



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

OSEIAS SOUZA DA SILVA JÚNIOR

ISOLAMENTO DO GENE *PhzF* EM *Pseudomonas putida*, ISOLADO Pt12

BELÉM-PA

2017

OSEIAS SOUZA DA SILVA JÚNIOR

ISOLAMENTO DO GENE *PhzF* EM *Pseudomonas putida*, ISOLADO Pt12

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Cláudia Regina Batista de Souza.

BELÉM-PA

2017

OSEIAS SOUZA DA SILVA JÚNIOR

ISOLAMENTO DO GENE *PhzF* EM *Pseudomonas putida*, ISOLADO Pt12

_____ - Orientador

Prof.^a Dr.^a Cláudia Regina Batista de Souza

Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) – UnB

Universidade Federal do Pará

_____ - Avaliador

Prof.^a M.^a Aline Medeiros Lima

Mestre em Genética e Biologia Molecular – UFPA

Universidade Federal Rural da Amazônia

_____ - Avaliador

Prof. Dr. Sávio Pinho dos Reis

Doutor em Genética e Biologia Molecular – UFPA

Universidade do Estado do Pará

BELÉM-PA

2017

AGRADECIMENTOS

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, o meu sincero agradecimento.

Ao CNPq e a FAPESPA pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

À minha orientadora, professora Claudia Souza, pela oportunidade e pela confiança.

Ao grupo de pesquisa do Labiomol, pela oportunidade oferecida de desenvolvimento e execução dos experimentos, pela convivência, ajuda e pelas contribuições na discussão dos resultados.

À professora Roberta Cerqueira, à professora Sílvia Mardegan e a equipe do LASEV, onde fui monitor.

Ao professor Moisés Batista e a equipe do LDI, onde fiz meu PIBIC.

A minha mãe e pai pelo apoio, incentivo e suporte financeiro.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

Epígrafe

“Time is short, and there is so much to do. One must hurry.”

Nikolay Vavilov.

RESUMO

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L., Piperaceae) é um condimento de grande importância econômica, especialmente para o Estado do Pará, principal produtor de pimenta-do-reino no Brasil. Grande parte da produção de pimenta-do-reino é afetada pela fusariose, também conhecida como podridão das raízes. Esta doença é causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. O controle biológico com bactérias endofíticas antagonistas ao fungo é uma alternativa ao controle químico. Estudos prévios mostram que a bactéria *Pseudomonas putida*, isolado Pt12, possui ação antagônica ao *F. solani* f. sp. *piperis* em condições *in vitro*. Além disto, foi isolada uma sequência parcial de 400 pb do gene *PhzF*, provavelmente relacionado a síntese do composto antifúngico fenazina-1-ácido carboxílico (PCA) no isolado Pt12. Esta sequência corresponde a 128 aa apresentando 87 % de identidade com uma isomerase de *Pseudomonas putida* (DLL-E4) constituída por 262 aa. O alinhamento entre as duas sequencias proteicas mostra que a sequência isolada da Pt12 é uma sequência parcial, faltando 43 aa na extremidade amino-terminal e 91 aa na carboxi-terminal quando comparada a sequência completa de DLL-E4. Desta forma, o objetivo principal do presente trabalho foi isolar a sequência completa do gene *PhzF* do *operon* da síntese da fenazina a partir do DNA genômico do isolado Pt12 utilizando-se ensaios de PCR e PCR-*nested*. Os *primers* utilizados foram baseados na sequencia parcial do *PhzF* da Pt12 e na sequência da estirpe DLL-E4, uma das linhagens mais próximas. Inicialmente o DNA genômico da Pt12 foi extraído com o método do fenol-clorofórmio, e posteriormente foram realizados ensaios de PCR com 17 combinações de *primers* para amplificar as regiões 5' e 3' do gene *PhzF*. Os fragmentos amplificados que apresentaram tamanhos esperados foram clonados, e depois submetidos a PCRs com *primers* flanqueando uma região de 170 pb específica do gene *PhzF*, para confirmar se tratar da sequência de interesse. As análises em gel mostraram que foram amplificadas as sequências correspondentes as extremidades 5' e 3' do gene *PhzF*, resultando no isolamento da sequência de interesse completa. Clones com resultados positivos foram sequenciados e as sequências nucleotídicas e de aminoácidos deduzidas foram utilizadas nas análises comparativas.

Palavras-chave: fusariose, antibiose, fenazina-1-ácido carboxílico, pimenta-do-reino.

