Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: State University of New York, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec. 1977.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 743-767, 2013.

SHAMSELDIN, A.; SADOWSKY, M. J.; EL-SAADANI, M.; AN, C. S. Molecular Biodiversity and Identification of Free Living *Rhizobium* Strains from Diverse Egyptian Soils as Assessed by Direct Isolation Without Trap Hosts. **American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science**, v. 4, n. 5, p. 541-549, 2008.

THÓRSSON, A. T.; SVERRISSON, H.; ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K. Genotyping Icelandic isolates of rhizobia based on rDNA-RFLP. **Icelandic Agricultural Sciences**, v. 13, p. 17-25, 2000.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 164 p., 1970.

VINUESA, P.; SILVA, C.; WERNER, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 34, n. 1, p. 29-54, 2005.

YETKIN, G.; AY, S.; KAYABAŞ, U.; GEDIK, E.; GÜÇLÜER, N.; CALIŞKAN, A. A pneumonia case caused by *Cedecea Lapagei*. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 42, n. 4, p. 681-684, 2008.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the Phototrophic *Rhizobium* Strain BTAi1 by Polymerase Chain Reaction-Based Sequencing of a 16S rRNA Gene Segment. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 7, p. 2271-2277, Apr. 1991.

ZHANG, Y. F.; WANG, E. T.; TIAN, C. F.; WANG, F. Q.; HAN, L. L.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, n. 2, p. 146-154, Aug. 2008.

ZHAO, K.; PENTTINEN, P.; ZHANG, X.; AO, X.; LIU, M.; YU, X.; CHEN, Q. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 76-82, Jan 2014.

**CAPÍTULO 2 - ESTUDO DE PRODUÇÃO DE PIGMENTOS
TIPO MELANINA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS
DE MILHO (*Zea mays* L.)**

5.1 INTRODUÇÃO

A melanina é um polímero de coloração variando do ocre até o marrom que tem a tirosinase (EC 1.14.18.1) como principal enzima envolvida na sua síntese. Essa é uma metalo-enzima da classe das oxiredutases que catalisa etapas sequenciais de oxidação com vários substratos fenólicos, apresentando em geral atividade bifuncional: uma atividade de monoxigenase (cresolase), agindo na adição de um grupo hidroxila na posição orto do anel aromático; e outra atividade catecolase, com oxidação de o-difenois para produzir o-quinona (SOLOMON; SUNDARAM; MACHONKIN, 1996).

A especificidade do substrato da maioria das tirosinases é ampla e os substratos são vários compostos mono-, di- e poli-fenólicos. A capacidade das bactérias produzirem melaninas tem sido conhecida há muito tempo. Os genes que codificam a tirosinase foram identificados em muitos dos genomas bacterianos sequenciados até o momento. As tirosinases também estão presentes em fungos, plantas e animais (FACCIO *et al.*, 2012; SABIDO *et al.*, 2013).

A produção de melanina tem sido descrita em bactérias: do solo como *Bacillus megaterium* (SHUSTER; FISHMAN, 2009), *Pseudomonas maltophilia* (WANG *et al.*, 2000), *Pseudomonas putida* F6 (MCMAHON *et al.*, 2007), rizóbios (CUBO *et al.*, 1988); marinhas, como *Shewanella colwelliana*, (FUQUA *et al.*, 1991); patogênicas, como *Pseudomonas aeruginosa* (OGUNNARIWO; HAMILTON-MILLER, 1975); entre outras.

As funções básicas da produção de melanina pelas bactérias ainda são motivo de controvérsia e especulações, apesar de sua importância ter sido provada. Em vários grupos de organismos de vida livre ela fornece proteção contra condições de estresse ambiental, mas em microrganismos patogênicos está correlacionada com aumento da virulência (PLONKA; GRABACKA, 2006).

Pigmentos naturais provenientes de minérios, insetos, plantas e animais foram os corantes utilizados desde o período pré-histórico. Corantes sintéticos tomaram o lugar de pigmentos naturais no meio do século 19 e ainda dominam o campo, apesar de seus efeitos perigosos para os seres humanos, animais e meio

ambiente. Como uma alternativa aos pigmentos sintéticos, pigmentos bacterianos, devido à sua melhor biodegradabilidade e maior compatibilidade com o meio ambiente, oferecem vias promissoras para várias aplicações. A indústria agora é capaz de produzir alguns pigmentos bacterianos para aplicações em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e têxteis (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013).

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Material Biológico

Foram utilizados 20 isolados da Coleção de Culturas de Bactérias isoladas de plantas de milho (*Zea mays* L.) do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual de Goiás (UEG), Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas - Henrique Santillo. Para fins de controle e comparação, também foram utilizados rizóbios como bactérias de referência: *Bradyrhizobium elkanei* SEMIA6156; *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6157; *Mesorhizobium mediterraneum* BR522; *Rhizobium etli* CFN42; *Rhizobium galegae* BR10055; *Rhizobium leguminosarum* SEMIA3012; *Rhizobium meliloti* RM2011; *Rhizobium* sp. SEMIA6145; *Rhizobium tropici* SEMIA4077; *Rhizobium tropici* SEMIA4080.

5.2.2 Armazenamento e Manutenção das Bactérias

Para a cultura das bactérias foi utilizado o meio YMA (*Yeast-Manitol-Agar*) estéril (VINCENT, 1970). Para o preparo desse meio foram utilizados 10 g de manitol, 1 mL de fosfato de potássio dibásico 10%; 4 mL de fosfato de potássio monobásico 10%; 2 mL de sulfato de magnésio 10%; 1 mL de cloreto de sódio 10%; 0,4 g de extrato de levedura; 5 mL de azul de bromotimol 0,5% em 0,2N de hidróxido de potássio; 15 g de ágar e água destilada q.s.p. 1000 mL. O pH foi ajustado para 6,8 e o meio esterilizado por autoclavação.

Inicialmente as bactérias foram submetidas à cultura em placa de Petri com meio sólido YMA e mantidas à temperatura de 30°C para crescimento e análise de pureza. Em seguida, as bactérias foram inoculadas em frascos com meio YM líquido e cultivadas sob agitação (140 rpm) a 28°C por 24 a 48 horas. O crescimento foi monitorado por determinação da absorbância a 600 nm (DO_{600}) em

espectrofotômetro. As culturas com DO_{600} entre 0,6 a 1 nm foram transferidas para micro-tubos, submetidas à centrifugação (13.000 rpm) por 2 minutos. O sedimento das células foi lavado em solução salina estéril 0,9% (NaCl, 0,9 g; água destilada q.s.p. 100 mL). Após adição de solução de glicerol estéril 30% (glicerol, 30 mL; água q.s.p. 100 mL) as células foram armazenadas à temperatura de -4°C . Esses materiais foram estocados em duplicata para a realização dos estudos.

5.2.3 Extração do DNA Total

O DNA dos 20 isolados e das bactérias de referência foi extraído como descrito por Ausebel, Brent e Kingston (1999), com modificações. As bactérias foram inoculadas em 10 mL de meio líquido YM e mantidas sob agitação de 120 rpm durante 24 a 48 horas à temperatura ambiente. Todo o volume da cultura foi centrifugado em alíquotas de 1,5 mL em tubos de microcentrífuga a 13.000 rpm durante dois minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células lavado com solução salina estéril 0,9%. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 600 μL de solução de lise de DNA estéril (50 μM Tris pH 7,6; 20 mM de EDTA; 400 mM de NaCl; 1% SDS), homogeneizadas suavemente, incubadas por 10 minutos a 80°C e transferidas para o banho de gelo por 5 minutos. Após essa etapa foi adicionado 3 μL de solução RNase ($24 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) às amostras, que foram incubadas a 37°C por 15 minutos e transferidas para o banho de gelo por 5 minutos. Foi adicionado 200 μL de NaCl 0,5 M estéril (1,46 g de NaCl; 50 mL de água destilada) à mistura, homogeneizada por inversão e acondicionada em banho de gelo por 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 5°C 13.000 rpm durante 15 minutos, o sobrenadante transferido para um novo tubo já contendo 600 μL de isopropanol (P.A.) a temperatura ambiente e levado ao banho de gelo por 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 5°C 13.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante descartado imediatamente. O volume residual do tubo foi suspenso em 600 μL de etanol 70%, centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos e o etanol descartado. O precipitado foi seco à temperatura ambiente durante aproximadamente 24 horas, em seguida,

suspendido em 30 μL de água ultrapura estéril e estocado a -20°C para ser utilizado em análises posteriores.

5.2.4 PCR da região *melA*

O DNA extraído dos 20 isolados do milho e das bactérias de referência foi amplificado por PCR para a região *melA* em termociclador Aeris (Esco) utilizando os oligonucleotídeos *5melA forward* (5'CCGAACGTCCATGGCGTGGCTGGTC3') e *3melA reverse* (5'CCGGAGCCCGGGTGTAGGCGGACA3'). As condições de amplificação foram 3 min 95°C ; 30 ciclos de (1 min 94°C , 1 min 57°C , 3 min 68°C); 10 min 68°C (CABRERA-VALLADARES *et al.*,2006). As concentrações dos reagentes utilizados foram 2,5 mM MgCl_2 , 0,05 mM cada dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 0,6 pmol cada oligonucleotídeo, 0,075 U *Taq* DNA polimerase/ μL .

