

BC/32533
IB/80538



UNICAMP

T/UNICAMP

F218_d

FABIANA FANTINATTI

**Diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas
da rizosfera de culturas agrícolas**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Fabiana Fantinatti
e aprovada pela Comissão Julgadora.

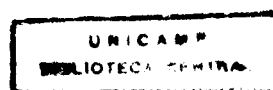
23/10/97 *Fabiane*

Tese apresentada ao Departamento
de Genética e Evolução do
Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do
título de Doutor em Ciências
Biológicas.

Orientador: **Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira**

CAMPINAS

1997



UNIDADE	I R
N.º CHAMADA:	711W CAMP
	F0180
V	8
N.º S	32533
DATA	30/01/88
C	D
PRECO	28711.00
DATA	13/02/88
N.º CPD	

G. N. CC204663-0

LOCAL E DATA: Campinas, 23 de Outubro de 1997

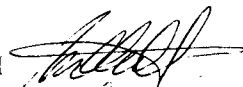
BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

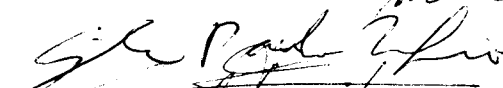
Prof. Dr. WANDERLEY DIAS DA SILVEIRA (Orientador)



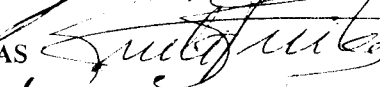
Profa. Dra. MARIA LUIZA CONOGNESI DE OLIVEIRA LOMBARDI



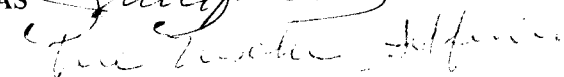
Prof. Dr. GILSON PAULO MANFIO



Profa. Dra. SUELI DOS SANTOS FREITAS



Profa. Dra. VERA NISAKA SOLFERINI



SUPLENTE:

Prof. Dr. ANTONIO FERNANDO PESTANA DE CASTRO



Profa. Dra. ADRIANA PARADA DA SILVEIRA

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Fantinatti, Fabiana

~~F219d~~ Diversidade de *Pseudomonas* sp. fluorescentes isoladas da rizosfera de culturas agrícolas/ Fabiana Fantinatti. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997. 122f.: ilus.

Orientador: Wanderley Dias da Silveira
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Diversidade. 2. Biologia molecular. 3. Identificação.
I. Silveira, Wanderley Dias da. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

*A minha mãe Maria Zélia,
pelo estímulo e carinho, dedico.*

Agradecimentos

Ao Dr. Wanderley Dias da Silveira, pela orientação e amizade de tantos anos.

Ao Klaus, pela compreensão, incentivo e carinho especial.

Aos amigos Cleide e André, pelos momentos compartilhados e pelo apoio nas horas difíceis.

As amigas, Silvana, Valéria e Lírian pelo carinho e momentos de diversão na etapa final deste trabalho.

Ao Gilson, grande amigo, agradeço às sugestões, empréstimo do laboratório, programas de computador e constante atenção.

Aos Profs. Tomomasa Yano, Domingos da Silva Leite e Sílvia Gatti do departamento de Microbiologia pelo incentivo constante e empréstimo dos laboratórios.

Aos Profs. Darwin Bassi, Mariko Ueno, José Carlos Cogo, Nádia Maria Rodrigues de Campos Velho, Liliana Auxiliadora Avelar Pereira Pasin, Frederico Lencione Neto, Alfredo Feres Neto, Adriane A. M. de Souza e Karla A. R. Lopes pelo apoio e compreensão nesta conquista.

Aos funcionários do departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial à Alessandra pela ajuda no dia a dia.

Aos amigos do laboratório, Sérgio, Marcelo Brocchi, Alessandra, Vanessa, Eunice, Marcelo Lancelotti, Marcos e Fabiane pela convivência agradável.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

A minha família, pelo apoio e compreensão desde o início.

À Universidade Estadual de Campinas.

À Universidade do Vale do Paraíba.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -
CNPq - pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

Sumário	i
Índice de Tabelas	iv
Índice de Figuras	v
Resumo	vii
Abstract	ix
1. Introdução.....	01
1.1 Supressão de doenças em plantas.....	02
1.1.1 Supressão mediada por sideróforos	02
1.1.2 Supressão mediada por agentes antimicrobianos.....	05
1.1.3 Outros fatores	06
1.2 Produção de substâncias promotoras de crescimento	08
1.3 Métodos tradicionais, moleculares e quimiotaxonômicos na	
identificação e tipagem de microrganismos.....	09
1.3.1 Análises de ácidos nucleicos	13
1.3.2 Análises de perfil de proteínas	20
1.3.3 Análise de atividade enzimática.....	22
2. Objetivos	25
3. Material e Métodos	26
3.1 Linhagens bacterianas.....	26
3.2 Meio de cultura e condições de cultivo	26
3.3 Extração e purificação do DNA genômico	28
3.4 Eletroforese de DNA em gel de agarose	29

3.5 Ribotipagem	30
3.5.1 Digestão com enzimas de restrição e “Southern blotting” de DNA	30
3.5.2 Hibridização com sonda marcada com digoxigenina	31
3.5.3 Detecção imunológica dos fragmentos marcados com digoxigenina	32
3.6 Amplificação de DNA por PCR (Reação em cadeia da polimerase)	33
3.6.1 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação do DNA	33
3.6.2 Reação do PCR	35
3.6.3 Purificação do rDNA 16S amplificado por PCR	36
3.7 Polimorfismo do rDNA 16S	37
3.8 Extração de proteínas totais	37
3.9 Extração de proteínas de membrana	38
3.10 Eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE	39
3.10.1 Montagem do gel SDS-PAGE	39
3.10.2 Impregnação dos géis de proteínas com prata	41
3.11 Eletroforese de Enzimas	43
3.11.1 Preparo dos extratos bacterianos	43
3.11.2 Eletroforese dos extratos bacterianos	43
3.11.3 Análise do perfil de mobilidade das enzimas	46
3.12 Comparação sorológica	46
3.12.1 Preparação do anti-soro	46

3.12.2 Reação com anti-soro polivalente	47
3.13 Produção de bacteriocina	47
3.14 Análise estatística para sorotipagem e produção de bacteriocina	48
4. Resultados	49
4.1 Análise da Ribotipagem.....	49
4.2 Análise do perfil de RAPD.....	51
4.3 Polimorfismo do rDNA 16S	55
4.4 Análise do perfil de proteínas totais.....	57
4.5 Análise do perfil das proteínas de membrana.....	61
4.6 Análise da distância genética pela mobilidade de enzimas.....	66
4.7 Sorotipagem	70
4.8 Produção de bacteriocina	73
5. Discussão	76
6. Conclusão	87
7. Referências Bibliográficas	89

Índice de Tabelas

Tabela I.	Métodos para determinação de informações taxonômicas	10
Tabela II.	Designação e origem das linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes	27
Tabela III.	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação de seqüências de DNA aleatórias e do gene rDNA 16S	34
Tabela IV.	Soluções para gel de SDS-PAGE	40
Tabela V.	Soluções para impregnação com prata	42
Tabela VI.	Soluções para coloração das enzimas	45
Tabela VII.	Perfil de alelos para 5 loci enzimáticos em 17 ETs de linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes.....	67
Tabela VIII.	Frequência de alelomorfos para os locus enzimáticos nas linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes.....	68
Tabela IX.	Aglutinação com anti-soros polivalentes.....	71
Tabela X.	Produção de bacteriocinas pelas linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes em meio B de King	74

Índice de Figuras

Figura 1. Análise da ribotipagem das linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes digeridas com enzima de restrição <i>Pvu</i> II e hibridizadas com sonda contendo operon rDNA de <i>Streptomyces violaceoruber</i>	50
Figura 2. Perfil de fragmentos de RAPD de linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes amplificadas com o oligonucleotídeo OPR 2.....	53
Figura 3. Perfil de fragmentos de RAPD de linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes amplificadas com os oligonucleotídeos OPR 8 (canaletas 1 a 4) e OPR 13 (canaletas 7 a 10).....	54
Figura 4. Perfil de fragmentos de RFLP obtidos do rDNA 16S das linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes amplificadas por PCR e digeridas com as enzimas de restrição	56
Figura 5. Perfil eletroforético de proteínas totais das linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de plantas de algodão e milho	58
Figura 6. Perfil eletroforético de proteínas totais das linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de plantas de milho e soja.....	59
Figura 7. Dendrograma representando a relação entre as linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes baseado no perfil de proteínas totais em SDS-PAGE (12,5 %).....	60

Figura 8. Perfil eletroforético de proteínas de membrana das linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de plantas de algodão e milho	63
Figura 9. Perfil eletroforético de proteínas de membrana das linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de plantas de milho e soja	64
Figura 10. Dendrograma representando a relação entre as linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes baseado no perfil de proteínas de membrana em SDS-PAGE (12,5 %).....	65
Figura 11. Dendrograma gerado pela matriz de distância genética entre pares de linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes a partir de perfis de mobilidade enzimática	69
Figura 12. Dendrograma representando a similaridade entre as linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes quanto a comparação sorológica.....	72
Figura 13. Dendrograma representando a similaridade entre as linhagens de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes quanto a produção de bacteriocina	75

Resumo

Vinte linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de diferentes culturas agrícolas (algodão, milho e soja) foram estudadas quanto à diversidade genética por análises fenotípicas e genotípicas. As linhagens foram caracterizadas por métodos tradicionais e moleculares, incluindo sorotipagem, produção de bacteriocina, isoenzimas, RAPD, polimorfismo do rDNA 16S e perfil de proteínas totais e de membrana.

Os resultados obtidos na ribotipagem indicaram 12 ribotipos diferentes para as linhagens estudadas. A diversidade do polimorfismo de restrição dos genes de rDNA 16s ocorreu entre linhagens isoladas de plantas diferentes na mesma cultura agrícola e também de culturas diferentes.

A análise do perfil de RAPD indicou que dois oligonucleotídeos utilizados nesta técnica, OPR 1 (TGCGGGTCCT) e OPR 7 (ACTGGCCTGA), amplificaram regiões do genoma comuns a todas as linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes associadas ao ambiente do sistema radicular. Os oligonucleotídeos OPR 2 (CACAGCTGCC), OPR 8 (CCCGTTGCCT) e OPR 13 (GGACGACAAG) permitiram a amplificação de regiões diversas do DNA demonstrando a diversidade genética das linhagens.

A digestão do rDNA 16S com as enzimas de restrição *EcoR* I e *Sma* I resultou em padrões semelhantes para as linhagens estudadas. Linhagens isoladas de culturas agrícolas diferentes, algodão (22Bbr) e milho (34B e 34Abr), apresentaram o mesmo padrão de restrição para as enzimas *EcoR* I, *Sma* I e *Hae* III. Estes resultados

podem ser explicados pelo alto grau de conservação dos genes ribossomais em nível de espécie.

As análises do perfis de proteínas totais e de membrana mostraram similaridade com as análises genotípicas derivadas da ribotipagem, RAPD e polimorfismo do rDNA 16S. As linhagens 23Agr, 23Als, 23BlS e 23Bpc apresentaram perfil de subunidades protéicas muito semelhante e foram agrupadas na análise numérica dos padrões de banda. Resultados semelhantes foram observados nas linhagens 22Bbr, 34B e 34Abr. Diversidade genética foi verificada entre linhagens isoladas na mesma cultura agrícola e de culturas agrícolas diferentes.

A sorotipagem realizada com os anti-soros polivalentes anti-21A, anti-22Bbr, anti-23C, anti-33 e anti-41C indicou que linhagens isoladas da mesma planta apresentaram variações no padrão de aglutinação. Entretanto, as linhagens 23Agr, 23Als, 23BlS e 23Bpc não mostraram diferenças no padrão de aglutinação e foram agrupadas no mesmo tipo eletroforético dado pelo perfil de mobilidade para enzimas α EST, β EST, IDH, ME e PGM, confirmando a semelhança fenotípica dessas linhagens. As demais linhagens apresentaram diversidade genética.

Os métodos utilizados indicaram a diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de culturas agrícolas, entretanto, os métodos de análise de ácidos nucleicos, como a ribotipagem e o RAPD, forneceram mais informações quando as linhagens foram obtidas da mesma planta, reforçando o uso de métodos moleculares na identificação de microrganismos associados as plantas, podendo auxiliar na escolha de linhagens para futuros estudos aplicados no melhoramento da produção de culturas agrícolas.

Abstract

Twenty fluorescent *Pseudomonas* spp. strains isolated from rhizosphere of different cultures (cotton, corn and soy) were studied regarding the genetic diversity through phenotypic and genotypic analysis. Strains were characterized by traditional and molecular methods, serotyping, bacteriocin production, isoenzymes, RAPD, 16S polymorphism and total and outer membrane proteins profiles analysis.

Results obtained from ribotyping indicate 12 different ribotypes for the strains studied. Diversity of restriction polymorphism of rDNA 16S genes occurred among strains isolated from different plants from the same culture and also from different agricultural cultures.

Analysis of RAPD profiles indicated that two oligonucleotides used with these methods, OPR1 (TGCGGGTCCT) and OPR7 (ACTGGCCTGA), have amplified the genomic regions common to all the fluorescent *Pseudomonas* spp. strains associated to the root system. Oligonucleotide OPR2 (CACAGCTGCC), OPR8 (CCCGTTGCCT) and OPR13 (GGACGACAAG) allowed amplification of DNA regions, showing genetical variability among the strains.

Digestion of rDNA 16s with restriction enzymes *EcoR* I and *Sma* I resulted in similar patterns among the studied strains. Isolated strains from different cultures, i. e. cotton (22Bbr) and corn (34B and 34Abr) presented the same restriction pattern for enzymes *EcoR* I, *Sma* I and *Hae* III. These results can be explained by the high degree of conservation of ribosomal genes in the species level.

The profile analysis of total and outer membrane proteins showed similarity with genotypic analysis studied by ribotyping, RAPDs and polymorphism of

rDNA 16S. Strains 23Agr, 23Als, 23BlS e 23Bpc presented very similar proteic subunits profiles and were grouped on the numerical of band patterns. Similar results were observed within strains 22Bbr, 34B and 34Abr. Diversity occurred among isolated strains from the same agricultural culture and among different plant cultures.

Serotyping performed with polyvalent antiserum anti-21A, anti-22Bbr, anti-23C, anti-33 and anti-41C indicated that isolated strains from the same plant presented variation in the agglutination pattern. However, strains 23Agr, 23Als, 23BlS and 23Bpc did not present differences regarding the agglutination pattern and were grouped in the same electrophoretic type given by mobility profile for enzymes α EST, β EST, IDH, ME and PGM, confirming the phenotypic similarity of those strains. The other strains presented genetical diversity.

The methods indicated the diversity of fluorescents *Pseudomonas* spp. isolates from agricultural cultures rizosphere. However, methods of nucleic acid analysis, like ribotyping and RAPD, issued more information when strains were obtained from the same plant, enhancing the use of molecular methods on the identification of microorganisms associated to plants, thus aiding on the choice of strains for further applied studies on agricultural production improvements

1. Introdução

Pseudomonas spp. fluorescentes pertencem a um grupo de bactérias que produzem um pigmento amarelo-esverdeado, fluorescente quando cultivadas em meio B de King (King *et al.*, 1954) e visualizadas sob luz com comprimento de onda na faixa do ultravioleta. Essas bactérias são, tipicamente, bastonetes gram-negativos, móveis, com flagelo polar, aeróbios obrigatórios e pertencem ao grupo I de homologia do rRNA, como definido por Palleroni *et al.* (1973). Esta classificação separa todas as *Pseudomonas* em cinco grupos de acordo com o grau de homologia de seus genes de rRNA 16S. O requerimento nutricional para o desenvolvimento desses microrganismos é bastante simples, permitindo a ocupação de vários habitats na natureza. Eles são encontrados em diferentes tipos de solos, folhagens, águas e sedimentos, e uma espécie típica do grupo, *Pseudomonas aeruginosa*, é considerada um patógeno oportunista em animais (Bodey *et al.*, 1983).

Embora algumas *Pseudomonas* fluorescentes, incluindo *Pseudomonas syringae* e *Pseudomonas viridiflava*, sejam fitopatogênicas, a importância do grupo é evidenciada pelo benefício que outras espécies, tais como *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens*, podem exercer no desenvolvimento da planta (O'Sullivan & O'Gara, 1992). Kloepper e Schroth (1978) utilizaram a expressão “rizobactérias promotoras do crescimento de plantas” (RPCPs) para designar a relação benéfica, sem simbiose, de bactérias nas raízes de plantas. As *Pseudomonas* fluorescentes pertencem ao grupo de microrganismos mais promissores, na promoção do crescimento de plantas (Schroth & Hancock, 1981; Burr & Caesar, 1984), pois sua colonização é rápida e agressiva, e conseqüentemente, pode ajudar no controle de doenças que atacam as

culturas agrícolas (Wilson & Lindow, 1993). Outras rizobactérias, incluindo *Agrobacterium* spp. (Kerr, 1972), *Alcaligenes* spp. (Yuen *et al.*, 1985), *Arthrobacter* spp. (Kloepper *et al.*, 1988), *Bacillus* spp. (Merriman *et al.*, 1974), *Rhizobium* spp. (Chakrabarty & Purkayastha, 1984), e *Serratia* spp. (Kloepper *et al.*, 1988) também podem promover o crescimento de plantas.

Inúmeros trabalhos publicados nos últimos anos mostram diversos mecanismos de ação das RPCPs, seja pela supressão de doenças e interferência na nutrição das plantas ou, ainda, pela produção de substâncias promotoras de crescimento. Algumas RPCPs utilizam mais de um mecanismo de ação e, muitas vezes, estes mecanismos não estão totalmente esclarecidos, pois o resultado depende da interação da bactéria com a planta em questão.

1.1 Supressão de Doenças em Plantas

1.1.1 Supressão Mediada por Sideróforos

A disponibilidade do íon ferro para o crescimento de microrganismos em alguns ambientes é extremamente limitada. Entretanto, todos os organismos vivos necessitam de íon ferro para seu desenvolvimento o que faz com que a sobrevivência em ambientes heterogêneos, como é o caso da rizosfera, dependa de uma estratégia para a captação de ferro (O'Sullivan & O'Gara, 1992). Em solução aquosa, o íon ferro pode estar nas formas de íon ferroso (Fe^{+2}) e/ou férrico (Fe^{+3}), sendo a última menos solúvel. Quando oxidado e em solos aerados, a forma predominante é a férrica, a qual pode atingir a concentração de 10^{-18} M. Esta concentração é limitante para o desenvolvimento de microrganismos, que geralmente necessitam de uma concentração de

aproximadamente 10^{-6} M para o crescimento normal. Conseqüentemente, para sobreviver em tais ambientes os microrganismos secretam sideróforos que se combinam com o ferro inorgânico e aumentam a sua solubilidade. Os sideróforos são peptídeos de baixo peso molecular, sintetizados quando as células bacterianas se encontram em ambientes com baixa concentração de íon ferro, possuem alta especificidade e estabilidade para o íon férrico e nenhuma afinidade para o íon ferroso, desempenhando a função de captação de íon ferro e transporte para o interior da célula bacteriana (Neilands, 1981).

A diversidade estrutural dos diferentes tipos de sideróforos é considerável, mas sua forma estável comum é constituída por seis complexos octaédricos coordenados com o íon férrico, o que mantém uma grande estabilidade termodinâmica (Raymond *et al.*, 1984). Os diferentes sideróforos apresentam o grupo hidroxamato ou catecolato para ligação ao íon férrico. Os complexos hidroxamatos são mais estáveis e, potencialmente, mais importantes na rizosfera (Neilands, 1981).

As *Pseudomonas* do solo produzem sideróforos amarelo-esverdeados, solúveis em água, denominados pioverdinas ou pseudobactinas. Análises dos sideróforos desses microrganismos indicaram diferenças na composição, número e configuração de aminoácidos nas cadeias polipeptídicas (Neilands, 1986).

Muitos trabalhos publicados na década de 70 indicavam a ligação entre a produção de sideróforos e a supressão de doenças em plantas. Kloepper *et al.* (1980) confirmaram esta tese, isolando o sideróforo fluorescente da linhagem B10 de *Pseudomonas* spp. e mostraram sua capacidade em inibir doenças em plantas. A importância da produção de sideróforos no estímulo do crescimento de plantas foi bem estabelecida com a obtenção, através de mutação com Tn-5, de mutantes incapazes de produzir sideróforos, os quais perderam a capacidade de promover o crescimento de plantas de tomate no campo (Bakker *et al.*, 1986).

A supressão de doenças mediada por sideróforos em *Pseudomonas* fluorescentes inicia-se com a secreção de peptídeos fluorescentes, os quais têm uma alta afinidade pelo íon férrico, quando a concentração deste íon é baixa no solo. O resultado é a formação de um complexo sideróforo-ferro que não pode ser absorvido pela maioria dos microrganismos, exceto, as *Pseudomonas* que podem reduzir o íon ferro no complexo sideróforo-ferro, através de reações enzimáticas, em receptores específicos localizados na membrana externa da célula (Buyer & Leong, 1986). Desse modo, *Pseudomonas* fluorescentes podem inibir o crescimento de outras bactérias e fungos nas raízes das plantas (Loper & Buyer, 1991), além de impedir a germinação de esporos de fungos (Sneh *et al.*, 1984; Elad & Baker, 1985).

Está claro que os sideróforos produzidos por rizobactérias ajudam na supressão de doenças causadas por outros microrganismos, mas a planta também necessita de íon ferro para seu desenvolvimento e a falta do mesmo no solo pode levar à clorose na planta (Julian *et al.*, 1983). Segundo Becker e Cook (1988), o sideróforo fluorescente produzido pela linhagem B10 de *Pseudomonas* spp. inibiu a captação de íon ferro em plantas de milho e ervilhas. Por outro lado, muitos trabalhos sugerem que algumas espécies de plantas conseguem obter o íon ferro diretamente dos sideróforos de microrganismos (Powell *et al.*, 1982; Duss *et al.*, 1986; Jurkevitch *et al.*, 1988). Também é possível que algumas plantas não consigam obter o íon ferro do complexo sideróforo-ferro. Nesse caso, as consequências não seriam grandes pois as plantas crescem, normalmente, em concentrações baixas de íon ferro, cerca de 10^{-9} M e, provavelmente, possuem mecanismos eficazes de obtenção e armazenamento desse micronutriente.

A produção de sideróforos por *Pseudomonas* fluorescentes é influenciada por uma variedade de fatores, tais como a concentração de íon ferro, a natureza e a concentração de fontes de carbono e nitrogênio, o nível de fosfatos, o pH e a luz, o grau

de aeração, a concentração de íons zinco e molibdênio e a temperatura (O'Sullivan & O'Gara, 1992). A variação desses fatores está também associada ao tipo de solo e, portanto, pode interferir na produção dos diversos tipos de sideróforos.