ABSTRACT

The black pepper (*Piper nigrum* L., Piperaceae) is a condiment of considerable economic importance, especially for the State of Pará, the main producer of black pepper in Brazil. Most of the black pepper production is affected by fusariosis, also known as root rot. This disease is caused by the fungus *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. Biological control with fungal antagonist endophytic bacteria is an alternative to chemical control. Previous studies have shown that the bacterium *Pseudomonas putida*, isolated Pt12, has an antagonistic action to *F. solani* f. sp. *piperis* under *in vitro* conditions. In addition, a 400 bp partial sequence of the PhzF gene was isolated, probably related to the synthesis of the antifungal compound phenazine-1-carboxylic acid (PCA) in the Pt12 isolate. This sequence corresponds to 128 aa with 87% identity with a *Pseudomonas putida* isomerase (DLL-E4) constituted by 262 aa. Alignment between the two protein sequences shows that the isolated sequence of Pt12 is a partial sequence, missing 43 aa at the amino terminus and 91 aa at the carboxy terminal when compared to the complete DLL-E4 sequence. Thus, the main objective of the present work was to isolate the complete *PhzF* gene sequence from the phenazine synthesis operon from the genomic DNA of the Pt12 isolate using PCR and nested PCR assays. The primers used were based on the partial sequence of *PhzF* from Pt12 and on the DLL-E4 sequence, considered a closest lineage. Initially the genomic DNA of Pt12 was extracted with the phenol-chloroform method, and then PCR assays were performed with 17 primer combinations to amplify the 5' and 3' regions of the *PhzF* gene. The amplified fragments having expected sizes were cloned, and then subjected to primers PCRs flanking a specific 170 bp region of the *PhzF* gene, to confirm the sequence of interest. Gel analysis indicate that sequences corresponding to the 5' and 3' extremities of the *PhzF* gene were amplified, resulting in the isolation of the complete interest sequence. Clones with positive results were sequenced, and nucleotide and deduced amino acid sequences were used in comparative analysis.

Keywords: Root rot disease, antibiosis, phenazine-1-carboxylic acid , black pepper.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Alinhamento da sequência isolada por Barros & de Souza em Pt12 com a sequência de *P. putida* (AC WP_019437068.1). As sequências de DNA foram convertidas para aa e alinhadas na plataforma *Clustal Omega*. “*” = completa similaridade entre aminoácidos; “.” = troca conservativa entre aminoácidos; “:” = troca semiconservativa entre aminoácidos.

Figura 2. Fragmento isolado por Barros e de Souza (2016) destacado. O tamanho completo do gene *PhzF* no isolado Pt12 foi baseado na sequência que este gene apresenta no isolado DLL-E4.

Figura 3. Posição da sequência controle de 170 pb (Ctl) comparada com as posições esperadas dos fragmentos do gene *PhzF* isolados e clonados (especificados na Tabela 1) e com a posição da sequência parcial isolada por Barros & de Souza (Parc).

Figura 4. A) Visualização do tamanho dos fragmentos transformados nos clones A1, A2, Ca1, Ca2, Cβ1 e Cβ2. B) Amplificação da sequência controle de 170 pb em PCR de colônia dos clones A1, A2, Ca1, Ca2, Cβ1 e Cβ2. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Figura 5. A) Visualização do tamanho dos fragmentos transformados nos clones B1, B2, D1 e D2. B) Amplificação da sequência controle de 170 pb em PCR de colônia dos clones B1, B2, D1 e D2. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Figura 6. Sequência do gene *PhzF* e da hipotética proteína PhzF da *P. putida*, isolado Pt12. As regiões em destaque correspondem aos *primers* PHEPUT-F3 (5’), PHEN-R3 e PHEPUT-R4 (3’). Análise na plataforma *Clustal Omega*.

Figura 7. Alinhamento das sequências de aa da enzima PhzF de *P. fluorescens* 2-79 (AC AAC18905.1) e *P. aeruginosa* PAO1 (AC AAC64492.1) e nas linhagens de *P. putida* DOT-T1E (AC AFO48928.1), S16 (AC AEJ14259.1), HB3267 (AC AGA74580.1) e Pt12. Posição dos principais resíduos de aminoácidos responsáveis pela funcionalidade da PhzF em *P. putida*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*. Alinhamento feito no software *Bioedit Sequence Alignment Editor*.

Tabela 1. Sequência de *primers* desenhados para ensaios de PCR.

Tabela 2. Combinações de *primers* desenhados que apresentaram amplificação positiva.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido
AC	Acesso
BPCP	Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas
f. sp.	<i>formae speciales</i>
IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
LB	Luria Bertani
M	molar
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mV	Milivolt
<i>n</i>	Número de indivíduos
ng	Nanogramas
pb	Pares de bases
PCA	Fenazina-1-ácido carboxílico
<i>P. nigrum</i>	<i>Piper nigrum</i>
<i>P. tuberculatum</i>	<i>Piper tuberculatum</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
rpm	Rotações por minuto
SDS	Sulfato Dodecil de Sódio
spp.	Espécies
µg	Microgramas
µL	Microlitros

NOTA SOBRE AS NORMAS BIBLIOGRÁFICAS

O presente trabalho foi redigido sob as Normas Bibliográficas da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará disponíveis em: <
http://www.biologia.ufpa.br/?page_id=35> AC em 10 de Janeiro de 2017.