A partir do método de eletroforese em gel de agarose foi realizada a análise dos fragmentos gerados por PCR. A determinação do perfil eletroforético do material genético foi realizada em gel de agarose 1,7%, tampão TBE 0,5 X (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) e tampão de corrida FSUDS (azul de bromofenol 0,25%, SDS 0,1%, Ficoll[®] 20% em $T_{10}E_1$) sendo adicionado às amostras de DNA na proporção de 1:1 (FSUDS:DNA). A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 0,5 X a 70 V. O tempo da corrida foi de 90 minutos.

Foi utilizado brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) para corar o gel de agarose, por 10 a 15 minutos, que foi lavado em água destilada (15 minutos). As bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador UV acoplado a um sistema de fotodocumentação MultiDoc-it[®] (UVP). O marcador de tamanho molecular utilizado foi 1kb DNA Ladder[®] (BIOLABS).

5.2.5 Análise dos Fragmentos Obtidos por Amplificação e Restrição

Foi construída uma matriz binária com os dados obtidos da análise dos fragmentos obtidos. Para cada posição de migração dos fragmentos obtidos foram atribuídos os valores 1 ou 0, indicando presença ou ausência de fragmento respectivamente. As bactérias foram agrupadas pelo método das médias das distâncias por UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Os valores gerados para cada bactéria foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo coeficiente de Jaccard (ROHLF, 1992), onde $J = a/(n-d)$, sendo “a” o número de combinações com a presença dos fragmentos, menos as combinações de ausência dos fragmentos, “d” é o número de combinações de ausência de fragmentos e “n” é o número de combinações possíveis. Para essas análises foi utilizado o software NTSYSpc[®] (versão 2.02i, 1986-1998 Applied Biostatistics) que gerou um dendrograma de similaridade entre as bactérias analisadas, permitindo avaliar a diversidade dos isolados.

O uso do *software* VisionWorksLS (versão 6.3.3, 2007) do fotodocumentador digital permitiu a análise dos fragmentos da amplificação, estimando seus valores em pares de bases, comparados ao padrão 1kb DNA Ladder[®]. Esses valores foram dispostos em tabela para avaliação da presença e disposição dos fragmentos.

5.2.6 Produção de Melanina

Foi utilizado o meio de cultura batata (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995) suplementado com L-triptofano na concentração de 0,25 g.L⁻¹. Foram utilizados 200 g de batata inglesa, 2,5 g de ácido málico, 2,5 g de açúcar cristal, 2 mL de solução de micronutrientes (molibdato de sódio 0,2 g.L⁻¹; sulfato de manganês 0,235g.L⁻¹; ácido bórico 0,28 g.L⁻¹; sulfato de cobre 0,008 g.L⁻¹; sulfato de zinco 0,024 g.L⁻¹; pH 6,8) e 1 mL de solução de vitaminas (biotina 0,001 g.L⁻¹; piridoxina 0,002 g.L⁻¹; pH 6,8). Para o preparo desse meio 200g de batata inglesa foram pesadas, descascadas, lavadas e fervidas durante 30 minutos. Em seguida, a

solução foi filtrada em funil com algodão. As quantidades de ácido málico e açúcar cristal foram misturadas e dissolvidas em água destilada, até 50 mL, e o pH foi ajustado para 6,5 a 7,0 com KOH. Foi adicionado ao filtrado essa solução e as soluções de micronutrientes e vitaminas. O volume foi completado para 1.000 mL com água destilada e a solução foi autoclavada. A solução de L-triptofano $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ foi adicionada ao meio batata momentos antes da inoculação.

As bactérias foram colocadas para crescimento em triplicata utilizando 1,5 mL de meio batata suplementado com L-triptofano em cada poço da placa DeepWell de 96 poços. A placa foi incubada no escuro a 28°C , 140 rpm por 120 horas.

Após o período de crescimento, as amostras foram transferidas para tubos de 1,5 mL e centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL e armazenado ao abrigo da luz para análises posteriores. O precipitado de células foi suspenso em solução salina 0,9%, foi feita a leitura da absorbância a 600 nm (DO_{600}) em espectrofotômetro Biospectro SP-220 e a conversão para peso seco de células por litro foi feita usando uma curva de calibração ($1 \text{ OD}_{600} = 0.37 \text{ g}_{\text{DCW}}.\text{L}^{-1}$) (CABRERA-VALLADARES *et al.*, 2006).

Alíquotas de 100 μL do sobrenadante, resultante da cultura de cada célula, foram diluídas 1:1 e transferidas para microplaca ELISA de fundo chato 96 poços e foi feita a leitura nos comprimentos de onda de 300, 350 e 400 nm em espectrofotômetro para microplaca. O pH do sobrenadante foi lido com fitas Universal indikator papier (MERCK®) pH 0-14.

Para cálculo da concentração em mg.mL^{-1} dos pigmentos melanina-like produzidos, foi utilizada melanina sintética (Sigma-Aldrich). Foi preparada uma solução estoque de melanina na concentração de $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ em NH_4OH 6M e foram feitas diluições nas concentrações 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 e 0,05 mg.mL^{-1} em NH_4OH 6M. Alíquotas de 200 μL de cada diluição foram transferidas em triplicata para microplaca ELISA de fundo chato 96 poços e foi feita a leitura em espectrofotômetro para microplaca Epoch BioTek. Absorbância a 400 nm foi utilizada para determinação da concentração de melanina (CABRERA-VALLADARES *et al.*, 2006). Os valores obtidos com as leituras foram utilizados para calcular uma reta padrão de concentração da melanina sintética (equação $y =$

0,1106x-0,0023; coeficiente de correlação $R = 0,9925$) e a equação foi utilizada para calcular a concentração de pigmentos melanina-*like* nas amostras.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Caracterização Molecular dos Fragmentos de PCR da Região *meIA*

Na amplificação da região *meIA* foram obtidos diversos fragmentos de diferentes tamanhos. Observando o perfil de bandas dos fragmentos amplificados, cada bactéria apresentou perfil que consistiu em uma a oito bandas (Figura 10) com comprimentos compreendidos entre 202 e 5.678 pb (Tabela 6). Algumas bactérias apresentaram perfis de bandas idênticos entre si.

A maioria dos fragmentos obtidos estavam na faixa de tamanho entre 1.000-1.299 pb, em 21 bactérias (MT8; MT10; MT22; MT23; MT26; MT31; MT34; MT39; MT40; MT41; MT42; MT43; MT70; BR322; BR520; BR522; BR2001; BR10055; CFN42; IG; RM2011). A bactéria RM2011 apresentou o maior fragmento de tamanho de 5.678 pb e o isolado MT40 apresentou o menor fragmento de 202 pb (Tabela 6).

Foi gerado o dendrograma a partir da análise dos dados obtidos com a amplificação da região *meIA* (Figura 11). Considerando uma similaridade de 60%, houve a formação de 11 grupos.

Em relação à estrutura do gene *meIA*, estudos demonstram uma variação de tamanho em vários microrganismos: 1.300 pb na bactéria marinha *Shewanella colwelliana* (FUQUA *et al.*, 1991); 1.737 pb em *Rhizobium meliloti* GR4 (MERCADO-BLANCO *et al.*, 1993); 1.854 pb em *R. etli* CFN42 (CABRERA-VALLADARES *et al.*, 2006).

Não foram encontrados estudos descrevendo perfil eletroforético com amplificação do gene *meIA* para comparação com os resultados obtidos. A maioria das bactérias estudadas apresentaram fragmentos de tamanhos semelhantes aos obtidos nas pesquisas citadas acima, com exceção das amostras MT29 e MT74. Como foram observados vários outros fragmentos de tamanhos diferentes aos

descritos na literatura, é possível que exista grande variabilidade para essa região, ou ainda que os oligonucleotídeos utilizados apresentaram inespecificidade na amplificação.

Um grande número de vias e organismos envolvidos na síntese de melanina é descrito, mas há poucas informações sobre a genética molecular da melanogênese (KURIAN; BHAT, 2016).

Figura 10: Perfil eletroforético de amplificação por PCR da região *melA* de 20 bactérias isoladas de milho e oito estirpes de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080). Gel de agarose 1,3%. Marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (BIOLABS).