1.1.2 Supressão Mediada por Agentes Antimicrobianos

A produção de agentes antimicrobianos por *Pseudomonas* fluorescentes é um importante fator na supressão de muitas doenças em plantas. Uma variedade de antimicrobianos produzidos por essas bactérias (Howell & Stipanovic, 1980; Lindberg, 1981; Dahiya *et al.*, 1988; Thomashow & Weller, 1988; Keel *et al.*, 1990; Maurhofer *et al.*, 1992; Shanahan *et al.*, 1992; Mazzola, *et al.*, 1995) têm a capacidade de inibir o desenvolvimento de muitos fungos e bactérias sendo alguns destes de largo espectro e podem atuar também contra microrganismos benéficos (Lindberg, 1981).

Howell e Stipanovic (1980) verificaram que o antimicrobiano *pyoluteorin* produzido por *Pseudomonas fluorescens* foi bastante eficiente contra o apodrecimento do algodão provocado pelo fungo *Pythium ultimum*.

A ação de agentes antimicrobianos na supressão de doenças em plantas foi reforçada em estudos comparativos utilizando mutantes deficientes para a produção de antimicrobianos. Esses mutantes defectivos perderam a capacidade de inibir a ação específica de fungos patogênicos (Gutterson *et al.*, 1986; Gill & Warren, 1988).

Pseudomonas fluorescens é produtora do antimicrobiano ácido fenazina-1-carboxílico, que age diretamente no controle da doença “mal-do-pé” de trigo, causado por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Thomashow e Weller (1988) obtiveram um mutante defectivo para a produção desse composto e mostraram a perda da capacidade de inibição do desenvolvimento de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* reduzindo

grandemente a proteção do trigo contra a doença. A confirmação do envolvimento de agentes antimicrobianos no controle direto de doenças de raízes de plantas foi obtida pela detecção do antimicrobiano fenazina, na rizosfera de raízes de trigo colonizadas por *Pseudomonas fluorescens*, comparado com a não-produção do mesmo em raízes colonizadas por um mutante fenazina-negativo (Thomashow *et al.*, 1990).

A regulação na síntese dos antimicrobianos produzidos por *Pseudomonas* fluorescentes não está totalmente esclarecida. Entretanto, sabe-se que a produção de alguns antimicrobianos é influenciada por inúmeras condições fisiológicas. O'Sullivan e O'Gara (1992) verificaram que a produção do antimicrobiano 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) por *Pseudomonas* fluorescentes pode ser aumentada pelos açúcares frutose, manitol e sacarose, enquanto outros, tais como a glicose e sorbitol, diminuem sua produção.

1.1.3 Outros Fatores

Embora a produção de sideróforos e de antimicrobianos sejam os fatores mais estudados na supressão de doenças em plantas por *Pseudomonas*, outros mecanismos também podem proteger as raízes de inúmeras doenças causadas por fungos e bactérias. A produção de ácido cianídrico (HCN) por algumas *Pseudomonas* fluorescentes tem-se mostrado eficaz no controle de doenças das raízes de plantas. Voisard *et al.* (1989) verificaram que mutantes deficientes na produção de ácido cianídrico perderam a capacidade de supressão de doenças em tabaco. Outros trabalhos indicam que a produção de ácido cianídrico por algumas *Pseudomonas* fluorescentes é prejudicial ao crescimento da planta, resultando na diminuição da produção em tomates (Bakker & Schippers, 1987). Essas pesquisas mostram que o efeito do ácido cianídrico

nas plantas ainda não está claro e, possivelmente, tenha diferentes efeitos sobre diferentes tipos de plantas.

Os mecanismos de supressão de doenças por *Pseudomonas* mencionados até agora não teriam qualquer importância se estas bactérias não fossem capazes de colonizar a rizosfera. A competição por nutrientes varia com a rizosfera, dependendo da disponibilidade de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre e micronutrientes. A capacidade de utilizar um nutriente disponível na rizosfera pode ser uma vantagem competitiva (Wilson & Lindow, 1993). Nesse caso, a exclusão competitiva de organismos deletérios está diretamente relacionada à capacidade de colonização das raízes das plantas por *Pseudomonas*. Como já mencionado, os sideróforos das linhagens de *Pseudomonas* fluorescentes são associados ao sucesso na colonização da rizosfera deficiente em íon ferro.

A colonização da raiz depende de uma série de fatores, tais como: atividade de água, temperatura, pH, tipo de solo, composição do exudato das raízes, conteúdo mineral, e presença de outros microrganismos. Todos esses parâmetros têm sido estudados na colonização da rizosfera por *Pseudomonas*. Por exemplo, solo do tipo arenoso é significativamente melhor para a colonização de *Pseudomonas* fluorescentes em raízes de tomate comparada a solo argiloso (Bahme & Schroth 1987). Embora esses estudos indiquem que a textura do solo tem influência direta sobre a colonização por essas bactérias, outros fatores indiretos associados com cada tipo de solo podem resultar em diferenças na colonização. Conseqüentemente, é muito difícil determinar-se o tipo de solo ideal para a colonização de raízes por *Pseudomonas*. Os efeitos da temperatura (Loper *et al.*, 1985) e pH (Yuen & Schroth, 1986) também têm sido estudados, mas as dúvidas são equivalentes.

1.2 Produção de Substâncias Promotoras de Crescimento

A produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal tem sido considerada como um efeito benéfico das *Pseudomonas* fluorescentes sobre o desenvolvimento de plantas. Essas substâncias são hormônios para as plantas e são produzidas por microrganismos que habitam a rizosfera. Os gêneros *Azospirillum* e *Azotobacter* são os microrganismos mais estudados quanto aos seus efeitos no desenvolvimento de plantas, inclusive pela fixação do nitrogênio atmosférico. Verificou-se a produção de hormônios vegetais (auxinas, citocininas e giberelinas) pela bactéria *Azotobacter chroococcum*, estimulada pela presença de exudatos da raiz de milho (Martinez-Toledo *et al.*, 1988). A inoculação de plântulas de tomate com um mutante de *Azospirillum* não-fixador de nitrogênio resultou na promoção de crescimento, verificada pelo aumento da massa das folhas e da circunferência do caule, contribuindo para a confirmação da produção de hormônios de plantas por microrganismos (Bashan *et al.*, 1989).

Há poucos trabalhos considerando a produção de hormônios de plantas por *Pseudomonas* fluorescentes. Eklund (1970) estudando ação de *Pseudomonas* sobre sementes de abóbora, verificou o aumento no crescimento de plântulas, maior alongação do hipocótilo e maior área foliar e relacionou esses efeitos com a produção de giberelinas pela bactéria. As *Pseudomonas* produtoras de fitormônios parecem, também, aumentar a parte área de algumas plantas como a alfafa (Olsen & Misaghi, 1981).

Outra abordagem para as rizobactérias promotoras de crescimento em plantas é a possível regulação hormonal das plantas pelas bactérias, fato este até agora não comprovado. Entretanto, há indícios de que *Pseudomonas fluorescens* produz uma

transaminase que catalisa a conversão de L-triptofano em ácido indol-pirúvico, precursor do AIA (Frankenberger Jr. & Poth, 1988).

De maneira geral, os fatores que determinam as rizobactérias como promotoras de crescimento em plantas são a produção de sideróforos e a produção de agentes antimicrobianos. A produção de hormônios como fator importante na promoção do crescimento das plantas, não está esclarecida e requer mais estudos.

1.3 Métodos Tradicionais, Moleculares e Quimiotaxonômicos na Identificação e Tipagem de Microrganismos

Os fatores discutidos até o momento reforçam o uso das *Pseudomonas* fluorescentes em um programa de controle agrícola direcionado, onde essas bactérias poderiam ser utilizadas como hospedeiras de genes para o aumento na produção de culturas agrícolas. Todavia, é necessária a compreensão da estrutura e diversidade da população de *Pseudomonas* fluorescentes, principalmente no que se refere a sua especificidade e adaptação às plantas hospedeiras, o que pode ser o resultado da plasticidade fenotípica, diversidade genética ou da combinação de ambas. A diversidade fenotípica e genotípica são critérios comumente usados para agrupar isolados dentro de vários táxons de microrganismos.

A análise de diferentes componentes celulares resultantes da atividade de enzimas e expressão gênica pode fornecer informações taxômicas a respeito da identidade de um organismo (tabela I). Antigamente, a classificação e identificação de microrganismos era baseada em métodos taxômicos tradicionais que utilizavam basicamente características fenotípicas, tais como coloração, morfologia, motilidade, requerimentos nutricionais, produção de ácidos, pigmentação e formação de esporos.

Estas características são, até hoje, utilizadas na classificação e identificação de grupos importantes de microrganismos, como as Enterobacteriaceae. A taxonomia moderna utiliza métodos moleculares baseados em estudos de hibridização e sequenciamento de ácidos nucleicos para classificação e identificação de microrganismos e revisão das relações entre os diferentes grupos.

Tabela I. Métodos para determinação de informações taxonômicas.

Material básico para análise	Metodologia
DNA	Determinação da %CG
	Homologia DNA-DNA
	Análises de RFLP e AFLP
	Sequenciamento do rDNA
	Ribotipagem
rRNA	Sequenciamento do rRNA
Proteínas	Padrão de proteínas totais
	Análises de proteínas ribossomais
Enzimas	Testes enzimáticos
	Isoenzimas
Componentes celulares	Análises de ácidos graxos, quinonas e lipídeos
Célula inteira	Morfologia
	Estrutura celular
	Ciclo de vida

Embora a definição de espécies seja o propósito principal da classificação dos organismos, a separação e o reconhecimento de diferentes tipos dentro da espécie têm assumido grande importância em vários ramos da microbiologia. De fato, em muitos casos, o controle de doenças em uma comunidade não é possível sem o uso de métodos de caracterização intra-específica para ajudar na definição das fontes de infecção, mecanismos de transmissão, diversidade de patógenos e extensão da infecção em uma população susceptível. Outras áreas, nas quais a caracterização intra-específica é importante incluem estudos ecológicos envolvendo a introdução e monitoramento de novos microrganismos em habitats naturais, busca de microrganismos para seleção de novos produtos microbiológicos e controle biológico (Towner & Cockayne, 1993).

Segundo Hawkey (1989), o método de identificação ideal deve diferenciar a maioria das linhagens estudadas, ser capaz de reconhecer um número razoável de tipos, ser aplicável para isolados naturais, ser reproduzível por um longo período de tempo e em diferentes locais, além de não ser complicado e caro.

Freqüentemente, a caracterização inicial de uma linhagem é obtida pela análise de características morfológicas e bioquímicas e comparação dos resultados com chaves de identificação e descrições taxônomicas disponíveis na literatura. Tais características podem incluir morfologia da colônia, requerimentos nutricionais, capacidade de fermentação, utilização de fontes de carbono e resistência a drogas antimicrobianas. Essas características são, aparentemente, fáceis de se determinar; entretanto, cada uma delas apresenta suas peculiaridades. Diferenças na morfologia da colônia são muitas vezes sutis e podem ser subjetivas. Reações bioquímicas também apresentam dificuldades na interpretação de resultados, embora muitos “kits” comerciais de identificação produzam resultados satisfatórios para algumas espécies, tais como *Enterobacter cloacae* (Kühn *et al.*, 1991). A resistência a drogas antimicrobianas pode estar associada a plasmídios R instáveis e, portanto, a reprodução dos resultados é

freqüentemente alterada. Em geral, essas características podem auxiliar na identificação de espécies em investigações rotineiras, mas para estudos epidemiológicos e ecológicos métodos mais seguros devem ser utilizados.

A sorotipagem é um dos mais antigos procedimentos para identificação de microrganismos e, quando utilizado com outros métodos, pode apresentar resultados satisfatórios para muitas espécies, tais como *Acinetobacter* spp. (Traub, 1989), *Campylobacter* spp. (Mills *et al.*, 1991), *Neisseria gonorrhoeae* (Moyses & Young, 1991) e *Pseudomonas aeruginosa* (Burke *et al.*, 1990), entre outras. Esse método é baseado em reações com anti-soro específico obtido a partir de um antígeno comum em cada grupo. Desenvolvido, detalhadamente, para Enterobacteriaceae (Ewing, 1986), também foi usado para identificação de *Pseudomonas aeruginosa* (Lányi & Bergan, 1978). A vantagem no uso dessa metodologia é a sua utilização em diferentes gêneros de microrganismos, mas o desenvolvimento da técnica para uma aplicação inicial depende de tempo para a purificação do antígeno, imunização de animais e testes de aglutinação.

Bacteriocinas são substâncias bactericidas, normalmente proteínas, as quais são ativas contra diferentes grupos de bactérias. A produção de bacteriocina pode ser utilizada para testar a sensibilidade de uma linhagem contra uma produtora padrão ou testar se a linhagem em questão é produtora ou não. Esse método tem sido particularmente aplicado na caracterização de *Pseudomonas* (Govan & Harris, 1985) e membros da família Enterobacteriaceae (Gillies, 1978), entre outros grupos. Embora a sensibilidade ou a produção de bacteriocinas sejam características relativamente estáveis, essas proteínas são muitas vezes codificadas por plasmídios e podem produzir resultados alterados durante a identificação da linhagem.

Os métodos convencionais para identificação de microrganismos têm importância e aplicação para diversos grupos. Entretanto, as comparações moleculares e quimiotaxonômicas, as quais analisam diretamente o material genético ou produtos de

expressão gênica (tabela I) trazem resultados mais confiáveis para estudos da diversidade de muitas espécies, podendo detectar variabilidade entre diferentes isolados de uma mesma espécie.

As metodologias moleculares e quimiotaxonômicas para a identificação e tipagem de microrganismos utilizam informações derivadas principalmente de ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos, cujas seqüências ou composição permitem uma análise simples e uniforme para estudar a diversidade microbiana e o desenvolvimento de métodos de identificação. Historicamente, métodos utilizados para isolar e caracterizar macromoléculas envolviam técnicas complexas, demoradas e caras e, portanto, não eram comuns na rotina de laboratórios de microbiologia. Atualmente, essas técnicas tornaram-se mais simples e rápidas, permitindo o uso por muitos microbiologistas, seja para estudos epidemiológicos ou para o estudo da diversidade genética.

1.3.1 Análises de Ácidos Nucléicos

A análise do material genético de um microrganismo oferece maior vantagem para a identificação e tipagem pois não está sujeita a variações fenotípicas. Na maioria dos microrganismos, o material genético consiste de um DNA de fita dupla, com seqüência específica de pares de bases que armazenam informação. Além dessa molécula hereditária, os microrganismos podem apresentar plasmídios, que são elementos genéticos autônomos, com replicação independentemente do cromossomo bacteriano. Plasmídios freqüentemente codificam propriedades adicionais à célula, tais como resistência a drogas antimicrobianas e atividades metabólicas, são constituídos de DNA de fita dupla, circulares e covalentemente fechados.

Os plasmídios são isolados por uma variedade de métodos rápidos e simples, descritos de acordo com gênero bacteriano (Birnboim & Doly, 1979; Kado & Liu, 1981; Wilson *et al.*, 1978; Steinberg *et al.*, 1987), e analisados por eletroforese em gel de agarose. O análise do perfil plasmidial pode resultar em vários problemas, entre eles o número de bandas plasmidiais. Um único plasmídio pode apresentar três bandas diferentes, que correspondem a formas moleculares distintas, a circular covalentemente fechada (CCC), a circular aberta (OC) e a linear. Outras complicações são a contaminação com o DNA cromossomal durante a extração, os plasmídios de alto peso molecular de difícil purificação, os plasmídios com baixo número de cópias de difícil visualização e os plasmídios de baixo peso molecular que, normalmente, migram no gel próximo ao RNA (Towner & Cockayne, 1993). Os métodos de análise de tamanho e estrutura das moléculas de ácidos nucleicos, tanto plasmídios quanto cromossomos, não podem ser usados diretamente para uma identificação taxonômica de um microrganismo em particular, mas ajudam em diagnósticos laboratoriais na tipagem de alguns gêneros de bactérias. Estudos com salmonelas indicam que o padrão plasmidial é estável entre os isolados de casos de infecção em determinadas regiões (Threlfall *et al.*, 1986). Considerando as limitações descritas, a análise do perfil plasmidial tem sido usada para a investigação e tipagem de vários grupos de microrganismos, entre eles, os gêneros *Pseudomonas* (John & Twitty, 1986; Poh *et al.*, 1988) e *Rhizobium* (Hartmann & Amarger, 1991).

Embora a análise do perfil plasmidial seja um método rápido e simples na tipagem de alguns microrganismos, ela não pode ser aplicada em linhagens que não possuem plasmídios e, também, acarretam problemas quando eliminados ou adquiridos por bactérias hospedeiras. Assim, a análise do DNA cromossomal pode ser uma alternativa na solução desses problemas. Entretanto, os métodos convencionais de eletroforese em gel de agarose não permitem a separação de DNA cromossomal devido

ao seu tamanho. Entretanto, a digestão do DNA cromossomal com enzimas de restrição, resulta em fragmentos de DNA que podem ser analisados pelos métodos convencionais de eletroforese, permitindo a identificação de diferenças mínimas entre os microrganismos estudados.

Em geral, a digestão com enzimas de restrição pode resultar em muitos fragmentos, dificultando a distinção de bandas individuais, ou em poucos fragmentos de maior tamanho, que não são possíveis de análise em eletroforeses convencionais. O sucesso para a utilização desse método depende da seleção de uma enzima de restrição apropriada para o grupo de microrganismos analisados e o método de determinação de similaridade dos fragmentos obtidos (Forbes *et al.*, 1991).

A identificação de microrganismos em diagnósticos laboratoriais, normalmente, é feita pela comparação visual dos padrões de bandas com tamanhos moleculares diferentes (*fingerprints*), obtidos após a digestão com enzimas de restrição, visando a análise de semelhanças e diferenças entre as linhagens estudadas. Vários grupos de microrganismos foram analisados por esse método nos últimos anos (Mielenz *et al.*, 1979; Loutit & Tompkins, 1991; Wilson *et al.*, 1992; Bingen *et al.*, 1992).

Nociari *et al.* (1996) estudaram a diversidade genotípica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando a comparação visual dos padrões de bandas de restrição para as enzimas *Pvu* II, *Hind* III, *Eco*R I e *Bam*H I. A análise do perfil de restrição mostrou bandas fortes e fracas que puderam ser reproduzidas e, portanto, utilizadas para a comparação entre os isolados, quando os DNA foram digeridos com as enzimas *Pvu* II, *Hind* III e *Bam*H I. O perfil de restrição obtido para a enzima *Eco*R I não pode ser reproduzido e, portanto, não foi utilizado para a análise. Finalmente, os resultados mostraram que diferentes perfis de restrição para uma única banda representaram isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de diferentes genótipos.

Kondrateva (1992) analisou o grau de similaridade entre três linhagens de *Pseudomonas* através de restrição do DNA genômico com as enzimas *Xba* I, *Uba*78 I e *Dra* I. A enzima *Xba* I foi a única a apresentar um número de fragmentos suficientes para análise comparativa. As três linhagens apresentaram padrões diferentes de restrição, com maiores semelhanças entre os DNA de *Pseudomonas fluorescens* 80 e *Pseudomonas alcaligenes*.

Quando a identificação de uma espécie necessita de uma análise mais detalhada a hibridização com sondas de ácidos nucleicos específicas para uma determinada espécie deve ser utilizada. Esta sonda pode ser um fragmento de DNA do genoma da mesma espécie clonado ao acaso (Tompkins *et al.*, 1986). Linhagens relacionadas apresentam grande número de fragmentos hibridizados em comum, ao passo que, as não relacionadas apresentam poucos.

Recentemente, Keel *et al.* (1996) analisaram a diversidade fenotípica e genotípica de *Pseudomonas* fluorescentes produtoras do antimicrobiano de amplo espectro 2, 4-diacetilfloroglucinol (PHL), considerado um dos determinantes no controle biológico de vários patógenos. Nesse estudo, foram determinados dois grupos fenotípicos distintos. O primeiro, constituído de linhagens isoladas de solos americano, europeu e africano, foi produtor de PHL, do antimicrobiano *pyoluteorin* e do ácido cianídrico; no segundo grupo, de linhagens isoladas de solos americano e europeu, produziram somente PHL e ácido cianídrico. As análises genotípicas envolvendo padrões de restrição seguido de hibridização com sonda para o gene *phl* e padrão de restrição do fragmento amplificado relativo ao gene rDNA 16S indicaram que as linhagens produtoras dos antimicrobianos PHL e *pyoluteorin* são altamente semelhantes, enquanto que as linhagens produtoras somente de PHL apresentam maior diversidade. Esses dois grupos foram ainda subdivididos, após a análise de RAPD, indicando polimorfismo genético entre as linhagens estudadas.

Um método de identificação generalizado, baseado em hibridização de DNA, denominado ribotipagem, foi proposto por Grimont & Grimont (1986). Esse método consiste no uso de RNA ribossômico ou de seus genes correspondentes (rDNA) como sondas na hibridização com DNA genômico digerido. As seqüências de genes do rDNA são regiões altamente conservadas no genoma, as quais podem ser hibridizadas com os genes de rDNA de muitas espécies de microrganismos (Woese, 1987). Os genes de rDNA em bactérias estão organizados em *operons*, nos quais estão codificados os genes individuais dos rRNA 16S, 23S e 5S que estão separados por seqüências não codificadoras. O uso de sondas mistas de DNA 16S e 23S resulta na hibridização com fragmentos do DNA genômico digerido que contém partes do gene de rDNA. Assim, diferentes padrões de hibridização podem ser obtidos dependendo da sonda utilizada (Saunders *et al.*, 1990).

Linhagens de *Pseudomonas*, supostamente pertencentes às espécies *Pseudomonas putida* biovar A e *Pseudomonas fluorescens* pertencentes ao grupo I de homologia do rDNA, foram comparadas por taxonomia numérica e análise de ribotipagem. As linhagens foram classificadas em cinco grupos (I a V) distintos pela análise fenotípica numérica. O grupo II foi identificado como *Pseudomonas putida* biovar A, mas quatro subgrupos (IIa a IId) fenotípicos foram determinados. A caracterização através da ribotipagem, após digestão com a enzima de restrição *Pvu* II, determinou sete ribotipos (A a G) no grupo fenotípico II. Os resultados mostraram correlação entre os subgrupos IIa e IId e os ribotipos A e B, respectivamente. Os subgrupos IIb e IIc foram divididos em três (E, F e G) e dois (C e D), respectivamente. (Elomari *et al.*, 1994).