SUMÁRIO

1. Introdução	
1.1.Pimenteira-do-reino (<i>Piper nigrum</i> L.)	12
1.2.Fusariose: <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>Piperis</i>	13
1.3. <i>Piper tuberculatum</i> Jacq	13
1.4.Bactérias Promotoras De Crescimento Em Plantas (BPCP)	14
1.5.Fenazina-1-Ácido Carboxílico (PCA)	15
2. Justificativa	17
3. Objetivo	17
4. Material e métodos	18
4.1.Desenho de <i>primers</i>	18
4.2.Extração de DNA Genômico de <i>Pseudomonas putida</i> (isolado Pt12)	19
4.3.Amplificação dos fragmentos do gene <i>PhzF</i> a partir do DNA genômico do isolado Pt12	19
4.4.Purificação e clonagem dos fragmentos de DNA no vetor <i>pGEM-T easy</i>	19
4.5.Transformação bacteriana	20
4.6.Amplificação dos fragmentos do gene <i>PhzF</i> a partir dos clones recombinantes isolados	20
4.7.Sequenciamento	20
5. Resultados e Discussão	21
6. Conclusão	26
7. Referências	27

1. INTRODUÇÃO

1.1. PIMENTEIRA-DO-REINO: *Piper nigrum* L.

A pimenteira-do-reino (*P. nigrum*) é uma piperácea de origem indiana, sendo a espécie economicamente mais importante do gênero *Piper* L., apresentando tanto variedades selvagens quanto cultivadas (DASGUPTA & DATTA, 1976). A pimenta-do-reino é uma das mais importantes especiarias comercializadas no mundo, utilizada frequentemente como condimento alimentar e, especialmente, no preparo e processamento de alimentos (PRABHAKARAN & NAIR, 2001).

A cultura de *P. nigrum* se desenvolve propiciamente em clima quente e úmido, com precipitação pluviométrica média de 2.500 mm/ano, temperaturas médias entre 23°C a 28°C, umidade de 80%, período seco bem definido de dois a três meses, para proporcionar maturação uniforme dos frutos e solos com boa drenagem – características comuns da região norte do Brasil (ALBUQUERQUE *et al.*, 1989; NAKASHIMA *et al.*, 2003; RODRIGUES & ATAÍDE, 2001). A propagação vegetativa é realizada a partir de estacas que são retiradas de um terço médio da planta, com um nó, porém sendo estacas de dois nós mais apropriadas para a produção de mudas (ALBUQUERQUE *et al.*, 1989).

A cultura foi introduzida no Brasil no século XVII, primeiramente na Bahia e, posteriormente, levada para os Estados da Paraíba, Maranhão e Pará, cuja produção era restrita a fundos de quintais (ALBUQUERQUE & CONDURU, 1971). Em 1933, imigrantes japoneses introduziram no município de Tomé-Açu, no Estado do Pará, o cultivar *Kuching* de Cingapura (que no Brasil ficou conhecido como Cingapura). Neste município se iniciou a produção comercial da pimenta do reino, principalmente da pimenta preta e pimenta branca. A cultura apresenta grande valor econômico e rentabilidade, fazendo com que ela se espalhasse pelo país, o que possibilitou o Brasil a se tornar, em 1982, o maior produtor e exportador do mundo (ANDO *et al.*, 1997; DUARTE, 2004). Durante a década de 1990, houve uma crise no setor, devido aos baixos preços internacionais, fazendo com que os grandes produtores abandonassem os pimentais. Isto abriu espaço para os pequenos produtores que apresentaram maior capacidade de sobrevivência pelo baixo uso de insumos modernos e uso de mão-de-obra familiar (DESER., 2008).

O Brasil continua sendo um dos maiores produtores de pimenta-do-reino e o Estado do Pará é líder na produção: 45,89% da produção nacional (IBGE, 2017). Isso faz com que esta atividade tenha posição de destaque na pauta de exportações agrícolas e na ocupação de mão-de-obra no meio rural do Estado, sendo a pimenta-do-reino um banco verde: um produto que o

agricultor usa para aumentar a renda familiar, dada a sua inserção no mercado (DUARTE, 2004).

Porém a produção da cultura vem sofrendo grandes perdas devido a ocorrência da fusariose, causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (KIMATI *et al.*, 1997). São cerca de 10 milhões de dólares e 3% da área cultivada perdidos anualmente por causa da doença (TREMACOLDI, 2010).