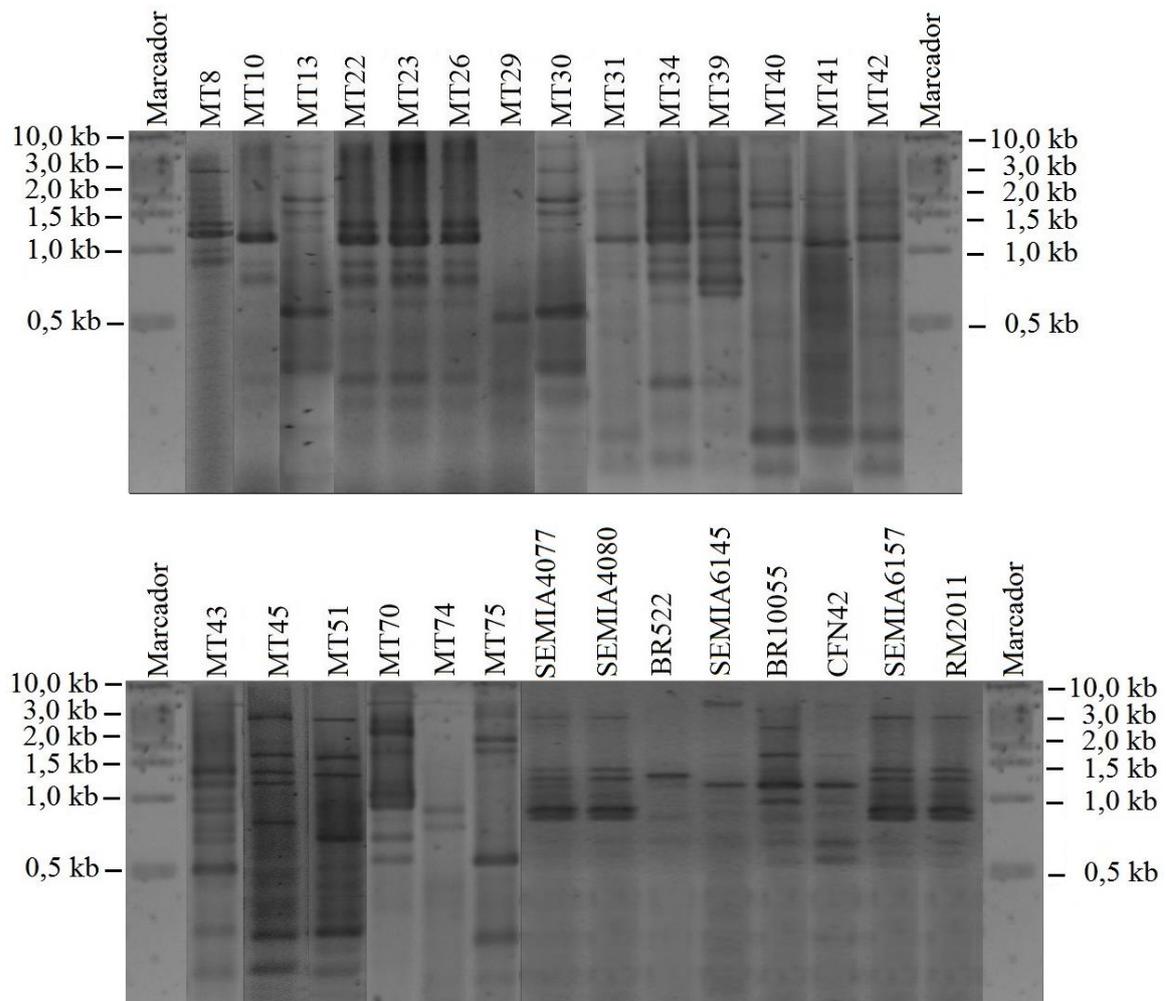


Tabela 6: Análise dos fragmentos gerados pela reação de PCR da região *meIA* de 20 bactérias isoladas de milho e oito estirpes de referência.

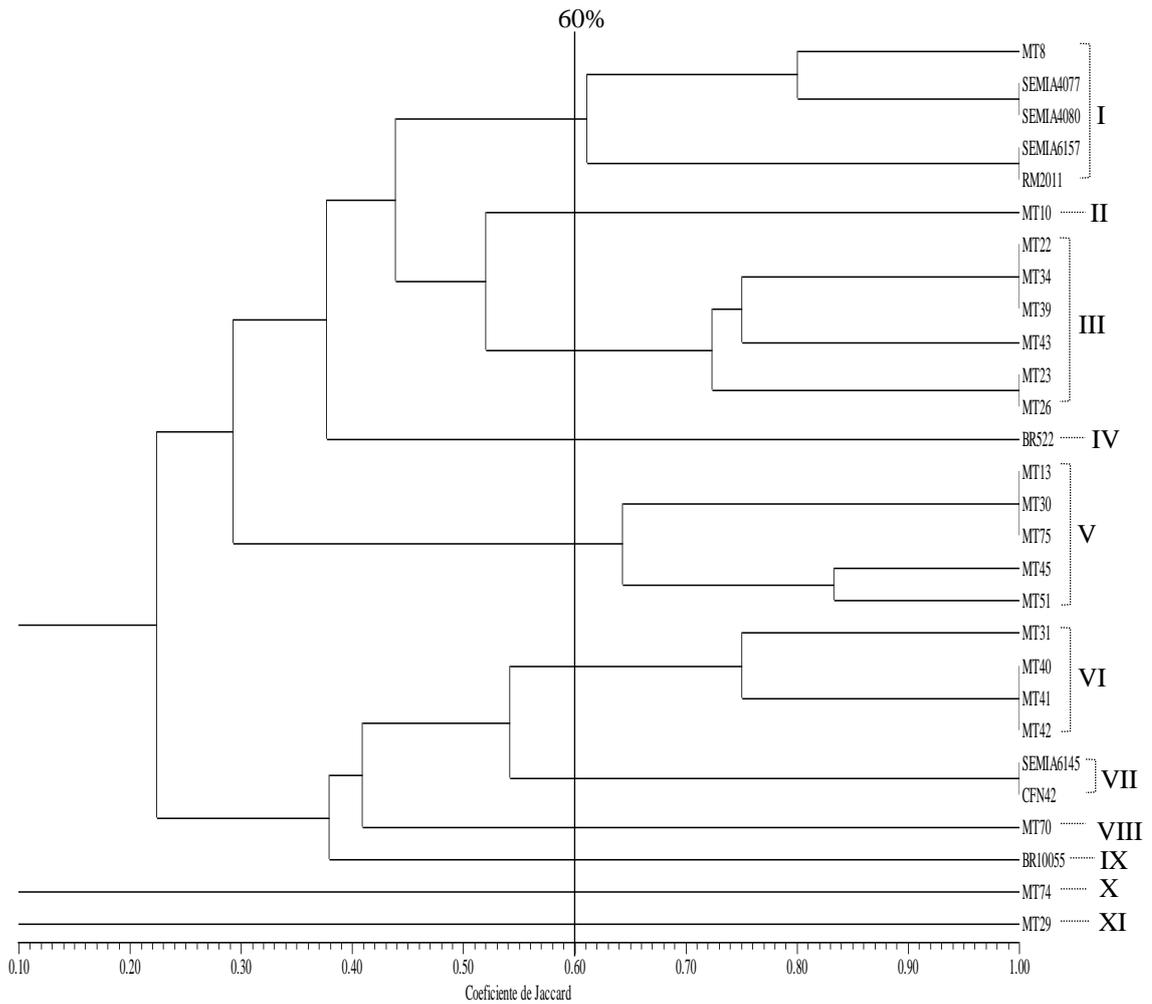
Bactérias	Número de Bandas	Tamanho das Bandas (pb)
MT8	4	818; 1188; 1330; 4704
MT10	4	800; 926; 1200; 1421
MT13	6	259; 611; 1487; 1835; 2182; 5567
MT22	6	322; 634; 791; 953; 1183; 1421
MT23	6	315; 641; 800; 926; 1167; 1403
MT26	6	315; 641; 819; 935; 1216; 1421
MT29	1	528
MT30	6	259; 626; 1487; 1835; 2246; 5216
MT31	3	1104; 1769; 2096
MT34	6	283; 628; 775; 908; 1157; 1380
MT39	6	288; 662; 755; 916; 1193; 1366
MT40	4	202; 1133; 1772; 2098
MT41	4	207; 1225; 1852; 2182
MT42	4	205; 1104; 1698; 2096
MT43	8	283; 522; 668; 749; 892; 991; 1181; 1380
MT45	6	327; 785; 1450; 1800; 2182; 4291
MT51	5	323; 734; 1574; 1766; 3417
MT70	6	556; 698; 932; 1042; 1772; 2727
MT74	2	762; 892
MT75	6	327; 606; 1462; 1817; 2119; 4731
SEMIA4077	5	676; 814; 1168; 1352; 5380
SEMIA4080	5	669; 822; 1219; 1391; 5380
BR522	2	1058; 1306
SEMIA6145	2	1125; 1721
BR10055	4	843; 1094; 1898; 3076
CFN42	2	1104; 1721

Bactérias	Número de Bandas	Tamanho das Bandas (pb)
SEMIA6157	5	679; 751; 1179; 1352; 5380
RM2011	5	672; 751; 1179; 1352; 5678

Intervalos utilizados para separação das bandas baseados em seus tamanhos: >499; 500-599; 600-699; 700-799; 800-899; 900-999; 1.000-1.299; 1.300-1.499; 1.500-1.999; 2.000-2.999; <3.000.

Estirpes de referência: *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).

Figura 11: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados por PCR da região *melA* de 20 bactérias isoladas de milho e oito estirpes de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *R. etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).



5.3.2 Produção de Melanina

Para o teste de produção de pigmentos melanina-*like* em meio líquido, foi observado visualmente o escurecimento do meio de cultura para a cor castanho amarelada para algumas das bactérias testadas, em comparação ao controle negativo, demonstrando que houve a produção de pigmentos melanina-*like*.

Uma estratégia para indução da produção de pigmentos melanina-*like* é a suplementação do aminoácido L-tirosina ao meio de cultura. Dessa forma pode-se obter um aumento no rendimento da produção de melanina-*like*, pois esse aminoácido é o substrato para a enzima tirosinase. Como as vias biossintéticas de tirosina estão intrinsecamente ligadas às do triptofano, outras vias de metabolismo podem estar envolvidas na produção de melanina bacteriana e o aminoácido triptofano também pode ser utilizado como substrato alternativo para a síntese de melanina (GROVE; REIMANN; ROY, 2007; WAN *et al.*, 2007). Ainda foi adicionado ao caldo de cultivo sulfato de cobre, que auxilia na atividade da metalo-enzima tirosinase, proporcionando as condições em termos de precursores e cofatores para a produção de pigmento melanina-*like* pela enzima, como foi observado para os isolados bacterianos estudados.