Elomari *et al.* (1996) analisaram isolados de água mineral empregando ribotipagem e propuseram uma nova espécie de *Pseudomonas*, denominada *Pseudomonas veronii*, uma vez que tais isolados não foram relacionados com os grupos

autênticos de *Pseudomonas* determinados por análises fenotípicas e hibridização de DNA.

Leitão *et al.* (1996) analisaram isolados de *Pseudomonas aeruginosa* de diferentes ambientes, entre eles água nascente, pacientes com fibrose cística e infecções hospitalares, através de ribotipagem utilizando como sonda rDNA 16S e 23S de *Escherichia coli*. Foram obtidos onze ribotipos diferentes entre os isolados. Os padrões predominantes incluíram isolados de todos os ambientes.

Recentemente, infecções causadas por *Pseudomonas* em pacientes com fibrose cística mereceram um estudo epidemiológico. Pitt *et al.* (1996) isolaram 366 *Pseudomonas cepacia* de 17 centros de tratamento hospitalar e analisaram o padrão de bandas obtidas pela ribotipagem. Foram encontrados 50 ribotipos diferentes, sendo um deles denominado ribotipo 1, encontrado em 68 pacientes de 8 centros diferentes. A análise da resistência dos isolados a várias drogas antimicrobianas apresentou grande variabilidade. Nenhuma correlação entre os perfis de bandas obtidos na ribotipagem e a resistência a antimicrobianos pôde ser determinada.

Atualmente, a hibridização de ácidos nucléicos tem sido utilizada para identificação de microrganismos. Entretanto esse método tem algumas restrições para uso rotineiro: a hibridização de ácidos nucléicos é um método demorado e utiliza, em muitos casos, sondas radioativas, e necessita de grandes quantidades de DNA para gerar bons resultados, o que nem sempre é de fácil obtenção.

O método de amplificação de ácidos nucléicos conhecido como PCR (“*polymerase chain reaction*”) foi introduzido por Saiki *et al.* (1985) e tornou-se uma das mais importantes inovações científicas da década passada. O PCR utiliza uma DNA polimerase termoestável para produzir múltiplas cópias de regiões específicas do DNA, incluindo regiões não-codificadoras ou genes específicos. Os produtos obtidos após amplificação, podem ser analisados através de eletroforese em gel de agarose, quanto ao

tamanho do fragmento amplificado que, em muitos casos, pode indicar a presença do DNA alvo da sequência original.

Atualmente, o PCR tornou-se um dos métodos mais simples e rápidos para a identificação e comparação de microrganismos específicos para uma variedade de linhagens. Estratégias variadas usando o método de PCR têm sido descritas e utilizadas para identificar genes que são característicos de uma espécie em particular, auxiliando na identificação dos microrganismos.

O método de PCR combinado à digestão com enzimas de restrição dos produtos amplificados resulta em RFLP (“*restriction fragment length polymorphisms*”) que são analisados em eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. Regnery *et al.* (1991) amplificaram sequências específicas do gene para codificação da enzima sintetase de citrato em *Rickettsiae*, seguido de restrição dos fragmentos amplificados para diferenciar linhagens da mesma espécie.

PCR foi usado na identificação de *Pseudomonas aeruginosa*, em amostras de água, pela amplificação do fragmento que corresponde a uma sequência estrutural do gene da exotoxina A. Os oligonucleotídeos específicos amplificaram o fragmento alvo em *Pseudomonas aeruginosa*, mas não em outras espécies de *Pseudomonas*. A identificação foi confirmada através da digestão do fragmento com a enzima *Pvu* II que gerou dois fragmentos com aproximadamente 246 e 150 pb. O método de PCR foi considerado rápido e eficiente, podendo substituir a seleção em meios de cultivo específicos e testes bioquímicos (Khan & Cerniglia, 1994).

Estudos realizados com *Pseudomonas* fluorescentes, baseados em amplificação do gene rDNA 16S, seguido da análise da digestão com treze diferentes enzimas de restrição, definiram dezessete genótipos para o gene rDNA 16S em *Pseudomonas fluorescens*. A definição dos diferentes grupos permite, rapidamente, a

caracterização em espécie de linhagens de *Pseudomonas* fluorescentes (Laguerre *et al.*, 1994).

Outra variação do PCR é a análise de RAPD (“*randomly amplified polymorphic DNA*”). Este método consiste na escolha arbitrária de um único oligonucleotídeo iniciador (“*primer*”), combinado com ciclos de baixa estringência resultando em fragmentos amplificados característicos de um genoma em particular (Welsh & McClelland, 1990). De fato, esta técnica foi utilizada recentemente para estudos epidemiológicos de *Pseudomonas pseudomallei*, permitindo a subdivisão de isolados clínicos de um mesmo ribotipo (Haase *et al.*, 1995).

1.3.2 Análises de Perfil de Proteínas

A diversidade e o número de proteínas produzidas pelos microrganismos permitiram o desenvolvimento de métodos de identificação e tipagem baseados em análises comparativas de perfis de subunidades protéicas. Esses métodos têm sido utilizados na identificação de espécies de vários organismos e, também, na diferenciação entre linhagens da mesma espécie (Fantinatti *et al.*, 1994). Geralmente, as proteínas de maior peso molecular das linhagens de uma mesma espécie são muito semelhantes, mas diferem, consideravelmente, das de outras espécies. Dentro de uma espécie, diferenças menores entre as linhagens permitem a subtipagem (Towner & Cockayne, 1993).

O padrão de subunidades protéicas é o resultado da extração de proteínas, tanto de células inteiras quanto de frações celulares, tais como proteínas de membranas ou de superfície, e da separação do material solubilizado por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Em geral, essas técnicas utilizam pequenas quantidades de células para o preparo dos extratos protéicos, permitindo a comparação

de muitas linhagens simultaneamente. Dependendo do sistema de eletroforese utilizado, as proteínas são separadas de acordo com as propriedades físico-químicas, incluindo o tamanho, a carga ou o ponto isoelétrico.

Na taxonomia e identificação, o método SDS-PAGE tem sido utilizado na tipagem de microrganismos, particularmente em estudos epidemiológicos. A comparação dos padrões de bandas em eletroforese em gel SDS-PAGE pode ser feita através de visualização direta. Muitas diferenças são detectadas, especialmente, quando os padrões apresentam um pequeno número de subunidades protéicas maiores como, por exemplo, nas preparações de proteínas de membrana (Tsai *et al.*, 1981; Stern & Meyer, 1987). Quando o número de padrões de bandas é mais complexo, especialmente em preparações de proteínas totais, a análise entre as linhagens é feita por programas de computador (Wade *et al.*, 1990; Millership & Want, 1992).

Sorensen *et al.* (1992) identificaram linhagens de *Pseudomonas* isoladas do meio ambiente pela análise do padrão de proteínas totais. Os resultados obtidos nos perfis eletroforéticos classificaram os isolados em *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*. Amostras classificadas como *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram um único padrão de bandas. As linhagens de *Pseudomonas fluorescens* mantiveram o padrão clássico para os biotipos nos testes bioquímicos e fisiológicos e, também, apresentaram um único padrão de bandas diferente dos isolados de *Pseudomonas putida*.

A diversidade fenotípica e genotípica de linhagens de *Pseudomonas* isoladas em cultura de beterraba foi estudada por Rainey *et al.* (1994). As características fenotípicas analisadas foram baseadas em propriedades bioquímicas, utilização de fontes de carbono, perfil de proteínas totais entre outras, que agruparam todas as linhagens em dois grandes grupos subdivididos em oito subgrupos, exceto a análise de proteínas totais que determinou seis grupos distintos. A análise genotípica baseada em restrição de

fragmentos com diferentes enzimas revelou oito grupos genômicos distintos que coincidiram com a análise fenotípica.

Vlassak *et al.* (1992), estudando uma população de bactérias isoladas da rizosfera de arroz e banana no Sri Lanka, determinaram cinco grupos de bactérias fluorescentes. Os três grupos com maior número de isolados apresentavam as espécies de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida*, enquanto que os outros grupos menores apresentaram outras bactérias fluorescentes. Subgrupos foram determinados após a análise de proteínas totais em SDS-PAGE.

Freqüentemente, o método SDS-PAGE é utilizado em combinação com outras técnicas, tais como sorotipagem e eletroforese de várias enzimas na identificação de microrganismos (Sibold *et al.*, 1992).

Kragelund *et al.* (1996), comparando diferentes linhagens de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* pelo perfil de proteínas de membrana, verificaram uma grande heterogeneidade. Entretanto, algumas proteínas mostraram-se predominantes entre as amostras e semelhantes às proteínas de *Pseudomonas aeruginosa*. Uma proteína de 37 KDa foi purificada e usada para produção de anticorpo policlonal. O anticorpo foi utilizado como sonda para a identificação de *Pseudomonas* do grupo I de homologia de rDNA obtida da rizosfera de cevada em diferentes meios de cultivo.

1.3.3 Análise de Atividade Enzimática

A análise de proteínas baseada na eletroforese de várias enzimas (*multilocus enzyme electrophoresis*) foi desenvolvida, inicialmente, para análise da diversidade genética em populações de mamíferos, mas também é utilizada para o estudo

de diversidade genética e relações entre microrganismos em uma população (Selander *et al.*, 1986).

Usando a eletroforese para várias enzimas, os microrganismos podem ser diferenciados pela análise de mobilidade eletroforética de um extrato enzimático. Em uma população de microrganismos existem diversas formas variantes de uma mesma enzima, cada uma codificada por um alelo diferente. Mudanças de poucos aminoácidos nas proteínas codificadas por diferentes alelos são suficientes para afetar a mobilidade eletroforética e permitir a diferenciação entre as linhagens. A discriminação da técnica é aumentada pela análise de múltiplas enzimas, geralmente entre 10 a 15 enzimas diferentes. Linhagens que apresentam os mesmos perfis de alelos para um conjunto de enzimas analisadas são referidas como “*electrophoretic types*” (ETs). Cada ET representa um clone distinto dentro da população. Assim, a análise de várias enzimas indica uma amostragem representativa dos genes estruturais de um organismo, possibilitando o cálculo da frequência de alelos para estudo das variações genéticas dentro da população e o nível de relação entre espécies ou isolados (Selander *et al.*, 1986).

Carson *et al.* (1991) utilizaram eletroforese de múltiplas enzimas para análises epidemiológicas de amostras patogênicas de *Pseudomonas cepacia*. As análises eletroforéticas apresentaram um perfil idêntico para todas as linhagens em relação às diferentes enzimas analisadas. Um dos cinco tipos eletroforéticos obtidos foi idêntico ao perfil encontrado em outra amostra epidêmica, permitindo a sugestão pelos autores do uso de eletroforese de múltiplas enzimas associadas com outras técnicas para identificação de microrganismos em situações de epidemias.

A diferenciação intraespecífica de *Pseudomonas aeruginosa* foi analisada pela comparação do polimorfismo de esterases e ribotipagem. Denamur *et al.* (1991) encontraram 25 tipos eletroforéticos para esterase e 12 ribotipos diferentes. A

combinação das duas análises resultou em 30 tipos diferentes de *Pseudomonas aeruginosa* entre os isolados de pacientes com fibrose cística.

A eletroforese de múltiplas enzimas também foi considerada um método funcional na identificação e comparação de isolados de *Pseudomonas cepacia* em diferentes ambientes. Yohalem & Lorbeer (1994) analisaram isolados clínicos e fitopatogênicos quanto aos tipos eletroforéticos obtidos com diferentes enzimas e encontraram poucas diferenças.

2. Objetivos

O objetivo do presente estudo foi a caracterização de linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de diferentes culturas agrícolas (algodão, milho e soja) quanto às características fenotípicas e genotípicas. Para isso, utilizaram-se métodos fenotípicos, como a sorotipagem, produção de bacteriocina e isoenzimas; métodos moleculares, como análises de ácidos nucleicos por RAPD, ribotipagem, polimorfismo do rDNA 16S e métodos quimiotaxonômicos, como a análise de perfil de proteínas, procurando analisar a diversidade genética entre linhagens isoladas de mesma cultura agrícola e entre linhagens isoladas de culturas agrícolas diferentes. Posteriormente, foi possível verificar quais os melhores métodos utilizados na caracterização de linhagens de *Pseudomonas* sp. fluorescentes considerando-se o custo, o tempo de trabalho e a disponibilidade técnica.

3. Material e Métodos

3.1 Linhagens Bacterianas

As linhagens bacterianas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes estudadas no presente trabalho foram cedidas pela Dr^a. Sueli dos Santos Freitas, da Seção de Microbiologia do Solo do Instituto Agronômico de Campinas (SP). A designação e origem das linhagens encontram-se listadas na tabela II.

3.2 Meio de Cultura e Condições de Cultivo

As linhagens bacterianas foram inicialmente semeadas em placas contendo meio B de King (King *et al.*, 1954) para obtenção de colônias isoladas, a partir das quais foram feitas culturas estoque, com o mesmo meio e mantidas à temperatura ambiente sob óleo mineral.

O meio B de King foi utilizado no crescimento das linhagens bacterianas para todos os experimentos realizados neste trabalho. As condições de cultivo foram padronizadas em 28° C por 12 - 16 h, sob agitação a 150 rpm, quando necessário.

Tabela II. Designação e origem das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

Linhagens Bacterianas^(a)	Origem^(c)
Ps 21A, Ps 21B e Ps 21C	Rizosfera de plantas de algodão (<i>Gossypium hirsutum</i>)
Ps 22Abr e Ps 22Bbr	Rizosfera de plantas de algodão (<i>Gossypium hirsutum</i>)
Ps 23C, Ps 23Agr, Ps 23Als, Ps 23BlS e Ps 23Bpc	Rizosfera de plantas de algodão (<i>Gossypium hirsutum</i>)
Ps 31A e Ps 31C ^(b)	Rizosfera de plantas de milho (<i>Zea mays</i>)
Ps 33 ^(b)	Rizosfera de plantas de milho (<i>Zea mays</i>)
Ps 34B e Ps 34Abr	Rizosfera de plantas de milho (<i>Zea mays</i>)
Ps 41C, Ps 41Abr e Ps 41Atr	Rizosfera de plantas de soja (<i>Glycine max</i>)
Ps 42A e Ps 42B	Rizosfera de plantas de soja (<i>Glycine max</i>)

^(a) Linhagens bacterianas com o mesmo número foram obtidas da mesma planta.

^(b) Linhagens bacterianas consideradas patogênicas, pois causaram morte das plantas de feijão.

^(c) Linhagens bacterianas isoladas de culturas agrícolas cedidas pela Dr^a. Sueli dos Santos Freitas (Instituto Agronômico de Campinas).

3.3 Extração e Purificação do DNA Genômico

O método utilizado para extração do DNA genômico em pequena escala foi baseado na técnica de Pitcher *et al.* (1989). As linhagens bacterianas foram semeadas em meio B de King a partir de um pré-inóculo em 3,0 ml de meio, o qual foi incubado a 28° C por 12 h. As placas foram incubadas nas mesmas condições. O crescimento bacteriano foi recuperado em 2,0 ml de TE pH 8,0 (EDTA 0,5 M pH 8,0; Tris-Cl 1 M pH 8,0) com auxílio de uma alça de plástico descartável e transferido para tubos de centrifuga (volume 1,5 ml) e, então, centrifugados a 6500 rpm por 2 min.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 100 µl de TE pH 8,0 contendo 2 mg/ml de lisozima dissolvida. O tubo foi mantido a 37° C por 30 min sendo, a seguir, 500 µl de solução de tiocianato de guanidina (tiocianato de guanidina 5 M, EDTA 0,5 M pH 8,0; N-lauril sarcosina 10 %) adicionados à suspensão e o tubo agitado em vortex brevemente e mantido à temperatura ambiente por 5 a 10 min. O tubo foi resfriado em gelo e ao lisado bacteriano foram adicionados 250 µl de acetato de amônio 7,5 M. O tubo foi invertido várias vezes suavemente e mantido no gelo por 10 min. Após a incubação em gelo, 500 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v) foram adicionados e o tubo invertido manualmente até completa emulsificação. A suspensão foi centrifugada a 13000 rpm por 10 min, a fase aquosa transferida para um novo tubo de centrifuga e 0,54 volumes de isopropanol gelado foram adicionados para precipitar o DNA. O tubo foi invertido várias vezes até a mistura das soluções e visualização de um precipitado fibroso branco. A suspensão foi centrifugada a 6500 rpm por 1 min e o DNA precipitado lavado cerca de 3 vezes com etanol 70 % (v/v). O DNA

foi ressuspendido em 200 µl de TE pH 8,0, adicionado 10 µl de RNase (10 mg/ml) e incubado a 37° C por 1 h.

Um volume (240 µl) de clorofórmio-álcool isoamílico foi adicionado após a adição de 40 µl de cloreto de lítio 4 M para remoção de proteínas. Novamente a solução foi emulsificada e centrifugada a 13000 rpm por 10 min. A fase aquosa foi recuperada e o DNA precipitado com 2 volumes de etanol gelado. O tubo foi invertido novamente até a visualização do DNA e centrifugado a 6500 rpm por 1 min. O DNA precipitado foi lavado 2 vezes com etanol 70 % (v/v), seco a vácuo, ressuspendido em 100 µl de H₂O deionizada e esterilizada e mantido a 4° C.

A pureza e a quantificação do DNA foram verificadas através de leitura em espectrofotômetro Gene Quant (Pharmacia) a 260 e 280 nm.

3.4 Eletroforese de DNA em Gel de Agarose

O DNA foi visualizado através do sistema de eletroforese horizontal com gel de agarose submerso. A concentração do gel de agarose foi de 0,4 % a 1,2 % gel variando conforme o tamanho do DNA a ser visualizado. A agarose foi fundida em tampão TEB 1X (solução estoque TEB 5X - 0,1 M Tris; 0,1 M ácido bórico; 2 mM EDTA pH 8,0), sendo o mesmo tampão utilizado para as corridas eletroforéticas.

As linhagens de DNA foram misturadas com tampão de ressuspensão 6 X (ficoll 400 15 %; azul de bromofenol 0,25 %; xileno cianol FF 0,25 %) e aplicadas nas canaletas. As condições de corrida eletroforética foram variadas, dependendo do material analisado.

Após o término da corrida, o gel foi transferido para uma cuba contendo solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) e a visualização de bandas foi feita em transiluminador de luz ultravioleta. Os géis foram fotografados com filme preto e branco ASA 100 Kodak e filme de revelação instantânea ASA 600 Polaroid com o auxílio de filtro vermelho.

3.5 Ribotipagem

3.5.1 Digestão com Enzima de Restrição e “Southern blotting” de DNA

O DNA genômico (2 a 4 µg) das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, preparado anteriormente, foi digerido com a enzima de restrição *Pvu* II (Pharmacia Inc.) usando 10 unidades da enzima por µg de DNA no volume total de 20 µl por reação, como recomendado pelo fabricante. A digestão total do DNA genômico foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8 % por 20 h a 40 V. O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com os marcadores de peso molecular λ *Hind* III (Pharmacia Inc.) e Marker II Dig-labeled (Boehringer Mannheim Biochemica).

Os fragmentos de DNA foram transferidos para a membrana de “nylon” (Nylon membrane positively charged - Hybond N⁺ - Boehringer Mannheim Biochemica) através de sistema a vácuo (VacuGeneTMXL - Pharmacia Biotech) por 3 h a 55 atm. Inicialmente, o gel foi exposto em transiluminador de luz ultravioleta por 10 min para quebra dos fragmentos de alto peso molecular. Os fragmentos foram denaturados com 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl por 20 min e, a seguir, neutralizados com 0,5 M Tris-Cl

pH 7,5; 1,5 M NaCl por 20 min. A transferência completa foi feita em solução 20 X SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl; 0,015 M citrato de sódio) e em seguida a membrana de nylon foi seca à temperatura ambiente por 30 min. Os fragmentos de DNA transferidos para a membrana de nylon foram imobilizados por exposição à luz ultravioleta por 10 min.

3.5.2 Hibridização com Sonda Marcada com Digoxigenina

A membrana de nylon com os fragmentos de DNA foi hibridizada com a sonda contendo o operon rDNA (fragmentos 5S, 16S e 23S dos genes rRNA) de *Streptomyces violaceoruber* (Zarko-Postawka *et al.*, 1997) marcada com digoxigenina, segundo as especificações do fabricante (DIG DNA labelling and detection Kit; Boehringer Mannheim Biochemica). A membrana de nylon foi pré-hibridizada em solução 5 X SSC; 0,02 % de SDS; 0,1 % de N-lauril-sarcosil; 1 % de solução bloqueadora, a 65° C por 3 h sob leve agitação. A solução bloqueadora consiste em 10 % de caseína hidrolisada (Boehringer Mannheim Biochemica); 100 mM de ácido maléico; 150 mM de NaCl, autoclavados e mantidos a 4° C.

Antes da adição da solução de hibridização (5 X SSC; 0,02 % de SDS; 0,1 % de N-lauril-sarcosil; 1 % de solução bloqueadora), a sonda (5-25 ng/ml) foi denaturada em banho-maria a 100° C por 10 min e, a seguir, mantida em gelo por 10 min. A hibridização foi feita a 60° C por 18 h sob agitação. Após esse período, a membrana foi lavada duas vezes, à temperatura ambiente, em tampão 2 X SSC; 0,1 % SDS por 5 min sob agitação e duas vezes, a 68° C, em tampão 0,1 X SSC; 0,1 % SDS por 15 min sob agitação.

3.5.3 Detecção Imunológica dos Fragmentos Marcados com Digoxigenina

A detecção imunológica foi feita com o conjugado anti-DIG F_{ab} + fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim Biochemica). A membrana de nylon foi equilibrada com o tampão ácido maléico (ácido maléico 0,1 M; 0,15 M NaCl p H 7,5; 0,3 % Tween 20) por 5 min e, em seguida, incubada por 30 min com solução de bloqueio 1X (10 % de solução estoque, Boehringer Mannheim Biochemica) em tampão ácido maléico.

A solução de bloqueio foi descartada e a membrana incubada por 30 min com a solução de anticorpo, sob leve agitação. O conjugado anti-DIG F_{ab} + fosfatase alcalina foi diluído 1:5000 em 20 ml da solução de bloqueio. Após a ligação do anticorpo, a membrana foi lavada duas vezes com tampão ácido maléico por 15 min, para retirar o excesso de anticorpo.

A membrana foi equilibrada com solução de detecção (0,1 M de Tris-Cl; 0,1 M de NaCl; 50 mM MgCl₂ pH 9,5), por 5 min e, em seguida, adicionada a solução de coloração (10 ml de solução de detecção; 45 µl de nitro blue tetrazolium; 35 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato). A membrana foi mantida nesta solução até o aparecimento das bandas. A reação de coloração foi terminada com a adição de tampão TE (0,1 M Tris; 2 mM EDTA pH 8,0).

3.6 Amplificação de DNA por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

As seqüências aleatórias de DNA (RAPD) e o gene do rDNA 16S das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase.

3.6.1 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação do DNA

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na técnica de RAPD foram selecionados a partir do “Operon 10-mer Kit R” (Operon Technologies, Inc.) e os utilizados para amplificação do gene rDNA 16S foram cedidos pelo Dr. Gilson Paulo Manfio, pesquisador da Fundação André Toselo. Estes oligonucleotídeos iniciadores encontram-se listados na tabela III. Os oligonucleotídeos foram ressuspensos em 1,0 ml de H₂O deionizada e esterilizada e mantidos a 4° C até completa dissolução. A suspensão foi distribuída em alíquotas de 50 µl nos tubos de centrifuga de 0,5 ml e mantidos a -20° C.

Tabela III. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação de seqüências de DNA aleatórias e do gene rDNA 16S.

Nome	Seqüência (5' para 3') ^(a)	Concentração µg/ml	Tamanho pb	Técnica
OPR 1	TGCGGGTCCT	18,0	10	RADP
OPR 2	CACAGCTGCC	16,5	10	RADP
OPR 7	ACTGGCCTGA	16,0	10	RADP
OPR 8	CCCGTTGCCT	19,0	10	RADP
OPR 13	GGACGACAAG	14,0	10	RADP
27 f	AGAGTTTCATCMTGGCTCAG		20	rDNA 16S
1525 r	AAGGAGGTGWTCCARCC		17	rDNA 16S

^(a) Bases degeneradas: M, A:C; W, A:T.

3.6.2 Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada em máquina automática de termociclagem (Perkin-Elmer thermo cycler) usando tubos de centrífuga de 0,5 ml. A enzima *Taq* DNA polimerase e o tampão para a reação foram de procedência Pharmacia Inc.. Soluções-estoque dos deoxiribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), também de procedência Pharmacia Inc., foram misturadas em quantidades equimolares para uma concentração final de 25 mM.

A solução estoque dos oligonucleotídeos iniciadores, os dNTPs, o DNA genômico e o tampão da enzima (10X) foram sempre mantidos em gelo. A enzima *Taq* DNA polimerase foi mantida a - 20° C até o uso. Nas seqüências aleatórias de DNA genômico amplificadas (RAPD), as reações de PCR foram feitas em duplicata.

Os reagentes foram misturados em tubos de centrífuga de 0,5 ml esterilizados e mantidos em gelo na seguinte ordem:

	DNA	Iniciador 1 (20 µM)	Iniciador 2 (20 µM)	dNTPs (25 mM)	Tampão da enzima (10X)	H ₂ O ^(a)
RAPD	5 µl	1 µl	—	1 µl	5 µl	33 µl
rDNA 16S	5 µl	1 µl	1 µl	2 µl	10 µl	76 µl

^(a) H₂O deionizada e esterilizada.

Os tubos foram aquecidos a 95° C por 5 min e resfriados em gelo por 10 min. A enzima *Taq* DNA polimerase foi adicionada na concentração de 2,5 U por reação e uma gota de óleo mineral foi adicionada sobre a solução para evitar a evaporação. Os conteúdos dos tubos foram rapidamente misturados, centrifugados por 5 seg e colocados na máquina de termociclagem.

A reação foi feita nas seguintes condições:

Técnica	Denaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final
RAPD	94° C	33° C	72° C	72° C
	1 min	1 min	2 min	—
	45 ciclos			
rDNA 16S	94° C	55° C	72° C	
	2 min	1 min	2 min	10 min
	30 ciclos			1 ciclo

As reações de PCR foram mantidas a 4° C e os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0 %. Aproximadamente 5 µl da reação de PCR foi adicionada na canaleta e o tamanho do fragmento amplificado foi estimado comparando-se o tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular 1 Kb (Ready Load™ 1 Kb Ladder) da Gibco/BRL (Life Technologies).

3.6.3 Purificação do rDNA 16S Amplificado por PCR

O rDNA 16S amplificado por PCR das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes foi precipitado com NaCl para uma concentração final de 200 mM e etanol 100 % por 1 h a -20° C. A solução foi centrifugada a 6500 rpm por 5 min e o DNA lavado 2 vezes com etanol 70 % (v/v), seco a vácuo, ressuspensionado em 100 µl de H₂O deionizada e esterilizada e mantido a 4° C.

3.7 Polimorfismo do rDNA 16S

O rDNA 16S amplificado por PCR das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes foi clivado com as enzimas de restrição *EcoR* I; *Hae* III e *Sma* I (Pharmacia Inc.) nas condições recomendadas pelo fabricante. A digestão total do DNA foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1,0 %. Os tamanhos dos fragmentos foram determinados por comparação com o marcador de peso molecular 100 pb (Ready Load™ 100 pb Ladder) da Gibco/BRL (Life Technologies).

3.8 Extração de Proteínas Totais

A extração de proteínas totais das linhagens bacterianas seguiu a metodologia descrita por Jackman e Whiley (1990). As linhagens bacterianas foram crescidas em 50,0 ml de meio B de King sob agitação a 28° C por 16 h. As bactérias foram recuperadas por centrifugação a 6000 rpm por 10 min a 4° C. O sedimento foi ressuspensionado em 10,0 ml de tampão Tris-Cl 0,5 M pH 7,1 e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sedimento foi ressuspensionado em 500 µl de tampão Tris-Cl, sendo 100 µl misturados com 100 µl de tampão de ressuspensão 2X (Tris-Cl 0,1 M pH 6,8; glicerol 20 %; SDS 4 %; azul de bromofenol 0,2 %; β-mercaptoetanol 10 %) e fervido a 100° C por 5 min. A suspensão foi centrifugada a 6500 rpm por 5 min, o sobrenadante transferido para outro tubo de centrífuga e mantido a - 20° C.

O volume de suspensão aplicado no gel de SDS-PAGE variou de 10 µl a 20 µl para as diferentes linhagens e o peso molecular foi estimado comparando-se o tamanho das subunidades protéicas com o marcador de peso molecular de procedência

Gibco/BRL (Life technologies) Prestained Protein Molecular Weight Standards (14.300-200.000).

3.9 Extração de Proteínas de Membrana

A extração de proteínas de membrana das linhagens bacterianas seguiu a metodologia descrita por Benedetti (1991), com modificações. As linhagens bacterianas foram crescidas em 50,0 ml de meio B de King sob agitação a 28° C por 16 h. O crescimento foi recuperado por centrifugação a 6000 rpm por 10 min a 4° C. O sedimento foi ressuspensionado em 10,0 ml de tampão Tris-Cl 3,3 mM pH 7,4 e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 10,0 ml de tampão Tris-Cl 0,1 M - EDTA 10 mM pH 7,2 gelado. Esta suspensão foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min e o precipitado obtido ressuspensionado em Tris-Cl 0,1 M - MgCl₂ 10 mM pH 7,2.

A suspensão bacteriana foi, então, centrifugada e o precipitado ressuspensionado em 10,0 ml de tampão glicina 0,1 M - sacarose 0,75 M pH 9,2 suplementado com lisozima (0,1 mg/ml). Após 30 min em banho de gelo, a suspensão foi sonicada por 6 ciclos de 30 seg a 20 Hz, 70-90 W. Este procedimento foi realizado em banho de gelo com intervalos de 1 min entre cada ciclo de sonicação.

Após o processo de sonicação, a suspensão foi centrifugada por 8000 rpm por 10 min e o sobrenadante transferido para tubos de centrífuga limpos os quais foram novamente centrifugados a 37000 g por 20 min. O sedimento obtido foi ressuspensionado em 10,0 ml de tampão Tris-Cl 3,3 M pH 7,4 e centrifugado nas mesmas condições.

As proteínas de membrana obtidas, após a centrifugação, foram ressuspensas em 400 µl de tampão Tris-Cl 85 mM pH 6,8, solubilizadas com 100 µl de Triton X100 a uma concentração de 10 % e a seguir transferidas para tubos de centrífuga limpos. Estes tubos foram agitados por 20 min à temperatura ambiente e centrifugados a 6500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi recuperado e 500 µl de tampão de ressuspensão 2X foram adicionados ao mesmo. A solução obtida foi fervida por 5 min em banho maria e a seguir mantida a - 20° C.

O volume de suspensão aplicado no gel de SDS-PAGE variou de 10 µl a 20 µl para as diferentes linhagens e o peso molecular estimado comparando-se o tamanho das subunidades protéicas com o marcador de peso molecular de procedência Gibco/BRL (Life technologies) Prestained Protein Molecular Weight Standards (14.300-200.000).

3.10 Eletroforese de Proteínas em Gel SDS-PAGE

3.10.1 Montagem do Gel SDS-PAGE

As eletroforeses de proteínas totais e de membrana foram realizadas utilizando-se o sistema descontínuo de Laemmli (1970). A montagem do gel seguiu as especificações do “Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises” (1990-1991). A montagem do gel de separação (12,5 %) e de empacotamento (4 %) seguiu a tabela IV.

As proteínas totais e de membrana foram submetidas à eletroforese com gel submerso em tampão Tris- Glicina pH 8,3 (Tris 25 mM; Glicina 182 mM; SDS 0,1 %) durante aproximadamente 4 h, numa voltagem de 120V.

Tabela IV. Soluções para gel de SDS-PAGE.

	Gel de Separação	Gel de Empacotamento
	10 % T; 2,7 % C	4 % T; 2,7 % C
Solução de Monômero	25,0 ml	2,66 ml
Tris-Cl 1,5 M pH 8,8	15,0 ml	—
Tris-Cl 0,5 M pH 6,8	—	5,0 ml
SDS 10 %	0,6 ml	0,2 ml
H ₂ O	19,1 ml	12,2 ml
Persulfato de Amônio 10 %	300 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl

3.10.2 Impregnação dos Géis de Proteínas com Prata

A metodologia de impregnação das proteínas com prata seguiu as especificações descritas por Blum *et al.* (1987). A sequência da técnica de impregnação por prata encontra-se na tabela V. Os tempos de cada solução foram mantidos estritamente e a revelação interrompida quando todas as bandas tornaram-se bem visíveis. O gel foi mantido sob constante agitação durante todos os passos da impregnação com prata.

Após a revelação das bandas protéicas o gel foi fotografado com filme preto e branco ASA 100 Kodak. O perfil de proteínas totais e de membrana de cada linhagem foi analisado através de programa GelManagerXL, cedido pelo pesquisador Dr. Gilson Paulo Manfio da Fundação de Pesquisa André Tosello. O programa GelManagerXL calcula a similaridade entre os perfis de proteínas das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes formando uma matriz de similaridade (r , coeficiente de correlação de Pearson). A matriz de similaridade gerou um dendrograma representando as semelhanças entre os perfis de proteínas pelo UPGMA.

Tabela V. Soluções para impregnação com prata.

Soluções	Tempo
Fixador (metanol 50 %; ácido acético 12 %; formaldeído 37 % 0,5 ml/l)	1 h
Etanol 50 %	3 X de 20 seg
Tiosulfato de sódio 0,02 %	1 min
H ₂ O destilada	3 X de 20 seg
Nitrato de prata 0,2 %	20 min
H ₂ O destilada	2 X de 20 seg
Solução reveladora (carbonato de sódio 6 %; tiosulfato de sódio 4 mg/ml; Formaldeído 37 % 0,5 ml/l)	+/- 5 min
H ₂ O destilada	2 X de 1 min
Solução “stop” (metanol 50 %; ácido acético 12 %)	10 min
Metanol 50 %	20 min

3.11 Eletroforese de Enzimas

O preparo dos extratos bacterianos de *Pseudomonas* spp. fluorescentes e a eletroforese das enzimas foram realizados em gel de amido com a colaboração da Dr^a. Vera N. Solferini do Dept^o de Genética e Evolução, utilizando a metodologia descrita por Selander *et al.* (1986).

3.11.1 Preparo dos Extratos Bacterianos

As linhagens bacterianas foram crescidas em 100,0 ml de meio B de King sob agitação a 28° C por 16 h. As bactérias foram recuperadas por centrifugação a 6000 rpm por 20 min a 4° C. O sedimento foi ressuspensionado em 2,0 ml de tampão Tris 10 mM; EDTA 1 mM; NADP 0,5 mM (pH 6,8). As células foram lisadas por sonicação com 6 ciclos de 30 seg a 20 Hz, 70-90 W. Esse procedimento foi realizado em banho de gelo com intervalos de 1 min entre cada ciclo de sonicação. A suspensão foi centrifugada a 14000 rpm por 20 min e o sobrenadante distribuído em alíquotas e mantido a - 20° C.

3.11.2 Eletroforese dos Extratos Bacterianos

A eletroforese dos extratos bacterianos foi feita sob gel de amido 11,0 % com 10 mm de espessura. Após a gelificação da matriz, o gel foi envolvido em filme de polietileno e mantido a 4° C por 14-16 h. A região superior do gel foi cortada transversalmente para que as linhagens pudessem ser inseridas. As linhagens foram absorvidas em pequenos pedaços (4 x 10 mm) de papel de filtro Whatman nº 3 e

aplicadas ao gel. O gel foi submetido à corrida eletroforética a 4° C numa corrente constante de 14 mA por 3 h (Tris-Cl 0,2 M pH 8,5 tampão do gel: ácido bórico 0,3 M; NaOH 0,06 M pH 8,0 tampão do eletrodo). Fatias longitudinais do gel, com aproximadamente 2 mm de espessura, foram cortadas com o auxílio de um fio de nylon e submetidas individualmente a reações reveladoras com substratos e corantes específicos para cada enzima que se encontram listados na tabela VI.

Tabela VI. Soluções para coloração das enzimas^(a).

Enzimas	Substrato e Cofator da Enzima	Tampão ^(b) e Sais	Corante
Isocitrato Desidrogenase (IDH)	Ácido isocítrico (50 mg)	Tris Cl 0,2 M pH 8,0; MgCl ₂ 0,1 M	NADP ^(c)
Lactato Desidrogenase (LDH)	DL-lactato de lítio (330 mg)	Tris Cl 0,05 M pH 8,0	NAD ^(c)
Hidroxibutírico Desidrogenase (HBDH)	Ácido glucônico (1,0 g) NaCl (300 mg)	Tris Cl 0,2 M pH 8,0; MgCl ₂ 0,1 M; NaCl 200 mg	NAD
Glicerofosfato Desidrogenase (α GDH)	α -glicerofosfato (70 mg)	Tris Cl 0,2 M pH 8,0; MgCl ₂ 0,1 M	NAD
Malato Desidrogenase (MDH)	Ácido málico 2,0 M	Tris Cl 0,1 M pH 8,0	NAD
Leucina aminopeptidase (LAP)	L-leucina- β -naftilamida hidroclorido (15 mg)	Tris malato 0,2 M pH 6,0	Fast Black K
Esterases (EST)	α -/ β -naftilacetato (1,0 % em Propanol)	Fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0	Fast Blue RR
Enzima Málica (ME)	Ácido málico 2,0 M	Tris Cl 0,05 M pH 8,0; MgCl ₂ 0,1 M	NADP
Fosfoglicoisomerase (PGI)	Frutose-6-fosfato (5 mg); Glucose-6-fosfato desidrogenase 12U	Tris Cl 0,2 M pH 8,0; MgCl ₂ 0,1 M	NADP
Fosfoglicomutase (PGM)	Glucose-1-fosfato (60 mg); Glucose-6-fosfato desidrogenase 30U	Tris Cl 0,2 M pH 8,0; MgCl ₂ 0,1 M	NADP

^(a) Os produtos para as soluções foram de procedência Sigma Chemical Co.

^(b) O volume de tampão para cada reação foi de 30 ml.

^(c) O substrato foi dissolvido no tampão indicado e, então, adicionados 0,6 ml de tetrazólio dimetiltiazol (MTT) 1,25 %; 0,6 ml de metassulfato fenazina (PMS) 1,0 %; 0,6 ml de NADP 1,0 % ou 0,6 ml de NAD 1,0 %, como indicado. Estas soluções foram mantidas no escuro a -20° C.

3.11.3 Análise do Perfil de Mobilidade das Enzimas

A análise do perfil de mobilidade das enzimas foi determinada pela distância de migração da origem do gel a cada banda enzimática. Uma escala numérica foi definida para a distância migrada e linhagens que não apresentavam bandas eram identificadas como nulas ou tendo o valor zero para a enzima em questão. Cada valor de mobilidade de uma enzima foi referido como eletromorfo ou alelomorfo. Linhagens com o mesmo perfil de mobilidade para várias enzimas são denominadas tipos eletroforéticos ou ETs. Cada ET, definido como um genótipo particular de multilocus constitui um clone distinto. A matriz de distância genética foi obtida pela proporção de *loci* representada por alelos diferentes (proporção de erros) entre os pares de ETs. A matriz de distância genética gerou um dendrograma representando a relação genética entre os clones identificados pelo programa NTSYS-pc (Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System), Versão 1.8 (Applied Biostatistic, Inc).

3.12 Comparação Sorológica

3.12.1 Preparação do Anti-soro

A produção de anticorpos polivalentes das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes 21A, 22Bbr, 23C, 33 e 41C foram obtidos após imunização de coelhos. As linhagens foram crescidas em 4,0 ml de meio B de King a 28° C por 16 h. O volume de 1,0 ml do crescimento foi recuperado por centrifugação a 12000 g por 3 min. O sedimento foi lavado três vezes com 1,0 ml de solução fisiológica (NaCl 0,85%) e ressuspendido no mesmo volume. Um mililitro de uma diluição 1:10 da suspensão foi

misturado com volume equivalente de adjuvante completo de Freud e homogeneizada até completa emulsificação. Um inóculo intramuscular da mistura contendo 0,5 ml foi aplicado em cada coxa traseira do animal. Após 42 dias, nova suspensão foi preparada com adjuvante incompleto nas mesmas condições e novamente 0,5 ml foram inoculados no animal. Após 15 dias, o sangue do animal foi retirado e o soro, obtido após a coagulação. O soro foi dividido em alíquotas e mantido a -20° C.

3.12.2 Reação com Anti-soro Polivalente

A reação com anti-soro polivalente foi feita em lâminas de vidro. As linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes foram crescidas em 4,0 ml de meio B de King a 28° C por 16 h. O volume de 1,0 ml do crescimento foi recuperado por centrifugação a 12000 g por 3 min. O sedimento foi lavado três vezes com 1,0 ml de solução fisiológica (NaCl 0,85%) e ressuspendido em 200 µl com a mesma solução. O volume de 20 µl de anti-soro foi misturado com o mesmo volume de suspensão bacteriana. As linhagens soropositivas aglutinavam quando em contato com o soro, formando grumos.

3.13 Produção de Bacteriocina

As linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes foram testadas quanto à produção de bacteriocina no meio de cultura B de King (King *et al.*, 1954). A linhagem bacteriana de *Escherichia coli* 22R80 sensível a todas as bacteriocinas de *E. coli* foi utilizada como controle positivo.

As linhagens foram inoculadas, com auxílio de multialça, em placas de Petri contendo meio de cultura a partir de um pré-inóculo em tubo com 3,0 ml de meio líquido crescidos a 28° C por 12 - 16 h. A seguir, as placas foram incubadas a 28° C por 18 h e então invertidas sobre uma superfície plana. Nas tampas das placas foram colocados 3,0 ml de clorofórmio e estas foram mantidas fechadas por 30 min. Após esse período, as placas foram entreabertas dentro de uma estufa a 37°C por cerca de 45 min. para que o resíduo de clorofórmio evaporasse. O volume de 100 µl de cultura bacteriana para cada linhagem de *Pseudomonas* spp. fluorescente, crescida a partir de um pré-inóculo em meio líquido foi misturado com 4,0 ml de meio semi-sólido e vertidos sobre as colônias bacterianas. As placas foram, novamente, incubadas a 28° C por 18 h.

A formação de um halo de inibição de crescimento bacteriano ao redor da colônia indicou a produção de bacteriocina.

3.14 Análise Estatística para Sorotipagem e Produção de Bacteriocina

A análise estatística para sorotipagem e produção de bacteriocina foi realizada pelo programa NTSYS-pc, Versão 1.8 (Applied Biostatistic, Inc). Este programa compara as linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes gerando uma matriz de similaridade (SM, coeficiente “simple matching”). A partir desta matriz foi construído um dendrograma representando as semelhanças entre as linhagens pelo UPGMA.

4. Resultados

4.1 Análise da Ribotipagem

O DNA genômico das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes foi digerido com a enzima de restrição *Pvu* II e os fragmentos resultantes separados por eletroforese em gel de agarose, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com sonda contendo o operon rDNA de *Streptomyces violaceoruber*. O perfil de ribotipagem das linhagens encontra-se na Figura 1.

As linhagens foram consideradas idênticas quando os perfis de bandas apresentaram fragmentos com tamanhos iguais, e consideradas diferentes quando um ou mais fragmentos de restrição, que reagiram com a sonda, apresentaram tamanhos diferentes ou um número maior de fragmentos. A análise do perfil de fragmentos de restrição revelou 12 ribotipos diferentes, designados de A a L (Figura 1). As linhagens 23C, 23Bl e 23Bpc (Figura 1, canaletas 7, 10 e 11 , respectivamente) apresentaram o mesmo perfil de restrição e pertencem ao ribotipo D. O ribotipo E, formado pela linhagem 23Agr (Figura 1, canaletas 8), possui um perfil de restrição bastante semelhante ao ribotipo D, exceto por uma única banda. As linhagens 41Abr e 41Atr (Figura 1, canaletas 19 e 20, respectivamente) apresentaram o mesmo perfil de restrição (ribotipo J). As linhagens 21A (canaleta 1), 22Bbr (canaleta 5), 23Als (canaleta 9), 31C (canaleta 13) e 41C (canaleta 17) não apresentaram perfil de restrição. Todos os demais, à exceção daqueles que não apresentaram perfil de restrição, apresentaram perfis diferentes entre si e dos anteriormente citados.



Figura 1. Ribotipos das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes obtidos com a enzima de restrição *Pvu* II.

^(a) Peso Molecular λ *Hind* III (Pharmacia Inc.) e Marker Dig-labeled (Boehringer Mannheim Biochemica).