O pH das amostras testadas variou entre 7 e 8 (Tabela 7). As tirosinases bacterianas tem um pH ótimo em torno de 7,5 (CABRERA-VALLADARES *et al.*, 2006; SHUSTER; FISHMAN, 2009; FACCIO *et al.*, 2012). O pH observado nas amostras é o indicado para a ótima atividade da enzima tirosinase.

As células foram separadas do sobrenadante através da centrifugação, pois a presença do pigmento melanina no meio de cultura interfere na absorbância das células a 600 nm. Após o período de crescimento, as amostras foram centrifugadas e o precipitado de células foi suspenso em solução salina 0,9%. Foi feita a leitura da absorbância a 600 nm (DO_{600}) e a conversão para peso seco de células (Tabela 7). A maior biomassa foi observada no isolado MT75 ($0,711 \text{ g.L}^{-1}$) e a menor na bactéria SEMIA6145 ($0,282 \text{ g.L}^{-1}$).

Tabela 7: Valores de pH, absorbância das células a 600 nm (DO_{600}), biomassa ($g.L^{-1}$) e concentração dos pigmentos melanina-like produzidos ($mg.mL^{-1}$) de bactérias crescidas por 120 horas em caldo batata com L-triptofano $0,25 g.L^{-1}$ e sulfato de cobre $0,008 g.L^{-1}$, sob agitação (140 rpm), no escuro.

Bactérias	pH	DO_{600}	Biomassa ($g.L^{-1}$)	Melanina ($mg.mL^{-1}$)
MT8	8,00	1,279	0,473	0,00
MT10	8,00	1,312	0,486	28,70
MT13	7,00	1,824	0,675	0,00
MT22	8,00	0,980	0,363	10,28
MT23	8,00	0,877	0,324	5,66
MT26	7,50	1,187	0,439	20,52
MT29	7,00	1,813	0,671	18,44
MT30	7,00	1,916	0,709	20,42
MT31	7,00	1,911	0,707	14,21
MT34	8,00	0,966	0,357	24,20
MT39	7,50	1,331	0,492	9,69
MT40	7,00	1,564	0,579	11,41
MT41	7,00	1,903	0,704	2,58
MT42	7,00	1,915	0,708	2,87
MT43	7,50	1,171	0,433	21,91
MT45	7,00	1,769	0,655	73,77
MT51	7,50	1,767	0,654	19,61
MT70	7,00	1,014	0,375	13,70
MT74	7,00	1,902	0,704	18,14
MT75	7,00	1,921	0,711	20,05
SEMIA4077	7,50	1,282	0,474	41,54
SEMIA4080	7,50	1,262	0,467	7,12
BR522	7,00	1,098	0,406	11,15
SEMIA6145	7,00	0,761	0,282	22,61
SEMIA3012	7,50	1,002	0,371	0,00

Bactérias	pH	DO ₆₀₀	Biomassa (g.L ⁻¹)	Melanina (mg.mL ⁻¹)
BR10055	7,00	1,318	0,488	3,40
CFN42	7,00	0,834	0,308	7,47
SEMIA6157	7,00	1,308	0,484	14,82
RM2011	7,00	1,350	0,500	16,64

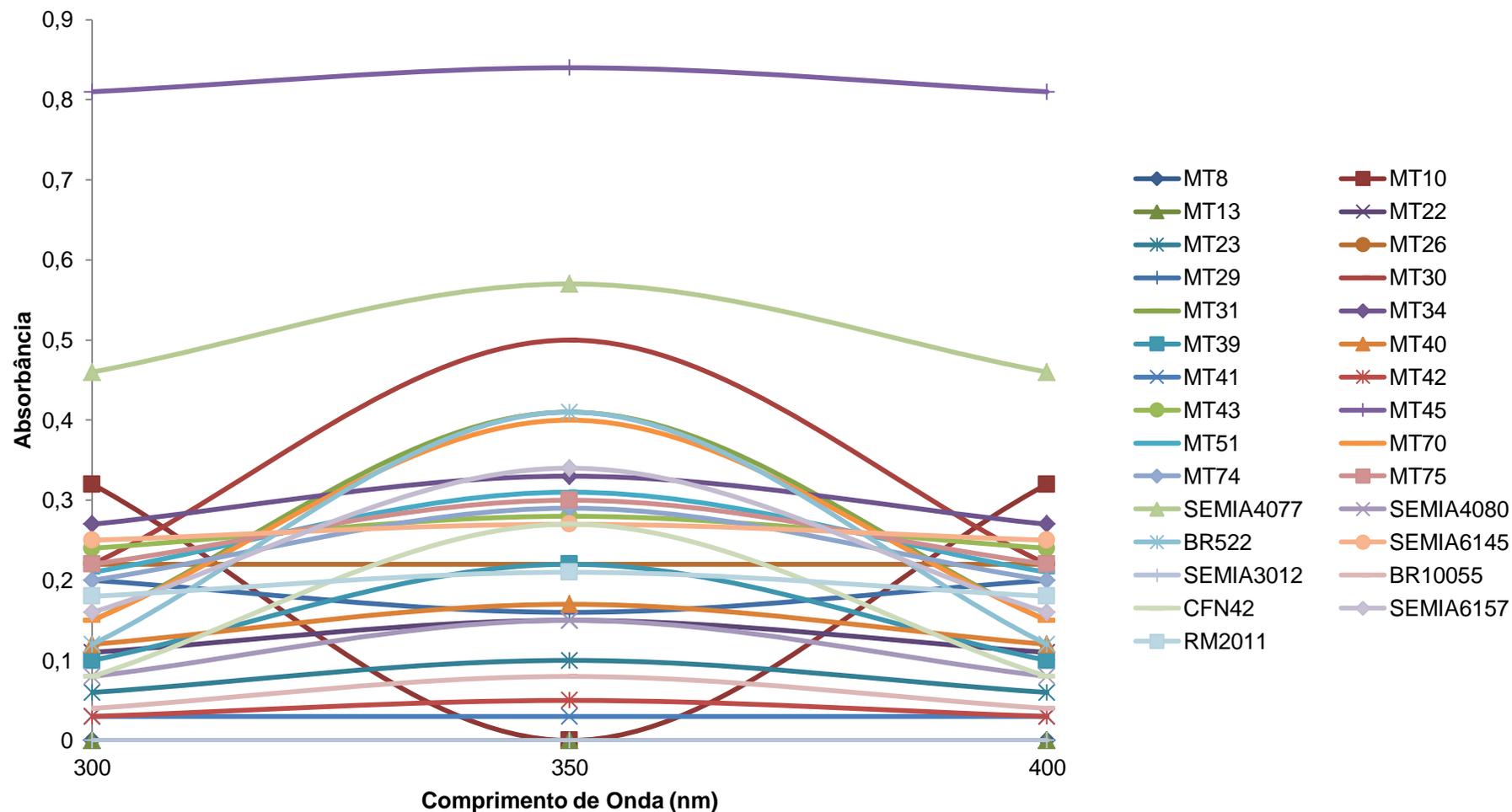
Bactérias de referência: *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. leguminosarum* (SEMIA3012); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).

Derivados da melanina a partir de diferentes fontes (animais, plantas, bactérias e sintética) possuem boa solubilidade em soluções aquosas neutras e básicas, mas pouca solubilidade em muitos solventes orgânicos (LIU *et al.*, 1993). Sendo assim, para determinação dos espectros de absorção no UV-visível, a melanina sintética foi solubilizada em solução alcalina de NH₄OH.

Ao estudarem a produção de melanina por *Escherichia coli* recombinante, Lin e colaboradores (2005) realizaram leitura em espectrofotômetro para determinar espectro de absorção de luz UV-visível, nos comprimentos de onda de 200 a 1000 nm, e encontraram a máxima absorção no comprimento de onda de 200-400 nm. Os comprimentos de onda de 300, 350 e 400 nm foram escolhidos para leitura em espectrofotômetro.

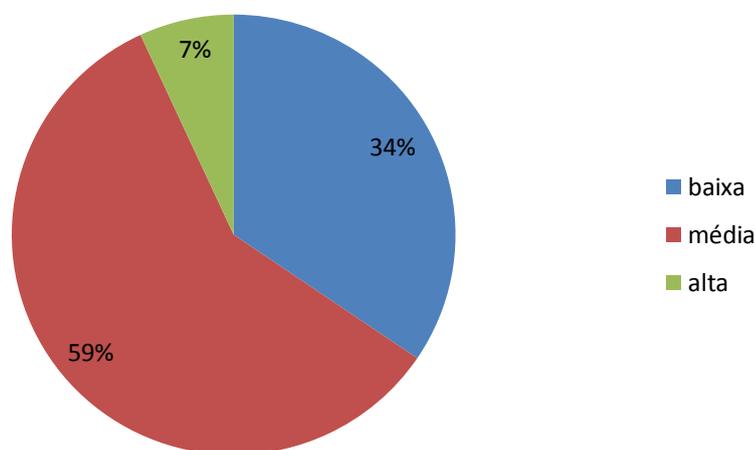
Os valores da absorbância em espectrofotômetro estão apresentados na Tabela 13 (Anexos). A 300 nm a variação da absorbância foi de 0,00 (MT8; MT10; MT13; SEMIA3012) a 0,95 (MT45; MT70); a 350 nm de 0,00 (MT8; MT10; MT13; SEMIA3012) a 0,84 (MT45); e a 400 nm de 0,00 (MT8; MT13; SEMIA3012;) a 0,81 (MT45). Foi possível observar grande variação nas leituras obtidas para as bactérias em cada comprimento de onda, sugerindo que houve a produção de pigmentos melanina-*like* com pico de absorção para cada comprimento testado (Figura 12).