- | | | |
|----------------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| 1. 21A | 9. 23Als | 17. 41C |
| 2. 21B (ribotipo A) | 10. 23Bls (ribotipo D) | 18. Peso Molecular ^(a) |
| 3. 21C (ribotipo B) | 11. 23Bpc (ribotipo D) | 19. 41Abr (ribotipo J) |
| 4. 22Abr (ribotipo C) | 12. 31A (ribotipo F) | 20. 41Atr (ribotipo J) |
| 5. 22Bbr | 13. 31C | 21. 42A (ribotipo K) |
| 6. Peso Molecular ^(a) | 14. 33 (ribotipo G) | 22. 42B (ribotipo L) |
| 7. 23C (ribotipo D) | 15. 34B (ribotipo H) | |
| 8. 23Agr (ribotipo E) | 16. 34Abr (ribotipo I) | |

4.2 Análise do Perfil de RAPD

A análise do perfil de RAPD das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes foi feita utilizando-se cinco oligonucleotídeos diferentes (OPR 1; OPR 2; OPR 7; OPR 8 e OPR 13). O oligonucleotídeo iniciador OPR 1 mostrou um perfil de bandas de DNA exatamente igual para todas as linhagens analisadas, com fragmentos de 3.000 pb, 2.400 pb, 1.700 pb e 700 pb; e o oligonucleotídeo OPR 7 apresentou dois fragmentos de 3.000 pb e 1.940 pb somente para a linhagem 34Abr (resultados não mostrados).

As Figuras 2 e 3 apresentam os perfis de DNA das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes amplificados com o oligonucleotídeo OPR 2, OPR 8 e OPR 13. A utilização de diferentes oligonucleotídeos na amplificação do DNA resultou em alterações no número e tamanho dos fragmentos de DNA (Figuras 2 e 3). As linhagens amplificadas com o oligonucleotídeo OPR 2 foram: 21A, 21C, 22Bbr, 23C, 23Agr, 23Bl, 34B, 34Abr, 41C, 41Atr e 42A. As linhagens 22Bbr e 34B apresentaram um único fragmento de DNA com maior intensidade e tamanho de aproximadamente 1.400 pb (Figura 2, canaleta 3), as demais bandas foram pouco intensas. As linhagens 41C e 42A (Figura 2, canaletas 6 e 8, respectivamente) apresentaram um fragmento com o mesmo tamanho 2.100 pb. As linhagens 23C, 23Agr e 23Bl apresentaram dois fragmentos com tamanhos de 4.900 e 2.200 pb, respectivamente (Figura 2, canaleta 4). Na Figura 2 temos algumas linhagens com padrões diferenciados de amplificação, cujos fragmentos mais intensos apresentam os tamanhos de 1.700 pb (canaleta 1), 3.200 pb e 1.800 pb (canaleta 2) e 2.300 pb e 2.200 pb (canaleta 5) e bandas menos intensas.

As linhagens amplificadas com o oligonucleotídeo OPR 8 foram: 22Bbr, 23BlS, 23Bpc, 34Abr e 42B (Figura 3, canaleta 1 a 4). As linhagens 22Bbr e 23BlS mostraram o mesmo perfil de amplificação com um único fragmento de DNA com maior intensidade e tamanho de 2.000 pb, além de outras bandas menos intensas. Padrões diferenciados de amplificação foram verificados nas linhagens 23Bpc, 34Abr e 42B com tamanhos de fragmentos de 2.300 pb (canaleta 2), 3.000 pb e 2.000 pb (canaleta 3) e 3.950 pb e 1.100 pb (canaleta 4).

O oligonucleotídeo OPR 13 resultou na amplificação das linhagens 21A, 22Bbr, 23BlS e 33 (Figura 3, canaleta 7 a 10). Todas as linhagens amplificadas apresentaram um perfil diferenciado, além de um maior número de fragmentos de DNA quando comparados com as outras linhagens para os oligonucleotídeos OPR 1, OPR 2, OPR 7 e OPR 8. A linhagem 21A (canaleta 7) apresentou três fragmentos de DNA com maior intensidade e diferentes tamanhos, 4.400 pb, 2.800 pb e 940 pb. As linhagens 23BlS (canaleta 9) e 33 (canaleta 10) apresentaram os fragmentos de DNA de 3.000 pb e 800 pb, e 2.650 pb e 2.170 pb, respectivamente. O fragmento de DNA mais intenso de 3.300 pb foi amplificado na linhagem 22Bbr. Fragmentos de DNA menos intensos foram amplificados em todas as linhagens.

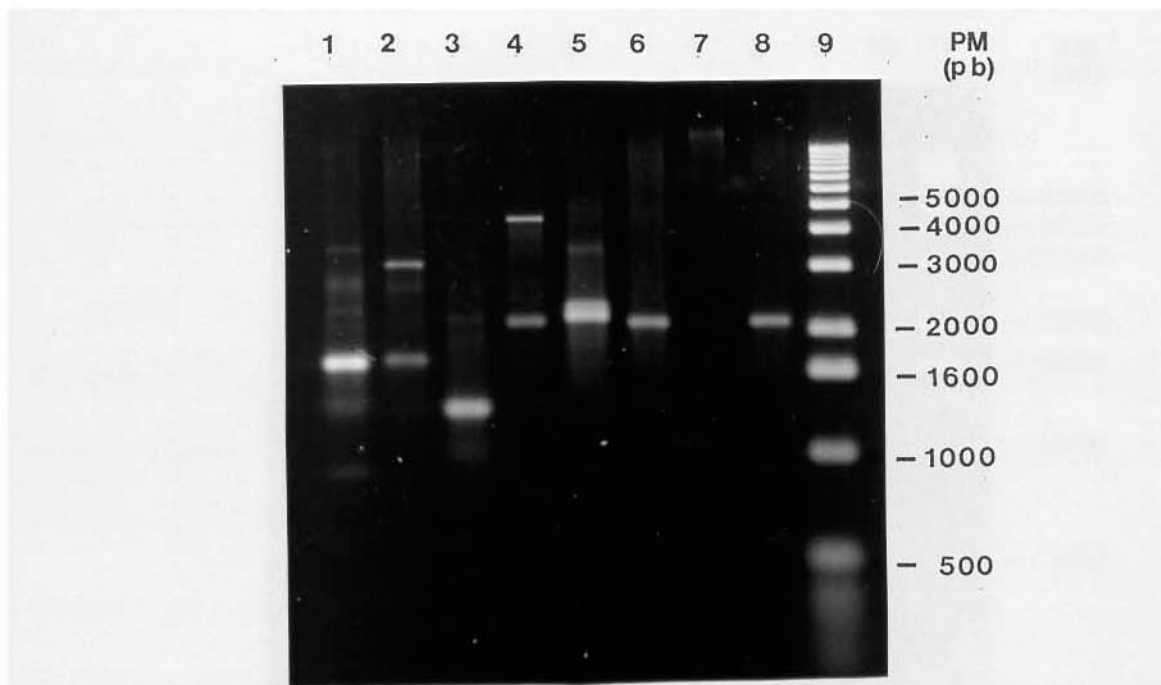


Figura 2. Perfil de RAPD de linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes amplificadas com o oligonucleotídeo OPR 2.

1. 21A	4. 23C	7. 41Atr
2. 21C	5. 34Abr	8. 42A
3. 22Bbr	6. 41C	9. Peso Molecular (escada 1 Kb)

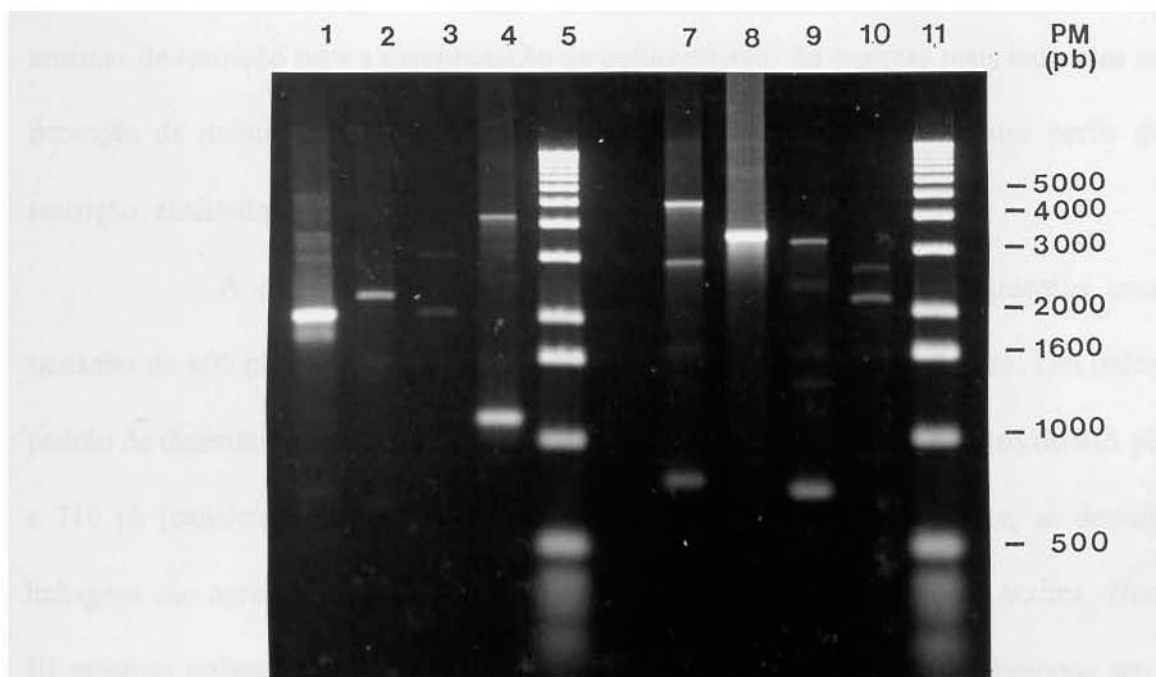


Figura 3. Perfil de RAPD de linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes amplificadas com os oligonucleotídeos OPR 8 (canaletas 1 a 4) e OPR 13 (canaletas 7 a 10).

1. 22Bbr

7. 21A

2. 23Bpc

8. 22Bbr

3. 34Abr

9. 23BlS

4. 42B

10. 33

5. Peso Molecular (escada 1 Kb)

11. Peso Molecular (escada 1 Kb)

4.3 Polimorfismo do rDNA 16S

O fragmento correspondente ao rDNA 16S das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes amplificado por PCR foi digerido com diferentes enzimas de restrição para a determinação de polimorfismo. As enzimas mais indicadas na detecção de polimorfismo foram *EcoR* I, *Hae* III e *Sma* I. Os diferentes perfis de restrição, analisados em gel de agarose 1,0 %, encontram-se na Figura 4.

A digestão com a enzima *Sma* I resultou em dois fragmentos com tamanho de 800 pb e 620 pb (canaleta 3) para todas as linhagens estudadas. Um único padrão de digestão foi obtido com a enzima *EcoR* I e resultou nos fragmentos de 915 pb e 710 pb (canaleta 2) dos rDNA 16S das linhagens 22Bbr, 34B e 34Abr; as demais linhagens não apresentaram sítio de restrição para esta enzima. Somente a enzima *Hae* III mostrou polimorfismo no rDNA 16S entre as vinte linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, separando-as em dois grupos. Um grupo foi formado pelas linhagens 22Bbr, 34B e 34Abr e apresentou pelo menos os fragmentos de 380 pb, 240 pb e 200 pb (canaleta 4). As outras linhagens, formando o segundo grupo, apresentaram pelo menos os fragmentos de 710 pb, 240 pb e 200 pb (canaleta 5). Fragmentos menos intensos foram observados em todas as linhagens estudadas após a digestão com as enzimas de restrição.

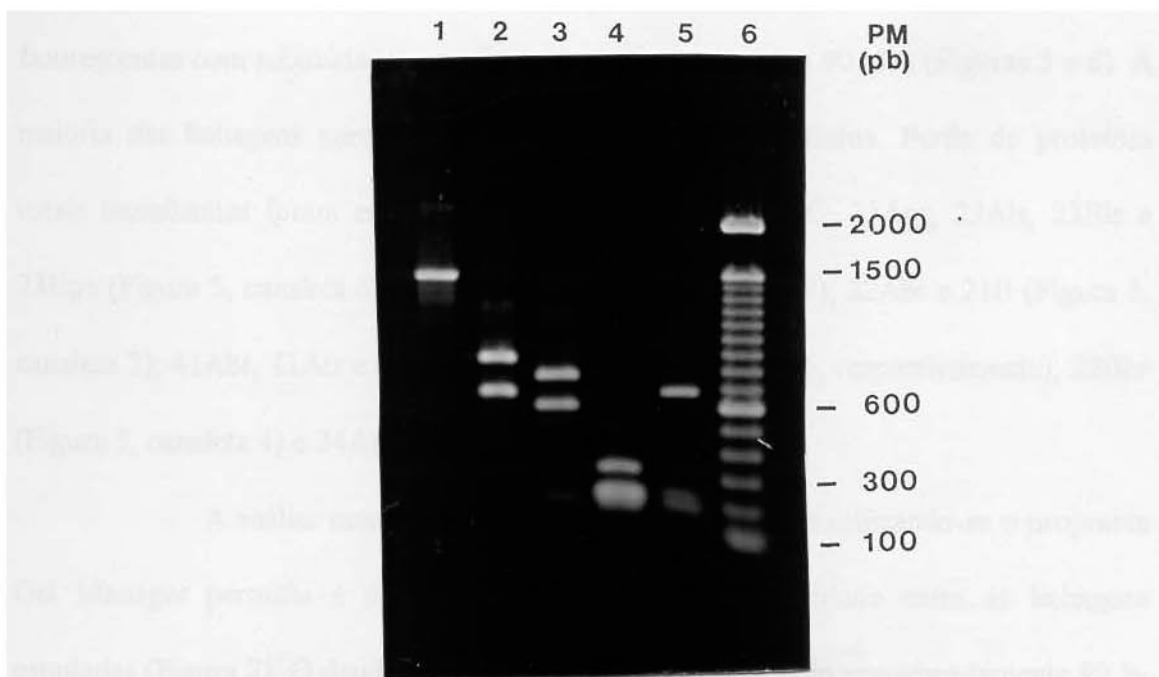


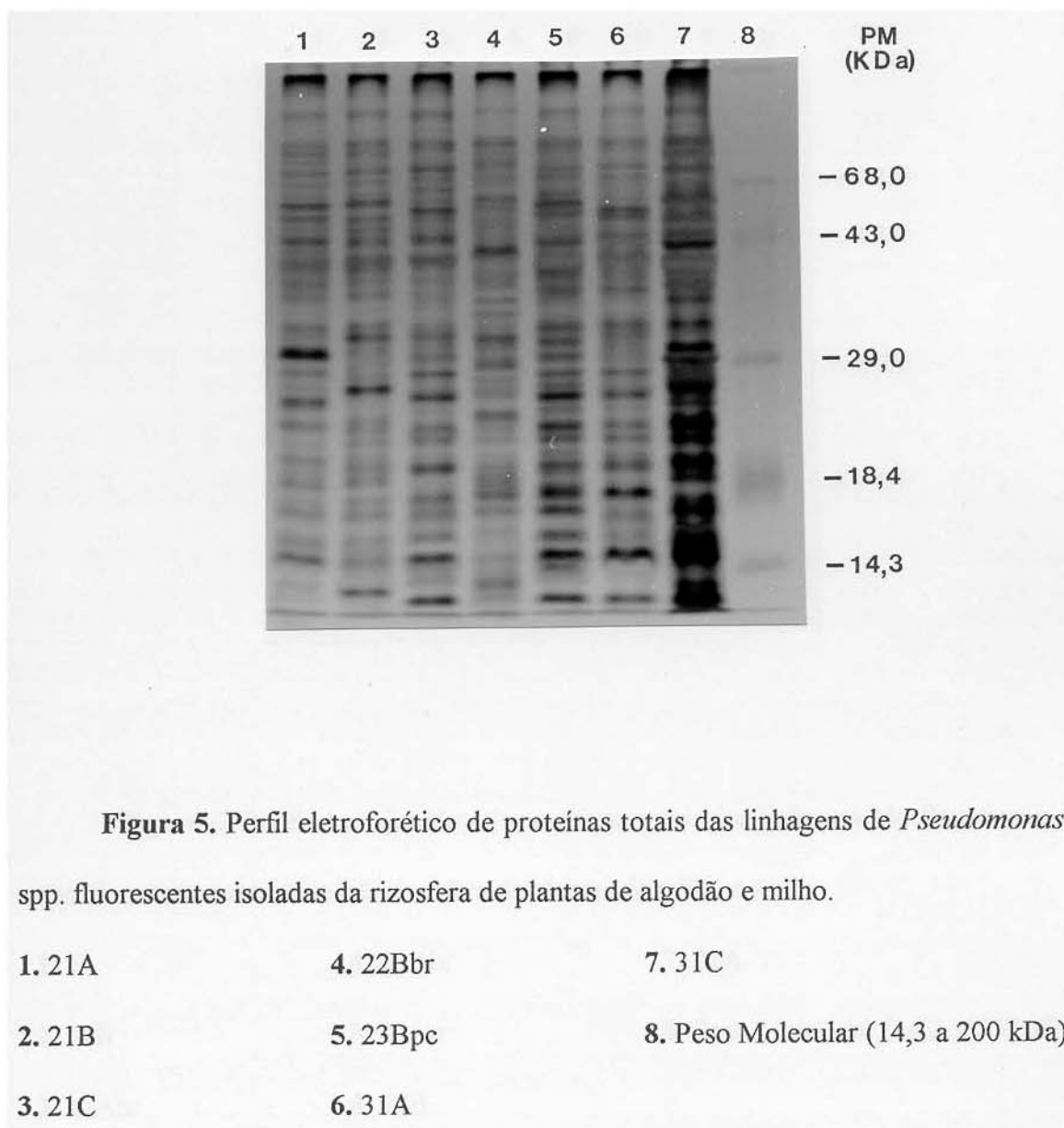
Figura 4. Perfil de RFLP do rDNA 16S das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes amplificadas por PCR e digeridas com as diferentes enzimas de restrição.

1. rDNA 16S da linhagem 42A íntegro
2. rDNA 16S da linhagem 34B digerida com *EcoR* I
3. rDNA 16S da linhagem 34B digerida com *Sma* I
4. rDNA 16S da linhagem 34B digerida com *Hae* III
5. rDNA 16S da linhagem 42A digerida com *Hae* III
6. Peso Molecular (escada 100 pb)

4.4 Análise do Perfil de Proteínas Totais

A análise visual do perfil de proteínas totais em SDS-PAGE 12,5 % indicou a presença de diferentes padrões nas linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes com subunidades protéicas que variaram de 10 a 90 kDa (Figuras 5 e 6). A maioria das linhagens apresentaram perfis de proteínas distintos. Perfis de proteínas totais semelhantes foram encontrados entre as linhagens 23C, 23Agr, 23Als, 23BlS e 23Bpc (Figura 5, canaleta 5); 41C e 42A (Figura 6, canaleta 7); 22Abr e 21B (Figura 5, canaleta 2); 41Abr, 41Atr e 42 B (Figura 6, canaletas 4, 5 e 6, respectivamente); 22Bbr (Figura 5, canaleta 4) e 34Abr (Figura 6, canaleta 3).

A análise numérica dos perfis de proteínas totais utilizando-se o programa Gel Manager permitiu a determinação do grau de similaridade entre as linhagens estudadas (Figura 7). O dendrograma revelou cinco grupos com aproximadamente 80 % de similaridade e apenas duas linhagens, 21A e 23 C, não foram agrupadas.



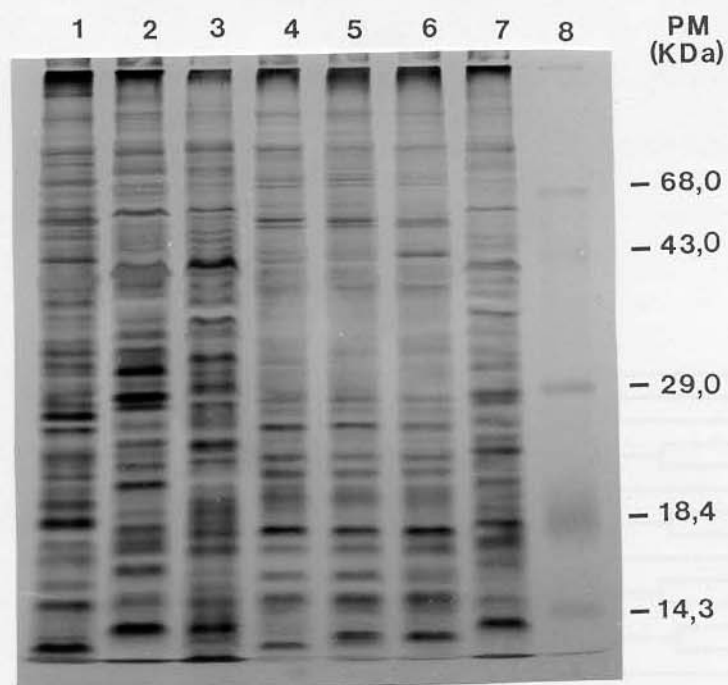


Figura 6. Perfil eletroforético de proteínas totais das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de plantas de milho e soja.

1. 33	4. 41Abr	7. 42A
2. 34B	5. 41Atr	8. Peso Molecular (14,3 a 200 kDa)
3. 34Abr	6. 42B	

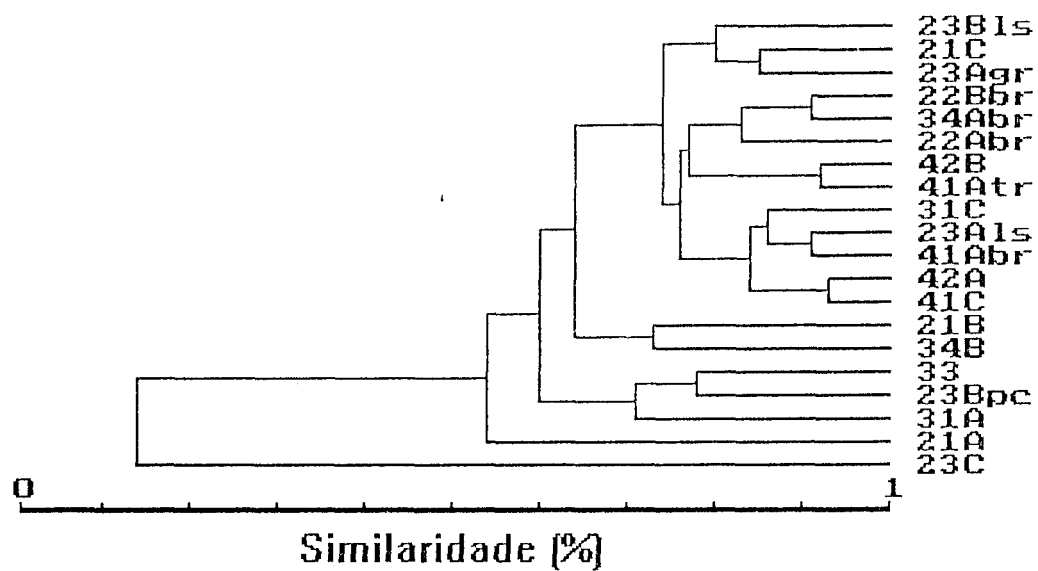


Figura 7. Dendrograma representando a relação entre as linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes baseado no perfil de proteínas totais em SDS-PAGE (12,5 %).

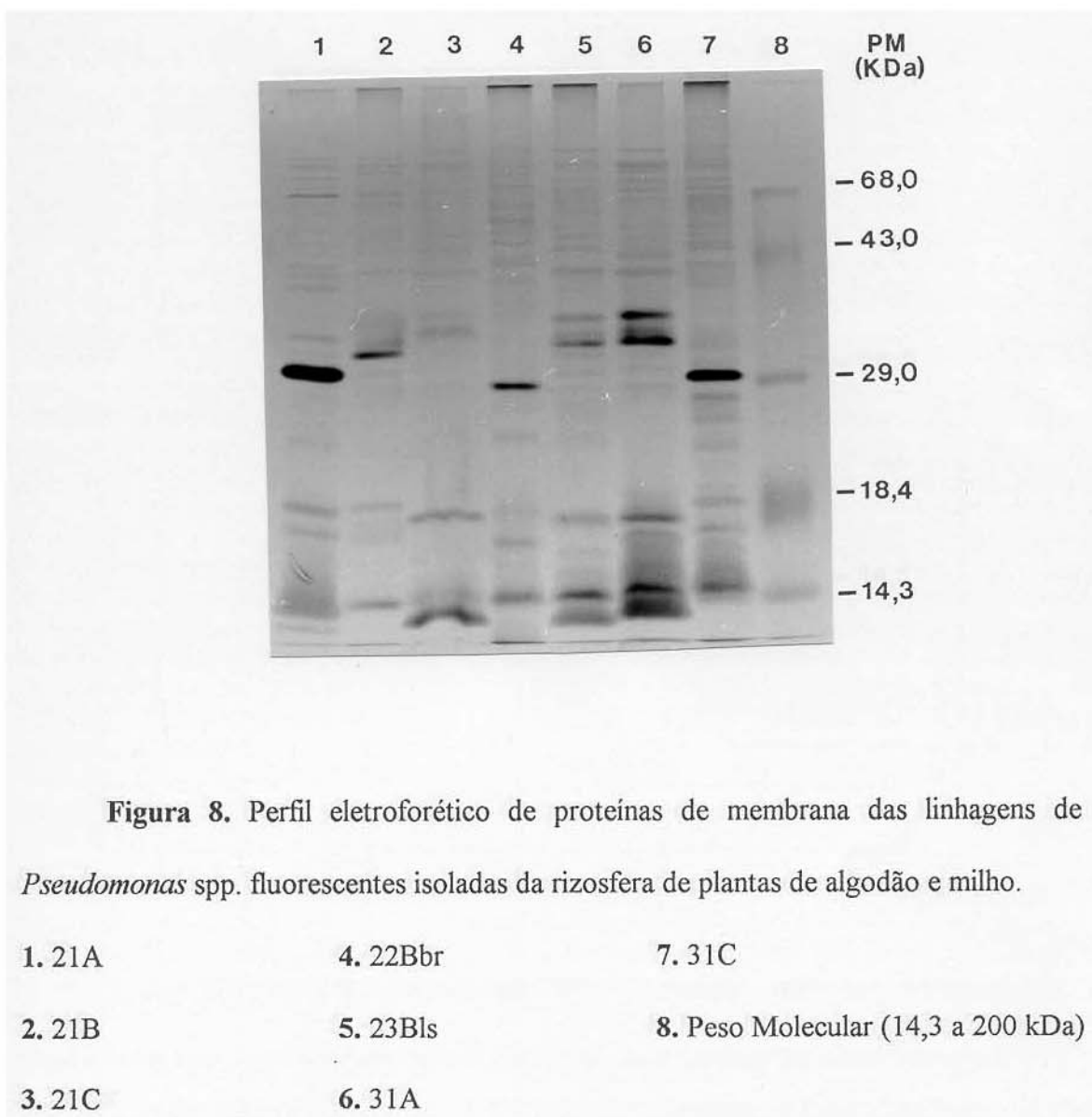
4.5 Análise do Perfil das Proteínas de Membrana

A análise visual do perfil de proteínas de membrana em SDS-PAGE 12,5 % indicou a presença de diferentes padrões nas linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes com subunidades protéicas que variaram de 10 a 90 kDa (Figuras 8 e 9). A maioria das linhagens apresentaram perfis de proteínas de membrana distintos. A linhagem 22Abr apresentou um perfil de proteínas de membrana correspondente ao da linhagem 21B (Figura 8, canaleta 2). As linhagens 23C, 23Agr, 23Als e 23Bpc apresentaram perfis de proteínas de membrana semelhantes ao da linhagem 23BlS (Figura 8, canaleta 5). As linhagens 41C e 42A também apresentaram perfis de proteínas de membrana semelhantes (Figura 9, canaleta 7).

A Figura 10 é um dendrograma representando a análise dos perfis de proteínas de membrana utilizando-se o programa Gel manager e indicando as relações de semelhança entre as linhagens estudadas. O dendrograma revelou dois grupos distintos (A e B, Figura 10) definidos em nível de similaridade de aproximadamente 25 %.

As linhagens 23Agr, 23Bpc, 23Als, 23BlS e 23C constituem o subgrupo A_I, com 75 % de similaridade. As linhagens 22Abr, 21B e 33 constituem o subgrupo A_{II}, com aproximadamente 80 % de similaridade. As linhagens 42B, 41Abr e 41Atr constituem o subgrupo A_{III}, com aproximadamente 72 % de similaridade. As linhagens 31A e 21C também pertencem ao grupo A, mas apresentam perfis de proteínas de membrana distintos quando comparados com as outras linhagens dos subgrupos A_I, A_{II} e A_{III}.

O grupo B está subdividido em dois subgrupos. No subgrupo B_I encontram-se as linhagens 22Bbr, 34Abr e 34B, com aproximadamente 78 % de similaridade. As linhagens 42A, 21A e 31C pertencem ao subgrupo B_{II}, mas apresentam perfis de proteínas de membrana distintos, sendo relacionadas em nível de similaridade de apenas 54 %. A linhagem 41C não foi analisada quanto ao perfil de proteínas de membrana.



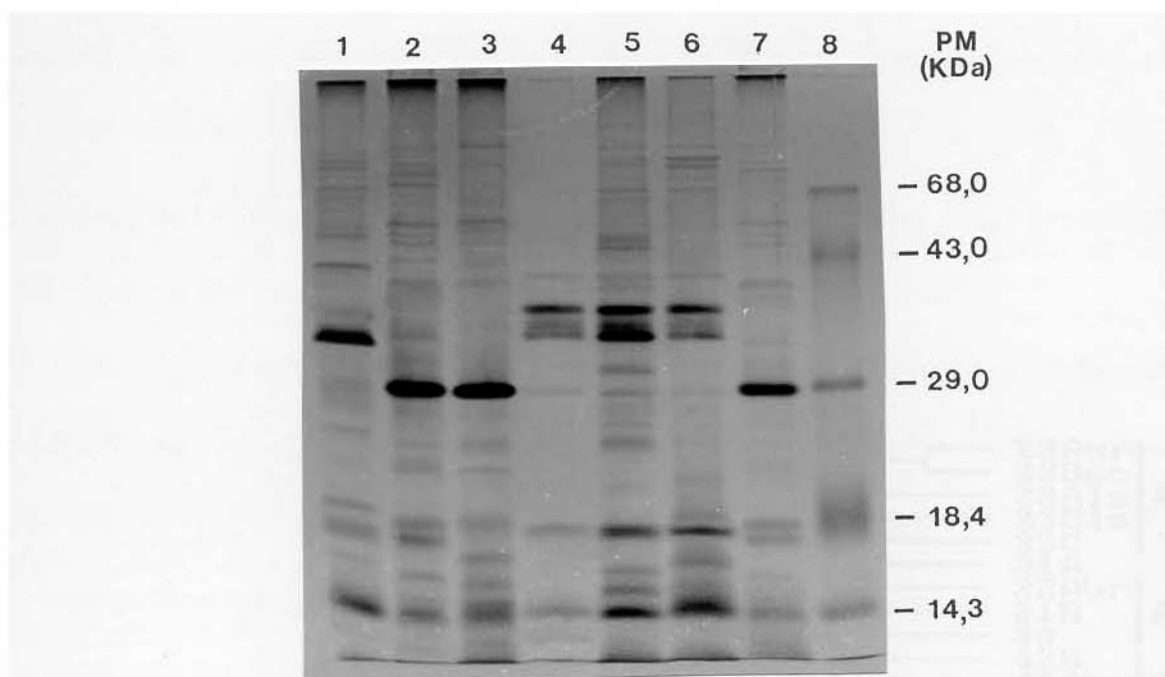


Figura 9. Perfil eletroforético de proteínas de membrana das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de plantas de milho e soja.

1. 33	4. 41Abr	7. 42A
2. 34B	5. 41Atr	8. Peso Molecular (14,3 a 200 kDa)
3. 34Abr	6. 42B	

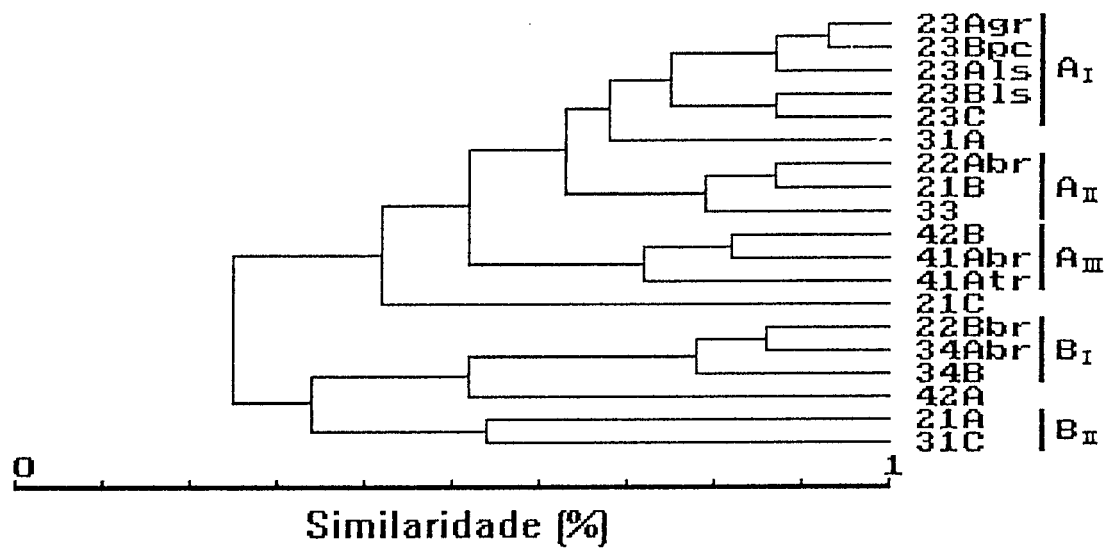


Figura 10. Dendrograma representando a relação entre as linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes baseado no perfil de proteínas de membrana em SDS-PAGE (12,5 %).

4.6 Análise da Distância Genética pela Mobilidade de Enzimas

A eletroforese de isoenzimas dos extratos bacterianos de *Pseudomonas* spp. fluorescentes em gel de amido foi negativa para as enzimas LDH, BDH, α -GDH, MDH, PGI e LAP dentro das condições utilizadas. O perfil de mobilidade para as demais enzimas (PGM, IDH, α -EST, β -EST e ME) indicou que todas foram polimórficas (Tabela VII). Foram identificados 17 tipos eletroforéticos (ETs) e a maioria difere um do outro em pelo menos três loci (Tabela VII).

A diversidade genotípica (h) para cada locus enzimático foi determinada pela fórmula $h = 1 - \sum x_i^2 [n/n-1]$, onde x_i é a frequência do alelo no locus, n é o número de isolados ou ETs e $n/n-1$ é a correção para pequenas amostragens (Tabela VIII). A diversidade entre os loci foi de 0,40 representada pela média aritmética de h .

A relação de similaridade entre os 17 tipos eletroforéticos (ETs) das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes está representada na Figura 11. As linhagens 23Agr, 23Als, 23Bls e 23Bpc não apresentaram diferenças entre os loci enzimáticos. A menor distância genética (0,19) corresponde à diferença em apenas um locus enzimático, verificada entre as linhagens 21C e 22Abr, 31A e 42B, 41Abr e 41Atr, 22Bbr e 34Abr para diferentes loci enzimáticos. Distâncias maiores correspondem a diferenças entre mais de um locus enzimático.

Tabela VII. Perfil de alelos para 5 loci enzimáticos em 17 ETs de linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

ETs	Linhagens	Alelomorfos para os loci enzimáticos				
		PGM	IDH	α EST	β EST	ME
1	21A	5	1	3	1	2
2	21B	6	1	0	0	2
3	21C	6	2	2	1	2
4	22Abr	6	1	2	1	2
5	22Bbr	3	0	0	0	0
6	23C	5	1	2	1	3
7	23Agr, 23Als, 23BlS 23Bpc	4	1	2	1	2
8	31A	4	1	2	0	1
9	31C	2	1	2	1	1
10	33	0	0	2	1	2
11	34B	1	1	2	5	0
12	34Abr	2	0	0	0	0
13	41C	1	1	1	0	0
14	41Abr	3	1	2	2,4	4
15	41Atr	5	1	2	2,4	4
16	42A	5	1	1	1,3	4
17	42B	4	1	2	0	0

Tabela VIII. Frequência de alelomorfos para os locus enzimáticos nas linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

Locus Enzimático	Frequência de alelomorfos						h
	1	2	3	4	5	6	
PGM	0,11	0,11	0,11	0,31	0,21	0,15	0,79
IDH	0,94	0,06					0,06
α -EST	0,12	0,82	0,06				0,27
β -EST	0,79	0,14	0,06				0,30
ME	0,13	0,60	0,07	0,20			0,55

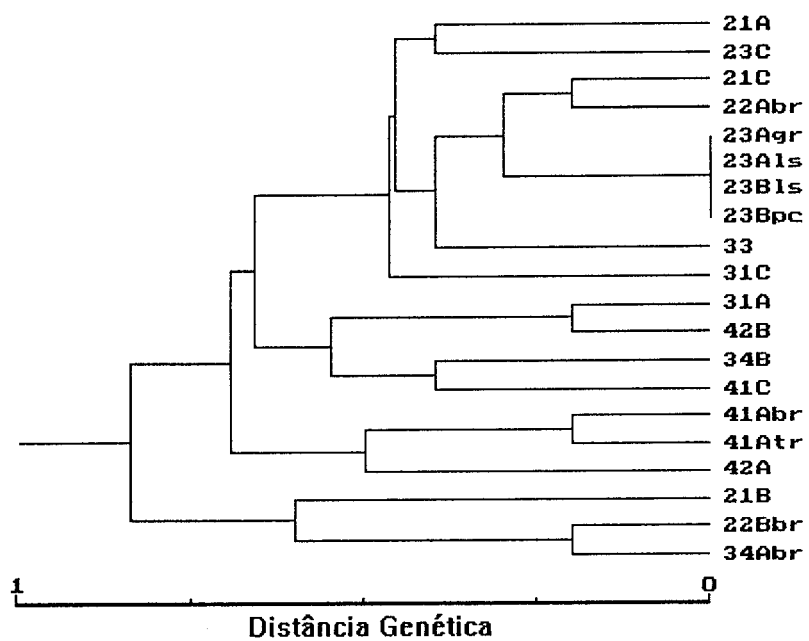


Figura 11. Dendrograma representando a distância genética entre as linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes a partir de perfis de mobilidades enzimáticas.

4.7 Sorotipagem

Os resultados da aglutinação dos anti-soros polivalentes com as linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes encontram-se na Tabela IX. As linhagens 31A e 42A foram negativas para todos os anti-soros testados. O padrão de aglutinação das linhagens 21A, 23Agr, 23Als, 23BlS e 23Bpc foi o mesmo para todos os anti-soros polivalentes, com reação positiva somente para o anti-soro anti-21A. As linhagens 21A, 23C e 33 reagiram positivamente somente com seus respectivos anti-soros. O mesmo padrão de aglutinação foi apresentado pelas linhagens 33 e 31C, com reação positiva para o anti-soro anti-33. As linhagens 34B e 41C reagiram fortemente com todos os anti-soros testados. A linhagem 41Atr não foi testada com os anti-soros polivalentes.

A Figura 12 representa a análise numérica dos resultados obtidos na sorotipagem indicando a o grau de similaridade entre as linhagens estudadas. O dendrograma revelou dois grupos distintos com aproximadamente 60 % de similaridade.

Tabela IX. Aglutinação com anti-soros polivalentes.

Linhagens	Anti-soro Polivalente					
	controle ^(a)	anti-21A	anti-22Bbr	anti-23C	anti-33	anti-41C
Bacterianas						
21A	-	+	-	-	-	-
21B	-	-	-	-	-	++
21C	+/-	-	-	-	-	++
22Abr	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
22Bbr	+/-	+	+++	+/-	+/-	+/-
23C	-	-	-	+++	-	-
23Agr	-	+	-	-	-	-
23Als	-	+	-	-	-	-
23BlS	-	+	-	-	-	-
23Bpc	-	+	-	-	-	-
31A	-	-	-	-	-	-
31C	-	-	-	-	+	-
33	-	-	-	-	+	-
34B	+	+	++	+	+	+++
34Abr	+/-	+/-	++	-	-	-
41C	+	+	++	+	+	+++
41Abr	-	-	+/-	+/-	+	+/-
42A	-	-	-	-	-	-
42B	-	-	+/-	-	+/-	+/-

^(a) Controle - soro de coelho não imunizado.

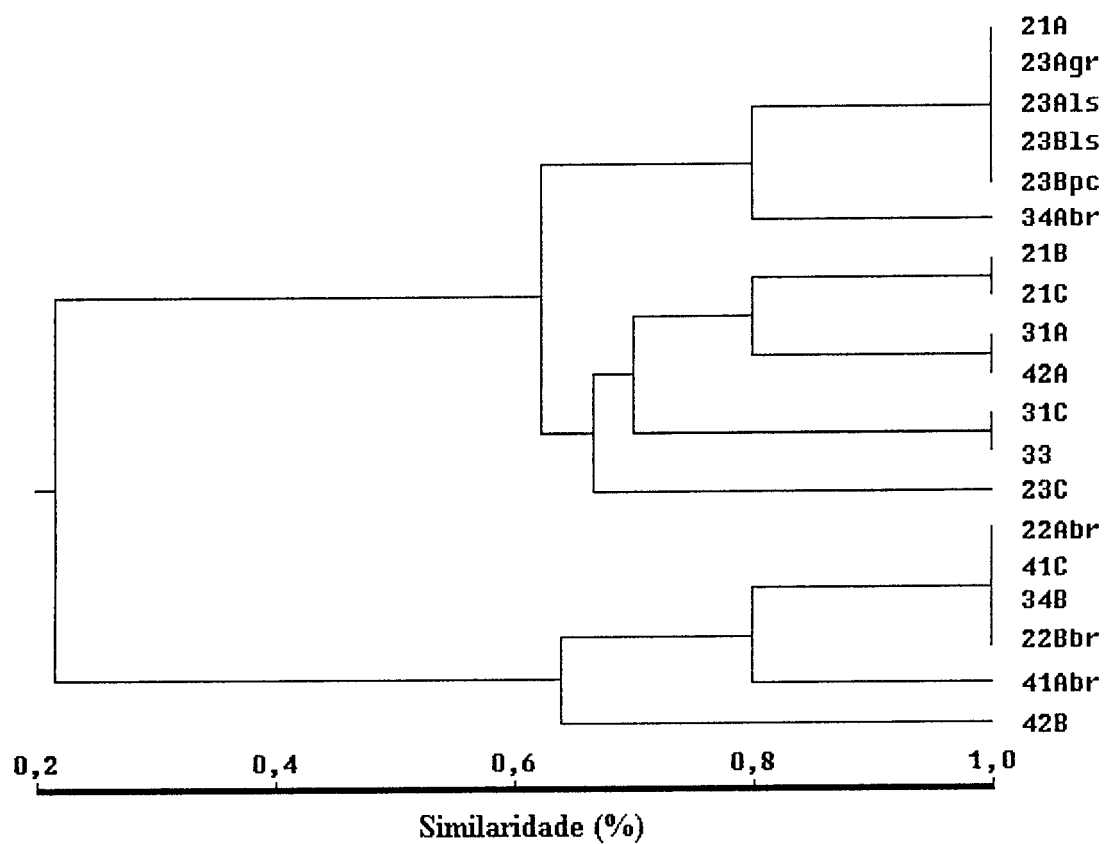


Figura 12. Dendrograma representando a similaridade entre as linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes quanto a comparação sorológica.

4.8 Produção de Bacteriocina

Os resultados de produção de bacteriocina pelas linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes no meios de cultura B de King encontra-se na Tabela X.

No meio B de King, as linhagens 22Abr, 22Bbr, 23C, 31A, 31C, 34B, 41C, 41Atr e 42A foram negativas quanto à produção de bacteriocina em meio B de King (Tabela X). As linhagens 21B e 21C apresentaram o mesmo padrão de bacteriocina em relação às linhagens indicadoras. A linhagem 23Bpc apresentou sensibilidade às bacteriocinas produzidas pelas as linhagens 34Abr e 41Abr. As linhagens 23Agr, 23Als, 23BlS e 23Bpc apresentaram padrões semelhantes quanto à produção de bacteriocina.

A Figura 13 representa a análise numérica dos resultados obtidos na produção de bacteriocina indicando a o grau de similaridade entre as linhagens estudadas. O dendrograma revelou quadro grupos distintos com similaridade de aproximadamente de 80 % a 95 %.

Tabela X. Produção de bacteriocina pelas amostras de *Pseudomonas* spp. fluorescentes em meio B de King.

Amostras		Amostras Indicadoras																			
Produtoras	21A	21B	21C	22Abr	22Bbr	23C	23Agr	23Als	23Bls	23Bpc	31A	31C	33	34B	34Abr	41C	41Abr	41Atr	42A	42B	22R80 ^(a)
21A	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
21B	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
21C	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
22Abr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22Bbr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23Agr	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
23Als	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
23Bls	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
23Bpc	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
31A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
34B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34Abr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
41C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41Abr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
41Atr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42B	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-

^(a) Amostra *Escherichia coli* 22R80 sensível a todas as bacteriocinas de *E. coli*.

^(b) + Produção de halo de inibição frente à amostra indicadora.

^(c) - Não produção de halo de inibição frente à amostra indicadora.