Figura 12: Valores da absorvância em espectrofotômetro (DO) nos comprimentos de onda 300, 350 e 400 nm, do sobrenadante obtido com o cultivo de bactérias por 120h em caldo batata com L-triptofano 0,25 g.L⁻¹ e sulfato de cobre 0,008 g.L⁻¹, sob agitação (140 rpm) no escuro.



Os valores obtidos com as absorvâncias a 400 nm foram correlacionados com a presença de pigmentos melanina-*like*. Com relação a produção de pigmentos, 59% das amostras apresentaram produção média que variou de 10 a 30 mg.mL⁻¹ (MT10, MT22, MT26, MT29, MT30, MT31, MT34, MT40, MT43, MT51, MT70, MT74, MT75, BR522, SEMIA6145, SEMIA6157, RM2011), 34% apresentaram baixa produção <10 mg.mL⁻¹ (MT8, MT13, MT23, MT39, MT41, MT42, SEMIA4080, SEMIA3012, BR1005, CFN42) e 7% apresentaram alta produção >30 mg.mL⁻¹ (MT45, SEMIA4077) (Figura 13). Ao quantificar a produção de melanina produzida por uma estirpe recombinante de *E. coli*, Cabrera-Valladares e colaboradores (2006) obtiveram produção de melanina de 0,41 mg.mL⁻¹ em meio de cultura suplementado com tirosina, enquanto que nesse estudo houve uma produção bem maior, que foi de 73,77 mg.mL⁻¹, pelo isolado MT45 em meio de cultura suplementado com triptofano.

Figura 13: Produção de pigmentos melanina-*like* pelas bactérias crescidas por 120 horas em caldo batata com L-triptofano 0,25 g.L⁻¹ e sulfato de cobre 0,008 g.L⁻¹, sob agitação (140 rpm), no escuro.



5.4 CONCLUSÃO

Foi possível observar que houve produção de pigmentos melanina-*like* pela enzima tirosinase nas bactérias estudadas, pois o meio de cultura continha sulfato de cobre, um cofator para essa enzima, e triptofano, substrato para a enzima, e também o pH do meio ficou entre 7 e 8, que é o ideal para atividade da enzima. O isolado MT45 foi o que apresentou o melhor rendimento na produção de pigmento melanina-*like* e possui potencial para obtenção de bioprodutos com aplicações comerciais. Análises posteriores podem auxiliar na caracterização desses pigmentos produzidos como, por exemplo, espectroscopia de absorção no infravermelho e HPLC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUSEBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E. Short Protocols in Molecular Biology. **John Wiley & Sons**, New York, v. 3, n. 4, p. 1-11, 1999.

CABRERA-VALLADARES, N.; MARTÍNEZ, A.; PIÑERO, S.; LAGUNAS-MUÑOZ, V. H.; TINOCO, R.; ANDA, R.; VÁZQUEZ-DUHALT, R.; BOLÍVAR, F.; GOSSET, G. Expression of the *melA* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 772-779, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília, v. 3, safra 2015/2016, n. 7, abr. 2016, 158 p. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 05 maio 2016.

CUBO, M. T.; BUENDIA-CLAVERIA, A. M.; BERINGER, J. E.; RUIZ-SAINZ, J. E. Melanin Production by *Rhizobium* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1812-1817, July 1988.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa Agrobiologia, 1995, 60 p.

FACCIO, G.; KRUIUS, K.; SALOHEIMO, M.; THÖNY-MEYER, L. Bacterial tyrosinases and their applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1749-1760, Dec. 2012.

FUQUA, W. C.; COYNE, V. E.; STEIN, D. C.; LIN, C. M.; WEINER, R. M. Characterization of *melA*: a gene encoding melanin biosynthesis from the marine bacterium *Shewanella colwelliana*. **Gene**, v. 109, n. 1, p. 131-136, Dec. 1991.

GROVE, J. F.; REIMANN, E.; ROY, S. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. Vienna: Springer, v. 88, 2007.

KURIAN, N. K.; BHAT, S. G. **Bacterial Melanins**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/264237824_Bacterial_Melanins>. Acesso em 17 maio 2016.

LIN, W. P.; LAI, H. L.; LIU, Y. L.; CHIUNG, Y. M.; SHIAU, C. Y.; HAN, J. M.; YANG, C. M.; LIU, Y. T. Effect of melanin produced by a recombinant *Escherichia coli* on antibacterial activity of antibiotics. **Journal of Microbiology, Immunology, and Infection**, v. 38, n. 5, p. 320-326, 2005.

LIU, Y. T.; SUI, M. J.; JI, D. D.; WU, I. H.; CHOU, C. C.; CHEN, C. C. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 62, n.2, p. 131-136, Sep. 1993.

MERCADO-BLANCO, J.; GARCIA, F.; FERNANDEZ-LOPEZ, M.; OLIVARES, J. Melanin production by *Rhizobium meliloti* GR4 is linked to nonsymbiotic plasmid pRmeGR4b: cloning, sequencing, and expression of the tyrosinase gene *mepA*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 17, p. 5403-5410, 1993.

MCCMAHON, A. M.; DOYLE, E. M.; BROOKS, S.; O'CONNOR, K. E. Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1435-1441, 2007.

OGUNNARIWO, J.; HAMILTON-MILLER, J. M. T. Brown- and red-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*: differentiation between melanin and pyorubrin. **Journal of Medical Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 199-203, Feb. 1975.

PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms - biotechnological and medical aspects. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 3, p. 429-443, 2006.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc - Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: State University of New York, 1992.

SABIDO, A.; MARTÍNEZ, L. M.; DE ANDA, R.; MARTÍNEZ, A.; BOLÍVAR, F.; GOSSET, G. A novel plasmid vector designed for chromosomal gene integration and expression: Use for developing a genetically stable *Escherichia coli* melanin production strain. **Plasmid**, v. 69, n. 1, p. 16-23, Jan. 2013.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SHUSTER, V.; FISHMAN, A. Isolation, Cloning and Characterization of a Tyrosinase with Improved Activity in Organic Solvents from *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Microbiology Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 188-200, 2009.

SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper oxidases and and oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 2563–2606, 1996.

VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A., AHMAD, W. A. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1065-1079, 2013.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria.** Oxford: Blackwell, 164 p., 1970.

WAN, X.; LIU, H. M.; LIAO, Y.; SU, Y.; GENG, J.; YANG, M. Y.; CHEN, X. D.; SHEN, P. Isolation of a novel strain of *Aeromonas media* producing high levels of DOPA-melanin and assessment of the photoprotective role of the melanin in bioinsecticide applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2533-2541, 2007.

WANG, G.; AAZAZ, A.; PENG, Z.; SHEN, P. Cloning and overexpression of a tyrosinase gene *mel* from *Pseudomonas maltophilia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 185, p. 23-27, 2000.

ANEXOS

Figura 14: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados por PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA de 20 bactérias isoladas de milho e sete de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).