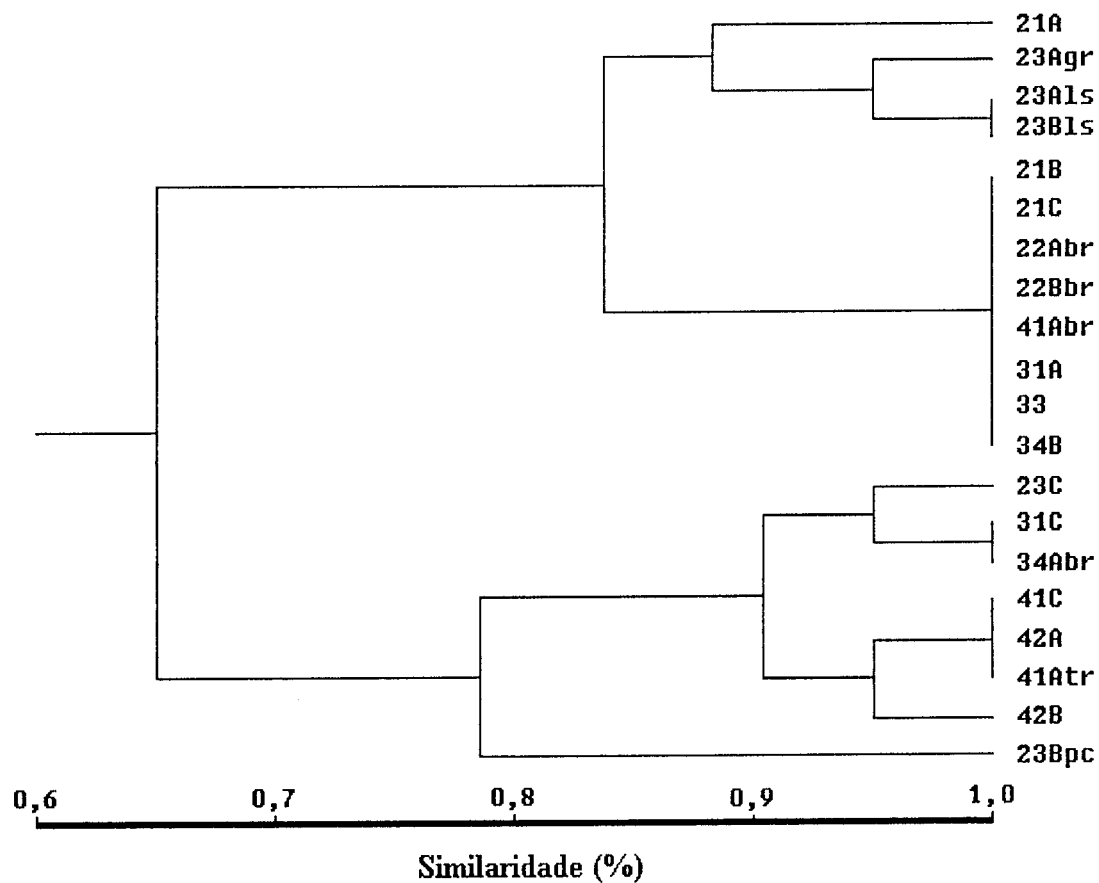


Figura 13. Dendrograma representando a similaridade entre as linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes quanto a produção de bacteriocina.

5. Discussão

Os estudos envolvendo *Pseudomonas* spp. fluorescentes associados a plantas abordam, principalmente, os benefícios que as bactérias pertencentes a este grupo podem exercer sobre o desenvolvimento de culturas agrícolas (O'Sullivan & O'Gara, 1992).

Em geral, bactérias promotoras de crescimento de plantas expressam características relacionadas à colonização da rizosfera resultando no controle de doenças em plantas, tal como sideróforos, produção de antibióticos e produção de ácido cianídrico.

Um aspecto importante no estudo de *Pseudomonas* spp. fluorescentes associadas a plantas é a caracterização e análise da diversidade genotípica e fenotípica de linhagens isoladas em diferentes espécies de plantas em diferentes habitats. A determinação da diversidade dos organismos encontrados nestas associações é um primeiro passo nos estudos que visam a aplicação destes organismos no melhoramento da produção agrícola das plantas com as quais mantém uma relação benéfica.

No presente estudo, a caracterização de linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de plantas de algodão, milho e soja foi realizada empregando-se uma abordagem polifásica, a qual incluiu métodos tradicionais, como sorotipagem, produção de bacteriocina e isoenzimas; e métodos moleculares, como análises de ácidos nucleicos por RAPD, ribotipagem, polimorfismo do rDNA 16S e análises de proteínas totais e de membrana.

Os resultados obtidos demonstraram a diversidade genotípica e fenotípica das linhagens *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de plantas das culturas analisadas. Esta diversidade foi evidenciada tanto entre as linhagens isoladas na mesma cultura agrícola como entre as linhagens isoladas de culturas agrícolas diferentes.

Os resultados obtidos pela análise da ribotipagem das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes revelaram doze ribotipos diferentes, embora somente quatorze linhagens puderam ser comparadas, pois as linhagens 21A, 22Bbr, 23Als, 31C e 41C não apresentaram padrão de bandas de restrição do DNA genômico (Figura 1). Esses resultados foram suficientes para comparar a distribuição dos sítios de restrição da enzima *Pvu* II no DNA cromossomal das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes estudadas, mostrando a diversidade entre as linhagens isoladas de uma mesma planta. As linhagens 21B e 21C, dos ribotipos A e B, respectivamente, apresentam fragmentos hibridizados em comum, entretanto o ribotipo A (21B) apresentou três bandas de tamanhos maiores indicando a diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas na mesma planta (Figura 1). Resultados semelhantes foram verificados nos ribotipos D (linhagens 23C, 23Bls e 23Bpc) e E (linhagem 23Agr); e as linhagens 42A e 42B dos ribotipos K e L, respectivamente (Figura 1). As semelhanças ocorreram entre as linhagens isoladas da mesma planta na rizosfera de algodão ou de soja.

Atualmente, a ribotipagem é um método que possui muitas vantagens na determinação da variabilidade intra-específica, sendo a maior delas, o uso de sondas com amplo espectro, tais como as sondas de genes do rDNA, pois a maioria dos microrganismos possui múltiplas cópias do “operon” ribossomal. Entretanto, essa

técnica apresenta uma metodologia relativamente complexa e exige muito tempo para sua realização, trazendo desvantagens na sua utilização. Apesar disso, apresenta grande sensibilidade, o que assegura a diferenciação entre linhagens isoladas da mesma planta, indicando com certeza as linhagens que apresentam o mesmo número de cópias dos genes do rDNA e linhagens que são diferentes, confirmando a variabilidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes em um mesmo ambiente.

Recentemente, a amplificação de ácidos nucléicos pelo PCR foi o processo que revolucionou muitos procedimentos na biologia molecular, incluindo os métodos relacionados à identificação e tipagem de microrganismos. A simples amplificação de fragmentos específicos com o uso de oligonucleotídeos arbitrários permite a comparação de muitas linhagens de microrganismo em um único gel (Haase *et al.*, 1995). Essa variação da técnica de PCR, denominada RAPD, utilizada neste estudo mostrou a variabilidade das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas de diferentes culturas agrícolas. Embora os oligonucleotídeos OPR 1 e OPR 7 não tenham permitido a distinção entre as linhagens estudadas, os resultados obtidos com os oligonucleotídeos OPR 2, OPR 8 e OPR 13 revelaram perfis de fragmentos diferentes (Figuras 2 e 3). A diferenciação nos perfis de bandas ocorreu entre isolados obtidos da rizosfera de uma mesma planta em todas as culturas agrícolas estudadas. O perfil de bandas exatamente igual para todas as linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes encontrado para os oligonucleotídeos OPR 1 e OPR 7 sugere que esses oligonucleotídeos amplificaram seqüências de mesmo tamanho, comuns aos genomas bacterianos analisados. Por outro lado, os oligonucleotídeos OPR 2, OPR 8 e OPR 13 permitiram a amplificação de outras regiões do DNA, mostrando a diferença nos perfis

de bandas como resultado da diversidade genética entre as linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de diferentes culturas agrícolas.

Os fragmentos amplificados pelo oligonucleotídeo OPR 2 (Figura 2) mostraram um número maior de padrões de bandas distintos para as linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes quando comparados com os padrões de bandas obtidos para os oligonucleotídeos OPR 8 e OPR 13 (Figura 3). Os fragmentos amplificados com o oligonucleotídeo OPR 2 demonstraram a diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes em linhagens isoladas da mesma planta, como verificado na Figura 2 , linhagens 21A e 21 C; e linhagens 34B e 34Abr. Por outro lado, a amplificação de fragmentos utilizando o oligonucleotídeo OPR 2, mostrou também a similaridade genética entre as amostras 22Bbr e 34B, isoladas de culturas agrícolas diferentes, algodão e milho, respectivamente; e a similaridade entre as amostras 41C e 42A isoladas de plantas diferentes da cultura de soja.

Os resultados obtidos com o oligonucleotídeo OPR 8 mostraram a diversidade genética entre as linhagens 23Bls e 23Bpc de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas da mesma planta, embora os resultados da ribotipagem tenham mostrado que tais linhagens sejam iguais. Esses resultados justificam o uso de vários métodos na caracterização e identificação de microrganismos e estudos taxonômicos.

A simplicidade e rapidez na método de RAPD torna-o mais eficiente nos estudos epidemiológicos e pode permitir uma análise mais fina da diversidade genética quando comparado à ribotipagem. Na técnica de RAPD, podemos comparar vários perfis de fragmentos de diferentes linhagens amplificados com oligonucleotídeos distintos.

Outra variação da técnica de PCR é a digestão dos fragmentos amplificados com enzimas de restrição resultando em um padrão específico de bandas para as linhagens estudadas. O polimorfismo do rDNA 16S tem sido muito utilizado na identificação de vários microrganismos patogênicos e estudos taxonômicos (Grimont & Grimont, 1986; Scieux *et al.*, 1992). O polimorfismo do rDNA 16S é um método relativamente simples para utilização em estudos de diversidade, entretanto, os resultados dependem do grupo de organismos estudados, sendo mais adequado para estudos de microrganismos em nível de espécie e acima.

No presente estudo, o produto amplificado foi o rDNA 16S das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, seguido da digestão com as enzimas de restrição *EcoR* I, *Sma* I e *Hae* III. As enzimas *EcoR* I e *Hae* III (Figura 4, canaletas 2, 4 e 5) resultaram em pouco polimorfismo entre as linhagens estudadas. As linhagens isoladas de culturas diferentes, algodão (22Bbr) e milho (34B e 34Abr), apresentaram o mesmo padrão de restrição para todas as enzimas. Estes resultados podem ser explicados pelo alto grau de conservação dos genes ribossomais em microrganismos.

O padrão de digestão com a enzima *Hae* III gerou fragmentos de baixo peso molecular com a perda daqueles cujo tamanho é menor do que o poder de resolução do gel. Este resultado pode ser explicado devido ao sítio de restrição desta enzima, que reconhece e corta o DNA na sequência de quatro bases, GGCC. Resultados semelhantes foram observados por Picard *et al.* (1994) estudando a heterogeneidade genética de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

A análise do perfil de proteínas permite a comparação de microrganismos para fins de identificação e estudos epidemiológicos. Esta técnica pode ser aplicada para a identificação de microrganismos em espécie e,

particularmente, a comparação entre microrganismos da mesma espécie constitui o conceito de subtipagem, pois este método revela diferenças mínimas no número e tipo de subunidades protéicas das linhagens estudadas, sendo comparado com o grau de discriminação taxonômica determinado através da análise de hibridização de DNA (Towner & Cockayne, 1993).

A análise visual do perfil de subunidades protéicas das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes obtidos de células inteiras mostraram concordância com as análises moleculares estudadas pela ribotipagem, RAPD e polimorfismo do rDNA 16S. Do mesmo modo, as linhagens 23Agr, 23Als, 23Bls e 23Bpc foram agrupadas devido às semelhanças nos perfis de proteínas totais. Perfis semelhantes foram encontrados entre as linhagens 22Bbr e 34Abr, embora estas tenham sido isoladas de culturas agrícolas diferentes, algodão e milho, respectivamente. Semelhanças também foram observadas entre as linhagens 41C e 42A, em plantas diferentes de cultura de soja.

A análise numérica dos perfis das subunidades protéicas totais mostrou grande diversidade entre as linhagens estudadas. Maior similaridade ocorreu entre as linhagens 42A e 41C; 42B e 41Atr; 22Bbr e 34Abr; 23Als e 41Abr, isoladas de rizosferas de culturas agrícolas diferentes (Figura 7). Embora os resultados obtidos na análise numérica análise numérica dos perfis de bandas das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, analisados quanto à presença de bandas e a intensidade das mesmas, não concordem com a análise visual dos perfis das subunidades proteicas, ambas mostram a diversidade entre as linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Essa diferença pode ser devido a grande quantidade de subunidades protéicas resultantes na extração das proteínas totais, o que dificulta a análise pelo programa GelManager.

A diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes encontrada na análise de proteína totais pode ser explicada pelas diferentes condições do solo e das plantas em questão. As “rizobactérias promotoras de crescimento de plantas” (RPCPs) expressam proteínas comuns relacionadas à colonização da rizosfera que dependem do tipo de solo e da interação com outros microrganismos presentes no ambiente e com a planta. Resultados semelhantes foram observados por Vlassak *et al.* (1992) em estudos com *Pseudomonas* spp. fluorescentes para culturas agrícolas de arroz e banana.

A análise de proteínas de membrana em eletroforese de SDS-PAGE é um método relativamente simples e não necessita de equipamentos sofisticados. Essas vantagens permitiram o uso desse método na identificação de muitos microrganismos, principalmente, em estudos epidemiológicos (Baremkanp *et al.*, 1981; Achtman *et al.*, 1983; Achtman & Pluschke, 1986; Musser *et al.*, 1987; Olyhoek *et al.*, 1987; Bundoc & Barbour, 1989; Valvano & Marolda, 1991). Devemos ressaltar que nesta análise a comparação entre as linhagens refere-se apenas à expressão de determinadas proteínas envolvidas, principalmente, na colonização e competição para o estabelecimento de *Pseudomonas* spp. fluorescentes na rizosfera das plantas. Assim, os perfis de proteínas de membrana obtidos demonstraram cinco grupos distintos. O grupo BI, determinado pela análise numérica, reuniu as linhagens 22Bbr, 34B e 34Abr, que apresentaram o mesmo perfil de fragmentos na análise genotípica pelo polimorfismo do rDNA 16S. A análise numérica dos perfis de subunidades protéicas de membrana mostrou diversidade entre as linhagens estudadas. A diversidade ocorreu entre as linhagens isoladas na mesma cultura agrícola (Figura 10, grupo AIII) e entre culturas agrícolas diferentes (Figura 10, grupo BII).

A análise de proteínas baseada na eletroforese de várias enzimas tem sido muito utilizada em estudos de variabilidade genética em populações naturais de microrganismos (Selander *et al.*, 1986). Esse método apresenta a vantagem da análise de várias enzimas expressas por um organismo e a possibilidade de comparação do perfil de alelos para um conjunto de enzimas entre muitos organismos. Linhagens com o mesmo perfil de alelos para um conjunto de enzimas pertencem a um tipo eletroforético (ET) característico. O resultado para a análise de eletroforese de várias enzimas para as linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes revelou dezessete ETs distintos entre as vinte linhagens analisadas. A diversidade presente entre as linhagens estudadas pode ser um indicativo da diferenciação de nichos dos quais cada linhagem foi isolada. A comparação dos perfis de mobilidade das enzimas permitiu o cálculo de distância genética das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes ou o grau de similaridade entre as mesmas. Assim, as linhagens 23Agr, 23Als, 23BlS e 23Bpc são consideradas idênticas para os *loci* enzimáticos estudados.

A sorotipagem é um método bastante eficiente e complementar na identificação de microrganismos, principalmente, na distinção de gêneros e espécies para muitos grupos (Lányi & Bergan, 1978; Ewing, 1986; Traub, 1989; Burke *et al.*, 1990; Moyses & Young, 1991; Mills *et al.*, 1991). Os resultados obtidos através da reação de aglutinação com cinco anti-soros polivalentes diferentes indicaram que as linhagens isoladas da mesma planta apresentaram variação no padrão de aglutinação (Tabela VIII), confirmando a diversidade verificada em outros métodos utilizados neste estudo. O dendrograma (Figura 12) obtido com a análise do padrão de aglutinação para os diferentes anti-soros pelo programa NTSYS-pc confirmou a diversidade das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, separando-as em dois

grupos (Figura 12). A análise mostrou 100 % de similaridade para as linhagens 23Agr, 23Als, 23BlS e 23Bpc isoladas da rizosfera da mesma planta confirmando os resultados obtidos na análise de polimorfismos do rDNA 26S, proteínas, isoenzimas e produção de bacteriocinas. As linhagens 22Bbr e 34B isoladas da rizosfera de plantas diferentes algodão e milho, respectivamente, apresentaram 100 % de similaridade na sorotipagem, RAPD, polimorfismo do rDNA 16S e análise de proteínas. As linhagens 22Abr, 22Bbr, 34B e 41C isoladas de culturas agrícolas diferentes, também, foram semelhantes quanto à sorotipagem. Por outro lado, o resultado da comparação sorológica da linhagem 23C com o grupo 23Agr, 23Als, 23BlS e 23Bpc mostrou a diversidade fenotípica entre linhagens isoladas da mesma planta na cultura de algodão (Figura 12). Resultados semelhantes foram verificados entre as linhagens 34Abr e 34B na cultura de milho e as linhagens 41Abr e 41C na cultura de soja (Figura 12).

A produção de bacteriocinas tem sido usada como característica auxiliar na identificação de diversos grupos de microrganismos, principalmente, *Pseudomonas* (Govan & Harris, 1985) e membros de Enterobacteriaceae (Gillies, 1978). Neste estudo, a análise da produção de bacteriocina confirma a diversidade entre as linhagens 23Agr, 23Als, 23Bpc isoladas da mesma planta na cultura do algodão.

Os resultados obtidos com as análises fenotípicas e genotípicas indicaram que as linhagens isoladas na mesma planta apresentaram características muito semelhantes, podendo por alguns métodos serem consideradas linhagens idênticas. Frequentemente, o método SDS-PAGE é utilizado em combinação com outras técnicas, tais como sorotipagem e eletroforese de isoenzimas na identificação de microrganismos (Sibold *et al.*, 1992). As linhagens 23Agr, 23Als, 23BlS e 23Bpc

apresentaram resultados bastante semelhantes para a análise do perfil de proteínas totais e de membrana, eletroforese de várias enzimas, sorotipagem e polimorfismo do rDNA 16S, mas apresentaram diferenças quanto a ribotipagem, RAPD e produção de bacteriocinas. As linhagens 41Abr e 41Atr, também, mostraram-se bastante semelhantes na ribotipagem, RAPD, polimorfismo do rDNA 16S, análise do perfil de proteínas de membrana e eletroforese de várias enzimas e suas diferenças foram representadas, somente pela produção de bacteriocina.

Os resultados de RAPD com os oligonucleotídeos iniciadores OPR 2, OPR 2 e OPR 13, ribotipagem, perfis eletroforéticos de proteínas totais e de membrana e análise eletroforética para várias enzimas mostraram-se mais sensíveis na distinção entre as linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Resultados semelhantes foram observados por Wang *et al.* (1993) na comparação entre os métodos, RAPD e eletroforese de enzimas, para linhagens de *Escherichia coli*, entretanto, RAPD mostrou-se mais sensível detectando diferenças mínimas entre os isolados.

As linhagens 22Bbr, 34B e 34Abr foram isoladas de culturas agrícolas diferentes e apresentaram semelhanças quando analisadas por RAPD com o oligonucleotídeo iniciador OPR 2, polimorfismo do 16S, perfil de proteínas de membrana e eletroforese com várias enzimas. Estes resultados indicam que estas linhagens podem pertencer a um mesmo táxon, onde a conservação de genes permite a colonização da raiz de diferentes plantas.

Os resultados obtidos reforçam o uso de métodos moleculares na identificação de microrganismos associados as plantas, podendo auxiliar na escolha de linhagens para futuros estudos aplicados no melhoramento da produção de culturas

agrícolas. Também mostrou que a associação de vários métodos na caracterização de microrganismos assegura a identificação e, a escolha dos métodos depende da disponibilidade técnica, custo, tempo para a realização e o grupo de organismos em questão.

Neste trabalho, todos os métodos utilizados indicaram a diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas da rizosfera de culturas agrícolas, entretanto, os métodos de análise de ácidos nucléicos, principalmente a ribotipagem e o RAPD, forneceram mais informações na caracterização de linhagens obtidas de uma mesma planta.

6. Conclusão

A partir da análise dos resultados obtidos na caracterização de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, através de métodos tradicionais e moleculares, foi possível concluir que:

- *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas de rizosferas de culturas de algodão, milho e soja representam um grupo heterogêneo de microrganismos com diversidade fenotípica e genotípica.
- Análises fenotípicas, incluindo a determinação do perfil eletroforético de isoenzimas, sorotipagem e produção de bacteriocinas, demonstraram a diversidade entre as linhagens isoladas da rizosfera de uma mesma planta de milho (34B e 34Abr) e de uma mesma planta de algodão (21A, 21B e 21C).
- Análises moleculares de ácidos nucleicos, incluindo a ribotipagem e RAPD, e do perfil de proteínas totais e de membrana, demonstraram a diversidade de *Pseudomonas* spp. fluorescentes isoladas da rizosfera da mesma planta para as culturas de algodão (21A, 21B e 21C; 23Bls e 23Bpc), milho (34B e 34Abr) e soja (42A e 42B).
- Análises de polimorfismo do rDNA 16S e de RAPD (OPR 2) resultaram na identificação de um mesmo genótipo bacteriano para algumas linhagens isoladas da rizosfera de plantas de culturas de algodão (22Bbr) e milho (34B).

- Análises fenotípicas e genotípicas indicaram que as linhagens isoladas de uma mesma planta apresentaram características muito semelhantes, podendo, por alguns métodos de caracterização, serem consideradas linhagens idênticas (41C e 42A).
- Análises de ácidos nucléicos, principalmente a ribotipagem e o RAPD, foram mais informativas na caracterização das linhagens de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, podendo identificar linhagens em nível intra-específico.
- Os resultados obtidos reforçam o uso de métodos moleculares na identificação de microrganismos associados as plantas, podendo auxiliar na escolha de linhagens para futuros estudos envolvendo o melhoramento da produção de culturas agrícolas.
- Associação de vários métodos na caracterização de microrganismos, ou seja, taxonomia polifásica, fornece melhores subsídios para a elucidação das relações genômicas e fenotípicas entre os organismos estudados. A escolha dos métodos depende da disponibilidade técnica, custo, tempo de realização e grupo de organismos em estudo.

7. Referências Bibliográficas

- Achtman, M.; Mercer, A.; Kusecek, A. Pohl, A.; Heuzenroeder, W.; Aaronson, A.; Sutton, W. & Silver, P. (1983) Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. **Infection and Immunity**, **39**:315-335.
- Achtman, M. & Pluschke, G. (1986) Clonal analysis of descent and virulence among selected *Escherichia coli*. **Annual Review of Microbiology**, **40**:185-210.
- Bahme, J.B.& Schroth, M.N. (1987) Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato. **Phytopathology**, **77**:1093-1100.
- Bakker, A.W. & Schippers, B. (1987) Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp mediated plant growth stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, **19**:451-457.
- Bakker, P.A.M.J.; Lamers, J.G.; Bakker, A.W.; Marugg, J.D.; Weisbeek, P.J. & Schippers, B (1986) The role of siderophores in potato tuber yield increase by *Pseudomonas putida* in a short rotation of potato. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, **92**:249-256.
- Baremkamp, S.J.; Munson, R.S. & Granoff, D.M. (1981) Subtyping isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer membrane protein profiles. **Journal of Infectious Diseases**, **143**:668-676.

- Bashan, Y.; Singh, M. & Levanony, H. (1989) Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. **Canadian Journal of Botany**, **67**:2429-2434.
- Becker, J.O. & Cook, R.J. (1988) Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased growth response of wheat by fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**, **78**:778-782.
- Benedetti, C.A. (1991) Análise eletroforética de proteínas de membrana de *Pseudomonas avenae* e *Pseudomonas rubrilineans* patogênicas à gramíneas. Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. 75 p.
- Bingen, E.; Denamur, E. & Lambert-Zechovsky, N. (1992) Mother-to-infant vertical transmission and cross-colonization of *Streptococcus pyogenes* confirmed by DNA restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Infectious Diseases**, **165**:147-150.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, **7**: 1513-1523.
- Blum, H.; Beier, H. & Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, **8**:93-99.
- Bodey, G.P.; Bolivar, R.; Fainstein, V. & Jadeja, L. (1983) Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Reviews of Infectious Diseases**, **52**:279-313.
- Bundoc, V.G. & Barbour, A. G. (1989) Clonal polymorphisms of outer membrane protein OspB of *Borrelia burgdorferi*. **Infection and Immunity**, **57**:2733-2741.

- Burke, V.; Richardson, C.J.L. & Robinson, J. (1990) Serotype and serum sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* from children with cystic fibrosis-longitudinal studies and typing with monoclonal antibodies. **Pathology**, **22**:223-226.
- Burr, T.J. & Caesar, A. (1984) Beneficial plant bacterial. **Critical Reviews of Plant Science**, **2**:1-20.
- Buyer, J.S. & Leong, J. (1986) Iron transport-mediated antagonism between plant growth-promoting and plant deleterious *Pseudomonas* strains. **Journal of Biological Chemistry**, **261**:791-794.
- Carson, L.A.; Anderson, R.L.; Panlilio, A.L.; Becksague, C.M. & Miller, J.M. (1991) Isoenzyme analysis of *Pseudomonas cepacia* as an epidemiologic tool. **American Journal of Medicine**, **91**:52-255.
- Chakrabarty, A.M. & Purkayastha, R.P. (1984) Role of rhizobitoxine in protecting soybean roots from *Macrophomina phaseolina* infection. **Canadian Journal of Microbiology**, **30**:285-289.
- Dahiya, J.S.; Woods, D.L. & Tewari, J.P. (1988) Control of *Rhizoctonia solani*, casual agent of brown girdling root rot of rapessed by *Pseudomonas fluorescens*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, **29**:135-142.
- Denamur, E.; Picard, B.; Goullet, P.; Bingen, E.; Lambert, N. & Elion, J. (1991) Complexity of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic-fibrosis combined results from esterases electrophoresis and rDNA restriction fragment length polymorphism analysis. **Epidemiology and Infection**, **106**:531-539.

- Duss, F.; Moazfar, A. & Oertli, J.J. (1986) Effect of bacteria on the iron uptake by axenically-cultured roots Fe-efficient and Fe-inefficient tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). **Journal of Plant Nutrition**, 9:587-598.
- Eklund, E. (1970) Secondary effects of some pseudomonads in the rhizoplane of peat grown cucumber plants. **Acta Agricola Scandinavia**, 17:1-57.
- Elad, Y. & Baker, R. (1985) The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamydospore germination of *Fusarium* sp. by *Pseudomonas* spp. **Ecological Epidemiology**, 75:1053-1059.
- Elomari, M.; Coroler, L.; Hoste, B.; Gillis, M.; Izard, D. & Leclerc, H. (1996) DNA relatedness among *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 46:1138-1144.
- Elomari, M.; Izard, D.; Vincent, P.; Coroler, L. & Leclerc, H. (1994) Comparison of ribotyping analysis and numerical taxonomy studies of *Pseudomonas putida* biovar A. **Systematic and Applied Microbiology**, 17:361-369.
- Ewing, W.H. (1986) Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. Elsevier Science, New York.
- Fantinatti, F.; Silveira, W. D. & Pestana de Castro, A. F. (1994). Characteristics associated with pathogenicity of avian septicaemic *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology**, 41:75-86.
- Forbes, K.E.; Bruce, K.D. & Jordens, J.Z. (1991) Rapid methods in bacterial DNA fingerprinting. **Journal of General Microbiology**, 137:2051-2058.

- Frankenberger Jr., W.T. & Poth, M. (1988) L-tryptophan transaminase of a bacterium isolated from the rhizosphere of *Festuca octoflora* (Gramineae). **Soil Biology and Biochemistry**, **20**:299-304.
- Gill, P.R. & Warren, G.J. (1988) An iron-antagonized fungistatic agent that is not required for iron assimilation from a fluorescent rhizosphere pseudomonad. **Journal of Bacteriology**, **170**:163-170.
- Gillies, R.R. (1978) Bacteriocintyping of Enterobacteriaceae, in Methods in Microbiology. Vol. 11. eds T. Bergan and J. R. Norris, Academic Press, London.
- Govan, J.R.W. & Harris, G. (1985) Typing of *Pseudomonas cepacia* by bacteriocin susceptibility and production. **Journal of Clinical Microbiology**, **22**:490-494.
- Grimont, F. & Grimont, P.A.D. (1986) Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. **Annales de l'Institut Pasteur**, **137B**:165-175.
- Gutterson, N.I.; Layton, T.J.; Ziegler, J.S. & Warren, G.J. (1986) Molecular cloning of genetics determinants for inhibition of fungal growth by a fluorescent pseudomonad. **Journal of Bacteriology**, **165**:696-703.
- Haase, A.; Smithvaughan, H.; Melder, A.; Wood, Y.; Janmaat, A. (1995) Multiple types by random amplified polymorphic DNA analysis provides new insights into epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, **33**:1687-1690.
- Hartmann, A. & Amarger, N. (1991) Genotypic diversity of an indigenous *Rhizobium meliloti* field population assessed by plasmid profiles, DNA fingerprinting and insertion sequence typing.. **Canadian Journal of Microbiology**, **37**:600-608.

- Hawkey, P.M. (1989) Laboratory investigation of nosocomial infection, in Medical Bacteriology A Practical Approach. P. M. Hawkey & D. A. Lewis, Oxford.
- Hofer Scientific Instruments (1990) Hofer Electrophoresis Catalog and Exercises. San Francisco.
- Howell, C.R. & Stipanovic, R.D. (1980) Suppression of *Pythium ultimum* induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. **Phytopathology**, 70:712-715.
- Jackman, P.J.H. & Whiley, R.A. (1990) Microbial systematic, identification and fingerprinting based on electrophoretic analysis of proteins. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisas André Tosello.
- John, J.F. & Twitty, J.A. (1986) Plasmids as epidemiologic markers in nosocomial gram-negative bacilli: experience at a university and review of the literature. **Reviews of Infectious Diseases**, 8:693-704.
- Julian, G.; Camerom, H.J. & Olsen, R.A. (1983) Role of chelation by ortho dihydroxy phenols in iron absorption by plant roots. **Journal of Plant Nutrition**, 6:163-175.
- Jurkevitch, E.; Hadar, Y. & Chen, Y. (1988) Involvement of bacterial siderophores in the remedey of lime-induced chlorosis in peanut. **Soil Science Society of America Journal**, 52:1032-1037.
- Kado, C. I. & Liu, S. T. (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. **Journal of Bacteriology**, 145: 1365-1373.

- Keel, C.; Weller, D.M.; Natsch, A.; Defago, G.; Cook, R.J. & Thomashow, L.S. (1996) Conservation of the 2:4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent pseudomonas strains from diverse geographic locations. **Applied and Environmental Microbiology**, **62**:552-563.
- Keel, C.; Wirthner, P.H.; Oberhansli, H.; Voisard, D.; Burger, D.; Haas, D. & Defago, G. (1990) Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere role of the antibiotic 2:4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. **Symbiosis**, **9**:327-341.
- Kerr, A. (1972) Biological control of crown gall seed inoculation. **Journal of Applied Bacteriology**, **35**:493-497.
- Khan, A.A. & Cerniglia, C.E. (1994) Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin-A gene using PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, **60**:3739-3745.
- King, E.O.; Ward, M.K. & Raney, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal Laboratory and Clinical Medicine**, **44**:301-307.
- Kloepper, J.W.; Hume, D.J.; Scher, F.M.; Singleton, C.; Tipping, B.; Laliberte, M.; Frauley, T.; Kuutshaw, C.; Simonson, C.; Lifshitz, R.; Zaleska, I. & Lee, L. (1988) Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (rapeseed). **Plant Disease**, **72**:42-46.
- Kloepper, J.W. & Schroth, M.N. (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. **International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**, **2**:879-882.

- Kloepper, J.W.; Schroth, M.N. & Miller, T.D. (1980) Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. **Phytopathology**, **70**:1078-1082.
- Kondrateva, T.F. (1992) Application of pulsating diversity directed electric-fields for determining the degree of similarity of 3 *Pseudomonas* cultures. **Microbiology**, **1**:55-62.
- Kragelund, L.; Leopold, K. & Nybroe, O. (1996) Outer-membrane protein heterogeneity within *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* and use of an PPRF antibody as a probe for ribosomal-RNA homology group-I Pseudomonads. **Applied and Environmental Microbiology**, **62**:480-485.
- Kuhn, I.; Tullus, K. & Burman, L.G. (1991) the use of the PhP-Ke biochemical fingerprinting system in epidemiological studies of faecal *Enterobacter cloacae* strains in Swedish neonatal wards. **Epidemiology and Infection**, **107**:311-319.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T4. **Nature**, **227**:680-685.
- Laguerre, G.; Rigottiergois, L. & Lemanceau, P. (1994) Fluorescent *Pseudomonas* specie categorized by using polymerase chain-reaction (PCR) restriction fragment analysis of 16S rDNA. **Molecular Ecology**, **3**:479-487.
- Lányi, B. & Bergan, T. (1978) Serological characterization of *Pseudomonas aeruginosa*, in Methods in Microbiology. Vol. 10. eds. T. Bergan and J. R. Norris, Academic Press, London.

- Leitão, J.H.; Alvin, T. & Sacorreia, I. (1996) Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients and water springs and genome fingerprinting of variants concerning mucoidy. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 13:287-292.
- Lindberg, G.D. (1981) An antibiotic lethal to fungi. **Plant Disease**, 65:680-683.
- Loper, J.E. & Buyer, J.S. (1991) Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 4:5-13.
- Loper, J.E.; Haack, C. & Schroth, M.N. (1985) Population dynamics of soil pseudomonads in the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, 49:416-422.
- Loutit, J.S. & Tompkins, L.S. (1991) Restriction enzyme and Southern hybridization analyses of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 29:2897-2900.
- Martinez-Toledo, M.V.; Rubia, T.; Moreno, J. & Gonzalez-Lopez, J. (1988) Root exudates of *Zea mays* and production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azobacter chroococcum*. **Plant and Soil**, 110:149-152.
- Maurhofer, M.; Keel, C.; Schnider, U.; Voisard, C.; Haas, D. & Defago, G. (1992) Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. **Phytopathology**, 82:190-195.

- Mazzola, M.; Fujimoto, D.K.; Thomashow, L.S. & Cook, R.J. (1995) Variation in Sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to antibiotics produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. and effect on biological control of take-all of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, **61**:2554-2559.
- Merriman, P.R.; Price, R.D.; Kollmorgen, J.F.; Piggot, T. & Ridge, E.H. (1974) Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on growth of cereals and carrots. **Australian Journal of Agricultural Research**, **25**:219-226.
- Mielenz, J.R.; Jackson, L.E.; O'Gara, F. & Shanmugan, K.T. (1979) Fingerprinting bacterial chromosomal DNA with restriction endonuclease EcoRI - comparison of *Rhizobium* spp. and identification of mutants. **Canadian Journal of Microbiology**, **25**:803-807.
- Millership, S.E. & Want, S.E. (1992) Whole-cell protein electrophoresis for typing *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, **30**:2784-2787.
- Mills, S.D.; Congi, R.V.; Hennessy, J.N. & Penner, J.L. (1991) Evaluation of a simplified procedure for serotyping *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* which is based on the O-antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, **29**:2093-2098.
- Moyses, A. & Young, H. (1991) Epidemiologic typing of *Neisseria gonorrhoeae* - a comparative analysis of 3 monoclonal antibody serotyping panels. **European Journal of Epidemiology**, **7**:311-319.
- Musser, J.M.; Rapp, V.J. & Selander, R.K. (1987) Clonal diversity in *Haemophilus pleuropulmoniae*. **Infection and Immunity**, **55**:1207-1215.

- Neilands, J.B. (1981) Microbial iron compounds. **Annual Review of Biochemistry**, **50**:715-731.
- Neilands, J.B. (1986) Siderophores in relation to plant growth and disease. **Annual Review of Plant Physiology**, **37**:187-208.
- Nociari, M.M.; Catalano, M.; Torrero, M. & Sordelli, D.O. (1996) *Pseudomonas aeruginosa* ribotyping - stability and interpretation of ribosomal operon restriction patterns. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, **25**:27-33.
- Olsen, N.W. & Misaghi, I.J. (1981) Plant growth promoting activity of heat-killed cells of *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, **71**:1006-1100.
- Olyhoek, T.; Crowe, B.A. & Achtman, M. (1987) Clonal population structure of *Neisseria meningitidis* serogroup A isolated from epidemics and pandemics between 1915 and 1983. **Reviews of Infectious Diseases**, **9**:665-691.
- O'Sullivan, D.B. & O'Gara, F. (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. **Microbiological Reviews**, **56**:662-676.
- Palleroni, N.J.; Kunisawa, R.; Contopoulou, R. & Doudoroff, M. (1973) Nucleic-acid homologies in genus *Pseudomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **23**:333-339.
- Picard, B.; Denamur, E.; Barakat, A.; Elion, J. & Goullet, P. (1994) Genetic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates revealed by esterases electrophoretic polymorphism and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal RNA gene region. **Journal of Medical Microbiology**, **40**:313-322.

- Pitcher, D.G.; Saunders, N.A. & Owen, R. J. (1989) Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, **8**:151-156.
- Pitt, T.L.; Kaufmann, M.E.; Patel, P.S.; Benge, L.C.A. & Gaskin, S. (1996) Type characterization and antibiotic susceptibility of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* isolates from patients with cystic-fibrosis in the United Kingdom and the Republic of the Ireland. **Journal of Medical Microbiology**, **44**:203-210.
- Poh, C.L.; Yap, E.H.; Tay, L. & Bergan, T. (1988) Plasmid profiles compared with serotyping and pyocin typing for epidemiological surveillance of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, **25**:109-114.
- Powell, P.E; Szanislo, P.J.; Cline, G.R. & Reid, C.P.P. (1982) Hydroxamate siderophores in the iron nutrition of plants. **Journal of Plant Nutrition**, **5**:653-673.
- Rainey, P.B.; Bailey, M. J & Thompson, I.P. (1994) Phenotypic and genotypic diversity of fluorescent Pseudomonads isolated from field-grown sugar beet. **Microbiology**, **140**:2315-2331.
- Raymond, R.N.; Muller, G. & Matzanke, B.F. (1984) Complexation of iron by siderophores. A review of their solution and structural chemistry and biological function. **Topics in Current Chemistry**, **123**:49-102.
- Regnery, R.L.; Spruill, C.L. & Plikaytis, B.D. (1991) Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of Bacteriology**, **173**:1576-1589.

- Saiki, R.K.; Scharf, S. & Faloona, F. (1985) Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. **Science**, **230**:1530-1534.
- Saunders, N.A.; Harrison, T.G. & Haththotuwa, A. (1990) A method for typing strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by analysis of restriction fragment length polymorphisms. **Journal of Medical Microbiology**, **31**:45-55.
- Schroth, M.N. & Hancock, J.G. (1981) Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. **Science**, **216**:1376-1381.
- Scieux, C.; Grimont, F.; Regnault, B. & Grimont, P.A.D. (1992) DNA fingerprinting of *Chlamydia trachomatis* by use of ribosomal RNA, oligonucleotide and randomly cloned DNA probes. **Research in Microbiology**, **143**:755-765.
- Selander, R.K.; Caugant, D.A.; Ochman, H.; Musser, J.M.; Gilmour, M.N. & Whittam, T.S. (1986) Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and Environmental Microbiology**, **51**:873-884.
- Shanahan, P.; O'Sullivan, D.J.; Simpson, P.; Glennon, J. & O'Gara, F. (1992) Isolation of 2:4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. **Applied and Environmental Microbiology**, **58**:353-358.
- Sibold, C.; Wang, J.; Henrichsen, J. & Hakenbeck, R. (1992) Genetic relationships of penicillin-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* isolated on different continents. **Infection and Immunity**, **60**:4119-4126.

- Sneh, B.; Dupler, M.; Elad, Y. & Baker, R. (1984) Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* as affected by fluorescent and lytic bacteria from *Fusarium* suppressive soils. **Phytopathology**, **74**:1115-1124.
- Sorensen, J.; Skouv, J.; Jorsensen, A. & Nybroe, O. (1992) Rapid identification of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* by SDS-PAGE analysis of whole cells protein patterns. **FEMS Microbial Ecology**, **101**:41-50.
- Steinberg, J. P.; Beckerdite, M. E. & Westenfeld, G. O. (1987) Plasmid profiles of *Clostridium difficile* isolates from patients with antibiotic-associated colitis in 2 community hospitals. **Journal of Infectious Diseases**, **156**: 1036-1038.
- Stern, A. & Meyer, T.F. (1987) Common mechanism controlling phase and antigenic variation in pathogenic neisseriae. **Molecular Microbiology**, **1**:5-12.
- Thomashow, L.S. & Weller, D.M. (1988) Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Journal of Bacteriology**, **170**:3499-3508.
- Thomashow, L.S.; Weller, D.M.; Bonsall, R.F. & Pierson III, L.S. (1990) Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* spp. in the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, **56**:908-912.
- Threlfall, E.J.; Hall, M.L.M. & Rowe, B. (1986) *Salmonella gold-coast* from outbreaks of food-poisoning in the British Isles can be differentiated by plasmid profile. **Journal of Hygiene**, **97**:115-122.

- Tompkins, L.S.; Troup, N.J.; Labigne-Roussel, A. & Cohen, M.L. (1986) Cloned, random chromosomal sequences as probes to identify *Salmonella* species. **Journal of Infectious Diseases**, **154**:156-162.
- Tompkins, L.S.; Troup, N.J.; Woods, T.; Bibb, W. & McKinney, R.M. (1987) Molecular epidemiology of *Legionella* species by restriction endonuclease and alloenzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, **25**:1875-1880.
- Towner, K.J. & Cockayne, A. (1993) Molecular Methods for Microbial Identification and Typing. 1st ed. Chapman & Hall, London. 201 pages.
- Traub, W.H. (1989) *Acinetobacter baumannii* serotyping for delineation of out-breaks of nosocomial infection. **Journal of Clinical Microbiology**, **27**:2713-2716.
- Tsai, C.M.; Frasch, C.E. & Mocca, L.F. (1981) Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. **Journal of Bacteriology**, **146**:69-78.
- Valvano, M.A. & Marolda, C.L. (1991) Relatedness of O-specific lipopolysaccharide side chain genes from strains of *Shigella boydii* type 12 belonging to two clonal groups and from *Escherichia coli* O7:K1. **Infection and Immunity**, **59**:3917-3923.
- Vlassak, K.; Vanholm, L.; Duchateau, L.; Vanderleyden, J. & Demot, R. (1992) Isolation and characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with the roots of rice and banana grown in Sri-Lanka. **Plant and Soil**, **145**:51-63.
- Voisard, C.; Keel, C.; Haas, D. & Defago, G. (1989) Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **EMBO Journal**, **8**:351-358.

- Wade, W.G.; Slayne, M.A. & Alfred, M.J. (1990) Comparison of identification methods for oral asaccharolytic *Eubacterium* species. **Journal of Medical Microbiology**, **33**:239-242.
- Wang, G.; Whittam, T. S.; Berg, C. M. & Berg, D. E. (1993) RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. **Nucleic Acids Research**, **21**:5930-5933.
- Welsh, J. & McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, **18**:7213-7218.
- Wilson, C. R. Totten, P. A. & Baldwin, J. N. (1978) Rapid procedure for the detection of plasmids in *Staphylococcus epidermidis*. **Applied and Environmental Microbiology**, **36**: 368-374.
- Wilson, M. & Lindow, S.E. (1993) Effect of phenotypic plasticity on epiphytic survival and colonization by *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, **59**:410-416.
- Wilson, M.A.; Rimler, R.B. & Hoffman, L.J. (1992) Comparison of DNA fingerprints and somatic serotypes of serogroup B and E *Pasteurella multocida* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, **30**:1518-1524.
- Woese, C. R. (1987) Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, **51**: 221-271.
- Yohalem, D.S. & Lorbeer, J.W. (1994) Multilocus isoenzyme diversity among strains of *Pseudomonas cepacia* isolated from decayed onions, soils, and clinical sources. **Systematic and Applied Microbiology**, **17**:116-124.

- Yuen, G.Y. & Schroth, M.N. (1986) Interactions of *Pseudomonas fluorescens* strain E6 With ornamental plants and its effect on the composition of root-colonizing microflora. **Phytopathology**, **76**:176-180.
- Yuen, G.Y.; Schroth, M.N. & McCain, A.H. (1985) Reduction of *Fusarium* wilt of carnations with suppressive soils and antagonistic bacteria. **Plant Disease**, **69**:1071-1075.
- Zarko-Postawka, M.; Hunderuk, M.; Mordarski, M. & Zakrzewska-Czerwinska, J. (1997) Organization and nucleotide sequence analysis of the ribosomal gene set (*rrnB*) from *Streptomyces lividans*. **Gene**, **185**: 231-237.