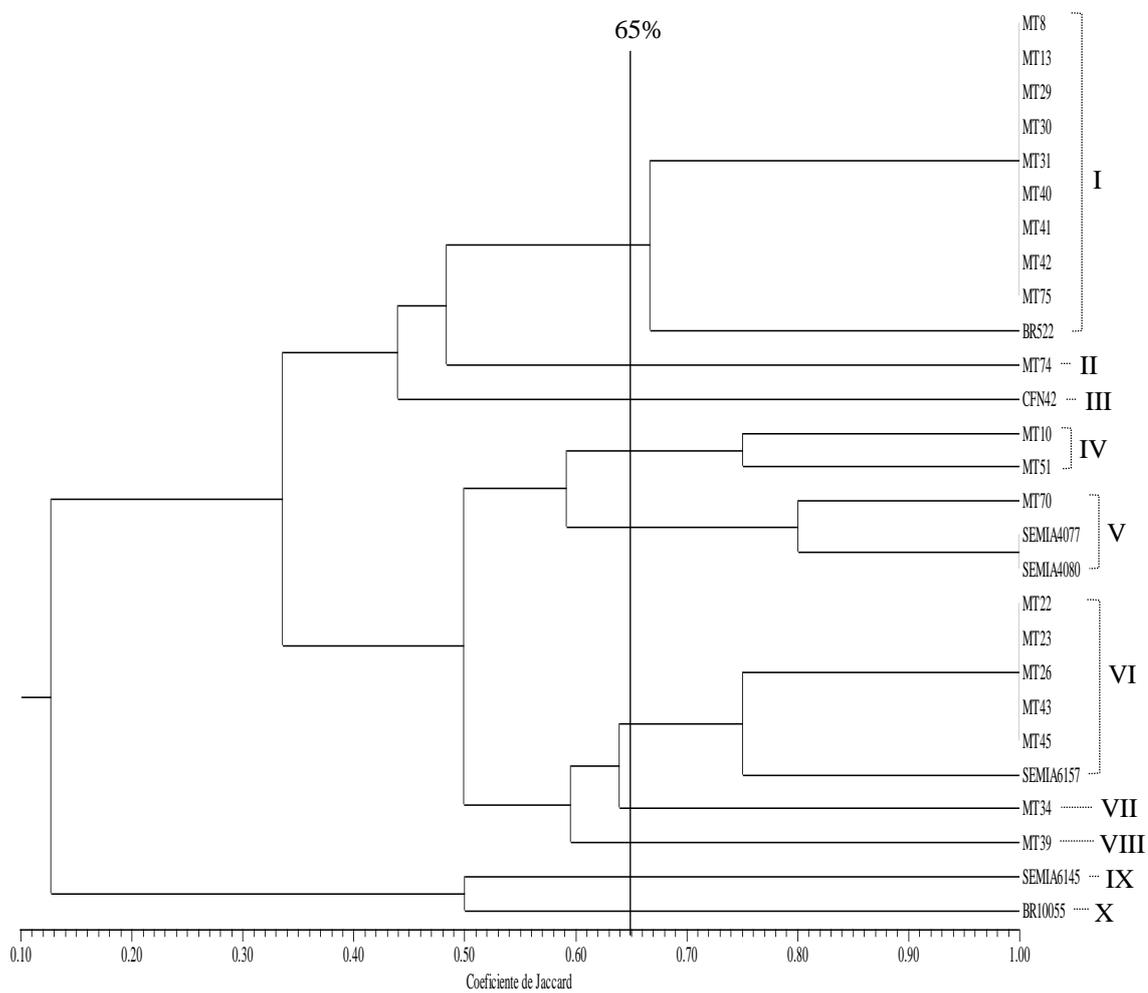


Figura 15: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados da região REP por PCR de 20 bactérias isoladas de milho e oito de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).

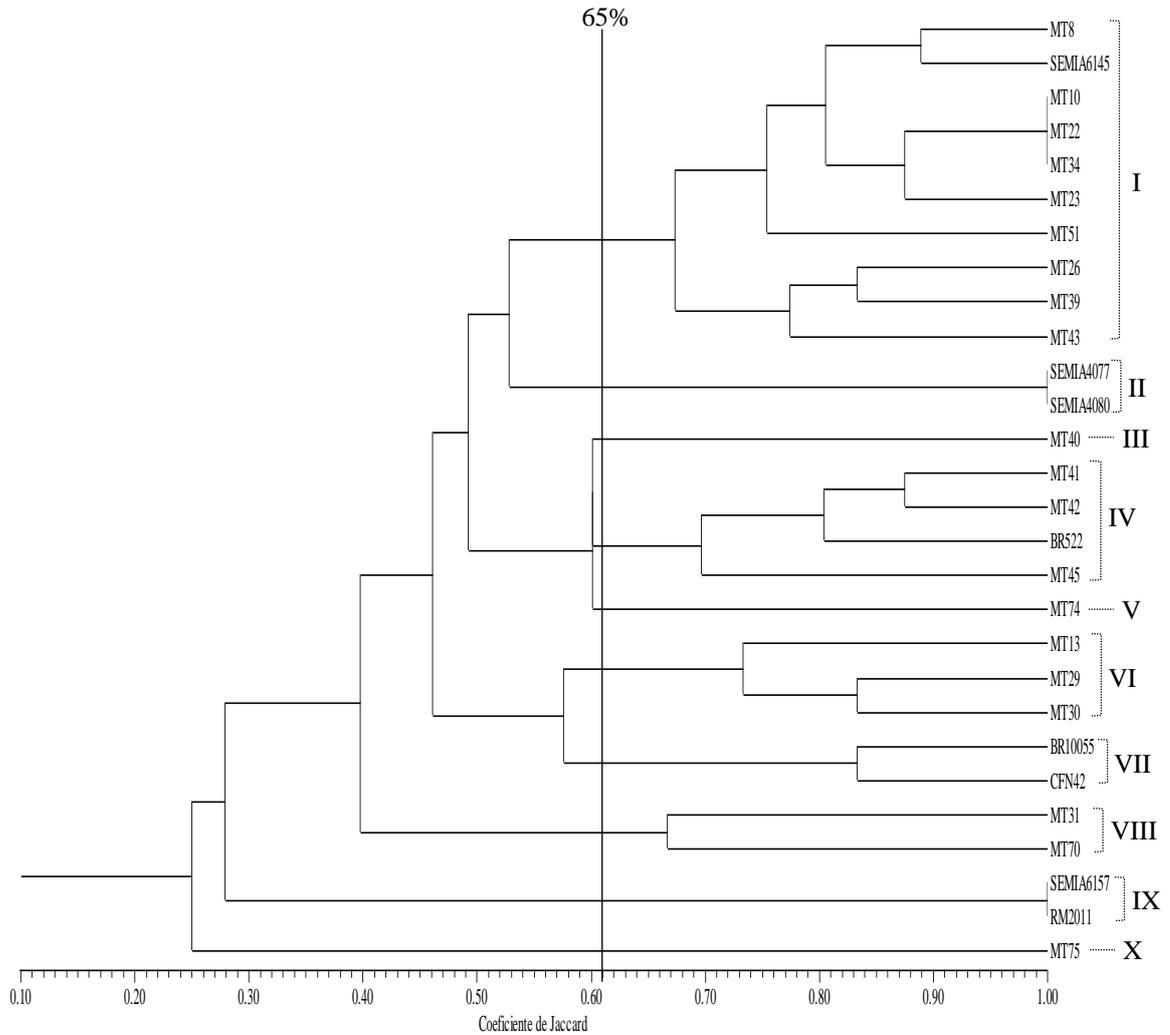


Figura 16: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados por PCR da região *atpD* de 20 bactérias isoladas de milho e nove de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. leguminosarum* (SEMIA3012); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).

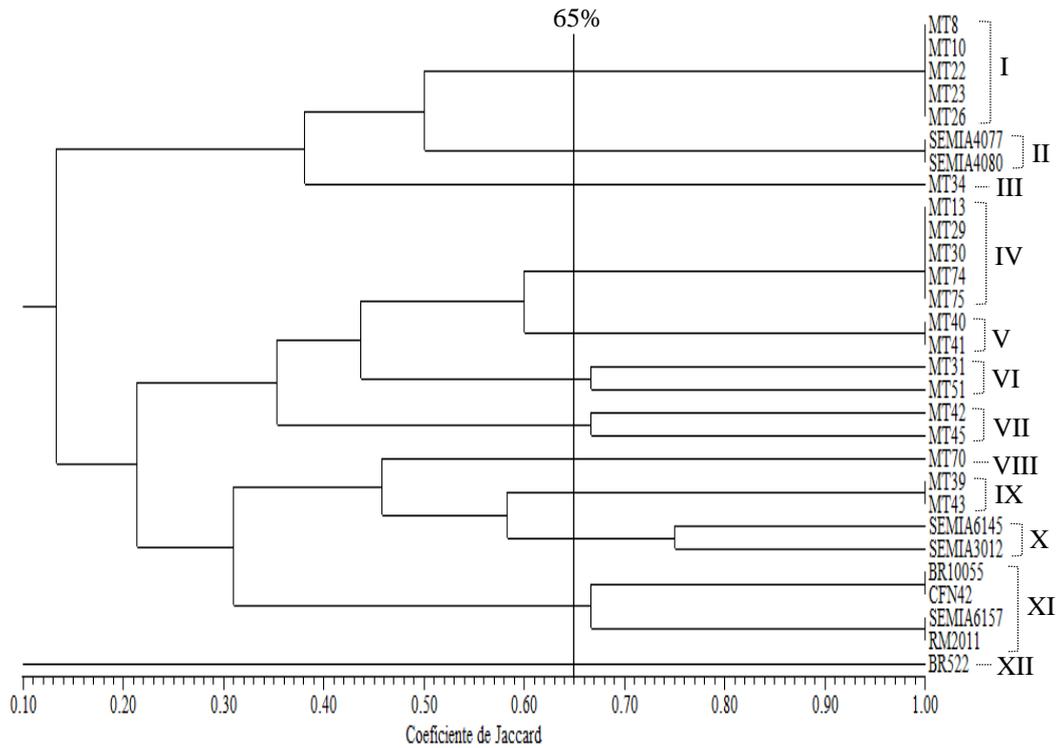


Figura 17: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos amplificados por PCR da região *glnII* de 20 bactérias isoladas de milho e oito de referência - *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).

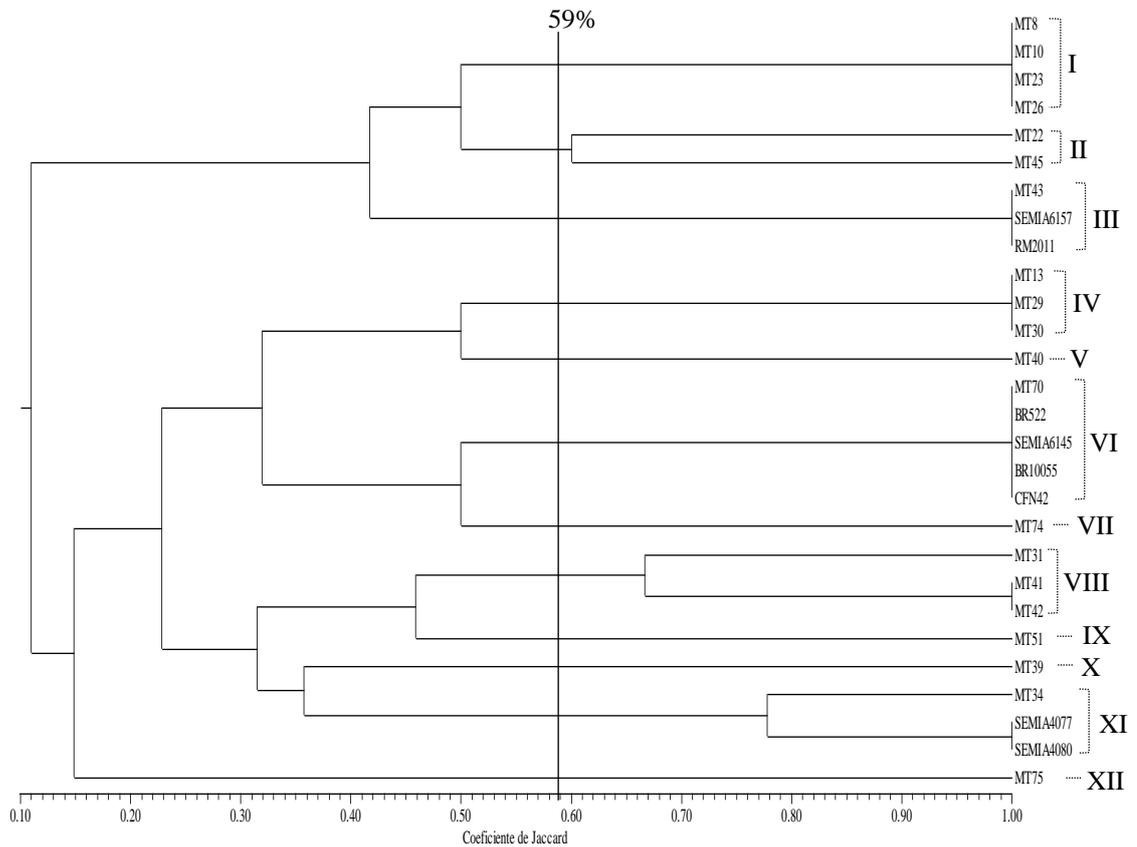


Figura 18: Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard com base nos fragmentos gerados pela análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) de 20 bactérias isoladas de milho e nove de referência - *Bradyrhizobium elkanei* (SEMIA6156); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *B. sp.* (SEMIA6157); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).

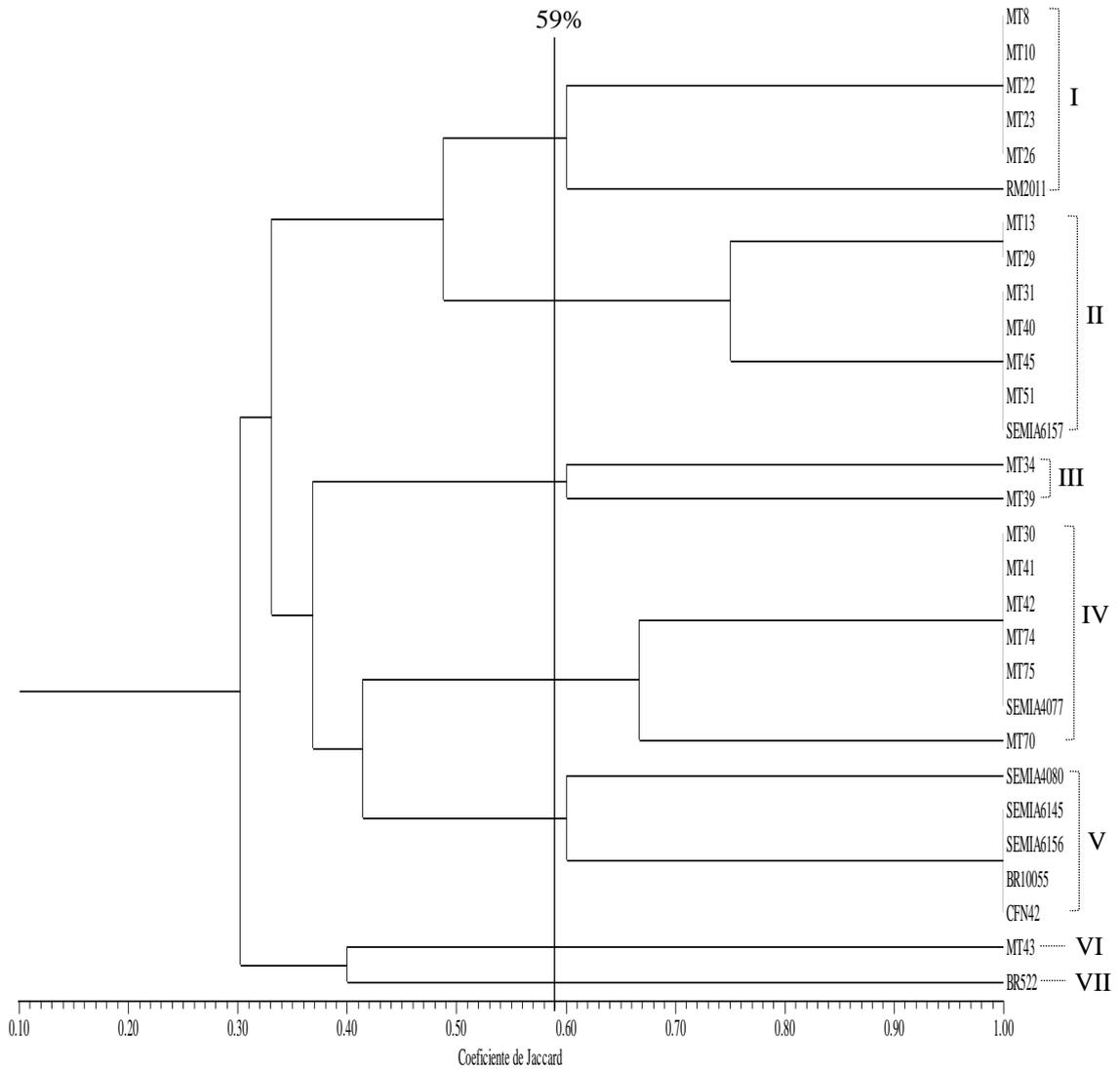


Tabela 8: Análise dos fragmentos gerados pela reação de PCR da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA de 20 bactérias isoladas de milho e sete de referência.

Bactérias	Número de Bandas	Tamanho das Bandas (pb)	Perfil
MT8	2	930; 1.044	A
MT10	3	792; 959; 1.047	B
MT13	2	980; 1.173	A
MT22	3	741; 875; 939	C
MT23	3	729; 880; 946	C
MT26	3	729; 875; 939	C
MT29	2	923; 1.051	A
MT30	2	959; 1.080	A
MT31	2	930; 1.033	A
MT34	2	741; 875	D
MT39	2	756; 909	E
MT40	2	915; 1.023	A
MT41	2	979; 1.200	A
MT42	2	990; 1.200	A
MT43	2	990; 1.200	C
MT45	3	729; 876; 958	C
MT51	4	361; 625; 907; 1.145	F
MT70	4	734; 977; 1.167; 1.640	G
MT74	1	994	H
MT75	2	946; 1.057	A
SEMIA4077	5	713; 872; 966; 1.060; 2.150	I
SEMIA4080	5	713; 872; 972; 1.080; 2.246	I
BR522	3	814; 966; 1.130	J
SEMIA6145	2	1.006; 1.847	K
BR10055	1	1.656	L
CFN42	1	1.006	M

Bactérias	Número de Bandas	Tamanho das Bandas (pb)	Perfil
SEMIA6157	4	705; 862; 955; 1.046	N

Intervalos utilizados para separação das bandas baseados em seus tamanhos: >500; 500-799; 800-899; 900-999; 1.000-1.499;<1.500.

Bactérias de referência: *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).

Tabela 9: Análise dos fragmentos gerados pela reação de PCR da região REP de 20 bactérias isoladas de milho e oito de referência.

Bactérias	Número de Bandas	Tamanho das Bandas (pb)	Perfil
MT8	8	459; 782; 989; 1.287; 1.486; 1.725; 2.319; 2.672	A
MT10	8	444; 774; 1.004; 1.336; 1.790; 2.206; 2.667; 3.347	B
MT13	4	757; 982; 1.267; 2.945	C
MT22	8	454; 777; 1.045; 1.365; 1.770; 2.084; 2.667; 3.550	B
MT23	7	470; 757; 1.019; 1.442; 1.901; 2.556; 3.566	D
MT26	6	445; 769; 1.042; 1.329; 1.758; 2.345	E
MT29	6	760; 978; 1.098; 1.302; 2.123; 2.973	F
MT30	5	726; 942; 1.240; 2.436; 2.836	G
MT31	4	828; 1.431; 2.408; 5.378	H
MT34	8	410; 731; 1.005; 1.320; 1.683; 2.309; 2.733; 5.103	B
MT39	5	482; 1.047; 1.424; 1.851; 2.187	I
MT40	4	811; 1.422; 2.001; 2.517	J
MT41	7	729; 844; 1.457; 1.760; 2.146; 2.720; 4.571	K
MT42	8	732; 841; 1.273; 1.445; 1.741; 2.081; 2.503; 4.493	L
MT43	6	479; 1.118; 1.341; 1.674; 2.050; 2.519	M
MT45	6	969; 1.192; 1.389; 1.695; 2.259; 2.650	N
MT51	6	492; 734; 1.249; 1.394; 1.575; 2.466	O
MT70	6	342; 907; 1.231; 1.491; 2.345; 4.651	P
MT74	4	1.350; 1.739; 2.311; 2.804	Q
MT75	2	1.247; 2.839	R
SEMIA4077	4	506; 1.087; 1.430; 1.846	S
SEMIA4080	4	518; 1.094; 1.467; 1.909	S
BR522	6	956; 1.359; 1.799; 2.065; 2.813; 4.037	T
SEMIA6145	9	248; 632; 821; 1.101; 1.316; 1.861; 2.002; 2.849; 4.920	U
BR10055	6	623; 1.111; 1.394; 2.203; 2.868; 5.256	V
CFN42	5	632; 1.111; 2.275; 2.943; 5.432	W

Bactérias	Número de Bandas	Tamanho das Bandas (pb)	Perfil
SEMIA6157	3	1.155; 1.925; 3.000	X
RM2011	3	1.155; 1.958; 3.367	X

Intervalos utilizados para separação das bandas baseados em seus tamanhos: >500; 500-799; 800-999; 1.000-1.299; 1.300-1.499; 1.500-1.999; 2.000-2.499; 2.500-2.999; <3.000.

Bactérias de referência: *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).

Tabela 10: Análise dos fragmentos gerados pela reação de PCR da região *atpD* de 20 bactérias isoladas de milho e nove de referência.

Bactérias	Número de Bandas	Tamanho das Bandas (pb)	Perfil
MT8	2	156; 304	A
MT10	2	166; 309	A
MT13	4	257; 522; 656; 1.403	B
MT22	2	197; 321	A
MT23	2	197; 316	A
MT26	2	197; 316	A
MT29	4	255; 509; 648; 1.411	B
MT30	4	257; 512; 648; 1.411	B
MT31	6	161; 264; 414; 622; 741; 1.395	C
MT34	2	206; 338	D
MT39	2	333; 520	E
MT40	7	149; 240; 376; 523; 601; 701; 1.358	F
MT41	7	157; 238; 392; 545; 611; 715; 1.383	F
MT42	2	155; 255	G
MT43	2	333; 554	E
MT45	3	181; 261; 506	H
MT51	4	198; 270; 476; 1.324	I
MT70	2	526; 1.084	J
MT74	4	278; 545; 672; 1.480	K
MT75	4	284; 560; 688; 1.498	B
SEMIA4077	1	335	L
SEMIA4080	1	330	L
BR522	1	691	M
SEMIA6145	4	333; 401; 538; 1.584	N
SEMIA3012	3	333; 523; 1.604	E
BR10055	2	400; 551	O

Bactérias	Número de Bandas	Tamanho das Bandas (pb)	Perfil
CFN42	2	425; 560	O
SEMIA6157	3	400; 590; 766	P
RM2011	3	417; 597; 792	P

Intervalos utilizados para separação das bandas baseados em seus tamanhos: 100-199; 200-299; 300-399; 400-499; 500-599; 600-699; 700-799; <800.

Bactérias de referência: *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. leguminosarum* (SEMIA3012); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).

Tabela 11: Análise dos fragmentos gerados pela reação de PCR da região *glnII* de 20 bactérias isoladas de milho e oito de referência.

Bactérias	Número de Bandas	Tamanho das Bandas (pb)	Perfil
MT8	2	202; 343	A
MT10	2	214; 355	A
MT13	3	115; 487; 610	B
MT22	4	225; 343; 696; 1120	C
MT23	2	237; 343	A
MT26	2	242; 350	A
MT29	3	112; 482; 603	B
MT30	3	114; 487; 600	B
MT31	5	114; 278; 363; 520; 614; 1962	D
MT34	8	166; 293; 448; 635; 1029; 1207; 1561; 1907	E
MT39	6	363; 405; 501; 629; 700; 1138	F
MT40	3	432; 644; 700	G
MT41	4	125; 530; 617; 1996	H
MT42	4	114; 537; 617; 2008	H
MT43	1	304	I
MT45	4	229; 376; 495; 648	J
MT51	7	125; 219; 302; 562; 654; 956; 1271	K
MT70	1	684	L
MT74	2	517; 635	M
MT75	2	404; 587	N
SEMIA4077	8	216; 328; 402; 669; 1187; 1458; 1811; 2042	O
SEMIA4080	8	214; 327; 400; 696; 1192; 1462; 1823; 2039	O
BR522	1	696	L
SEMIA6145	1	696	L
BR10055	1	645	L
CFN42	1	663	L

Bactérias	Número de Bandas	Tamanho das Bandas (pb)	Perfil
SEMIA6157	1	326	
RM2011	1	337	

Intervalos utilizados para separação das bandas baseados em seus tamanhos: 100-199; 200-299; 300-399; 400-499; 500-599; 600-699; 700-999; 1.000-1.199; 1.200-1.499; 1.500-1.899; <1.900.

Bactérias de referência: *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).

Tabela 12: Fragmentos gerados pela análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) de 20 bactérias isoladas de milho e nove de referência.

Bactérias	Número de Bandas	Tamanho das Bandas (pb)	Perfil
MT8	3	210; 250; 367	A
MT10	3	210; 250; 367	A
MT13	4	228; 360; 495; 839	B
MT22	3	207; 250; 367	A
MT23	3	210; 250; 367	A
MT26	3	214; 258; 367	A
MT29	4	228; 354; 493; 836	B
MT30	3	183; 313; 438	C
MT31	3	217; 354; 482	D
MT34	5	195; 251; 350; 530; 702	E
MT39	3	185; 251; 350	F
MT40	3	212; 341; 478	D
MT41	3	187; 311; 431	C
MT42	3	185; 317; 441	C
MT43	4	130; 168; 211; 311	G
MT45	3	203; 330; 456	D
MT51	3	202; 323; 459	D
MT70	2	168; 482	H
MT74	3	191; 304; 447	C
MT75	3	187; 317; 441	C
SEMIA4077	3	195; 309; 457	C
SEMIA4080	4	138; 193; 267; 482	I
BR522	3	172; 216; 687	J
SEMIA6145	3	165; 217; 257; 451	K
SEMIA6156	4	163; 222; 259; 451	K
BR10055	4	171; 217; 264; 459	K

Bactérias	Número de Bandas	Tamanho das Bandas (pb)	Perfil
CFN42	4	171; 212; 266; 464	K
SEMIA6157	3	200; 311; 457	D
RM2011	5	217; 290; 433; 483; 558	L

Intervalos utilizados para separação das bandas baseados em seus tamanhos: >149; 150-199; 200-249; 250-299; 300-429; 430-499; 500-699; <700.

Bactérias de referência: *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *B. elkanii* (SEMIA6156); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).

Tabela 13: Valores da absorbância em espectrofotômetro (DO) nos comprimentos de onda 300, 350 e 400 nm, do sobrenadante obtido com o cultivo de bactérias por 120h em caldo batata com L-triptofano 0,25 g.L⁻¹ e sulfato de cobre 0,008 g.L⁻¹, sob agitação (140 rpm) no escuro.

Bactérias	DO₃₀₀	DO₃₅₀	DO₄₀₀
MT8	0,00	0,00	0,00
MT10	0,32	0,00	0,32
MT13	0,00	0,00	0,00
MT22	0,11	0,15	0,11
MT23	0,06	0,10	0,06
MT26	0,22	0,22	0,22
MT29	0,20	0,16	0,20
MT30	0,22	0,50	0,22
MT31	0,15	0,41	0,15
MT34	0,27	0,33	0,27
MT39	0,10	0,22	0,10
MT40	0,12	0,17	0,12
MT41	0,03	0,03	0,03
MT42	0,03	0,05	0,03
MT43	0,24	0,28	0,24
MT45	0,81	0,84	0,81
MT51	0,21	0,31	0,21
MT70	0,15	0,40	0,15
MT74	0,20	0,29	0,20
MT75	0,22	0,30	0,22
SEMIA4077	0,46	0,57	0,46
SEMIA4080	0,08	0,15	0,08
BR522	0,12	0,41	0,12
SEMIA6145	0,25	0,27	0,25
SEMIA3012	0,00	0,00	0,00

Bactérias	DO₃₀₀	DO₃₅₀	DO₄₀₀
BR10055	0,04	0,08	0,04
CFN42	0,08	0,27	0,08
SEMIA6157	0,16	0,34	0,16
RM2011	0,18	0,21	0,18

Bactérias de referência: *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA6157); *Mesorhizobium mediterraneum* (BR522); *Rhizobium etli* (CFN42); *R. galegae* (BR10055); *R. leguminosarum* (SEMIA3012); *R. meliloti* (RM2011); *R. sp.* (SEMIA6145); *R. tropici* (SEMIA4077); *R. tropici* (SEMIA4080).