1.2. FUSARIOSE: *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

Fusarium L. é um gênero de fungos que causam fitopatologias em várias culturas: *F. moniliforme* causa podridão da cana-de-açúcar, *Fusarium* spp. causam o tombamento em cebola, eucalipto, fumo e tomate; *F. solani* f. sp. *phaseoli*, causa a murcha em feijoeiro; além de outras espécies e *formae speciales*, que são parasitas vasculares específicos (BEDENDO, 2005).

A fusariose da pimenteira-do-reino, conhecida como podridão das raízes, induz o apodrecimento da raiz e o secamento dos ramos, sendo a principal doença ocorrente na cultura. A patologia é causada pelo *F. solani* f. sp. *piperis*, tendo ocorrência restrita ao Brasil (ALBUQUERQUE & DUARTE, 1977; GAIA *et al.*, 2007).

A baixa variabilidade genética devido à propagação vegetativa e às condições ambientais do clima amazônico fizeram com que a fusariose se disseminasse rapidamente na região, destruindo grandes áreas cultivadas com pimenteira-do-reino num espaço de tempo curto (ALBUQUERQUE & DUARTE, 1977). O surgimento da doença foi responsável pela queda da vida útil dos pimentais de 12 anos para 6,7 anos (FILGUEIRAS, 2009) e, desde a identificação do fungo patogênico, mais de 10 milhões de pimenteiras morreram por ano no Estado do Pará (DUARTE, 2005).

1.3. *Piper tuberculatum* Jacq

As estratégias utilizadas para combater a fusariose, como o manejo das culturas, obtenção de variedades resistentes e aplicação de fungicidas se mostraram pouco eficientes e onerosas (ANDO *et al.*, 1997; DUARTE & ALBUQUERQUE, 1980). A utilização de agrotóxicos pode causar: desequilíbrios ambientais como extinção de inimigos naturais de pragas de culturas (MEDEIROS *et al.*, 2006); danos à microbiota das plantas (BERGAMIM FILHO *et al.*, 2005; ETHUR *et al.*, 2007); contaminação de alimentos (SANTOS & VARAVALLLO, 2011); contaminação do meio ambiente (BERGAMIM FILHO *et al.*, 2005; ETHUR *et al.*, 2007). Somando-se a tudo isso, o uso de agrotóxicos não é eficaz no combate

de doenças como a fusariose, qual o patógeno consegue penetrar no tecido vascular da planta, onde o produto não atua com eficiência (OLIVEIRA, 2012).

Enquanto que a cultura de *P. nigrum* é seriamente acometida pela doença, outra espécie do gênero, *P. tuberculatum* Jacq, é resistente à fusariose (Albuquerque *et al.*, 2001). A resistência da *P. tuberculatum* ao *F. solani* f. sp. *piperis* constitui em uma importante fonte de estudos para o combate à fusariose na região.

Nascimento *et al.* (2015) isolaram bactérias endofíticas de *P. tuberculatum*, que possivelmente contribuem para a resistência da planta à doença causada pelo *F. solani* f. sp. *piperis*. Em testes *in vitro*, um dos isolados demonstrou habilidade de inibição deste fungo por mecanismos ainda desconhecidos (Nascimento *et al.*, 2015). Esta amostra foi identificada como sendo *Pseudomonas putida*, isolado Pt12 (AC JF900611 no GenBank), a partir da amplificação do gene 16S rRNA,

1.4. BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS (BPCP)

As plantas desenvolveram inúmeros e complexos mecanismos de defesa, muitos deles envolvendo interações com micro-organismos (PEIXOTO NETO *et al.*, 2004). Bactérias endofíticas são organismos que colonizam os tecidos vegetais internos sem causar patogenicidade ou qualquer efeito negativo para o hospedeiro, numa relação mutualística onde a planta oferece habitat e nutrientes, enquanto a bactéria promove o crescimento e saúde da planta (HOLLIDAY, 1989; MARIANO *et al.*, 2004; SCHULZ & BOYLE, 2006).

As bactérias promotoras de crescimento em plantas ocupam um nicho ecológico semelhante ao dos fitopatógenos, o que faz delas potenciais agentes de biocontrole (BERG *et al.*, 2005). Podem controlar doenças parasitárias por meio de diversos mecanismos, como competição, antibiose, parasitismo e proteção cruzada, que resultam em resistência sistêmica induzida (ISR) (SILO-SUH *et al.*, 1994, LOON *et al.*, 1998).

Tendo em vista as desvantagens apresentadas, o controle biológico é uma alternativa ao controle químico, com a utilização de microrganismos antagonistas para combater os fitopatógenos, os quais podem ser introduzidos tanto no solo, quanto nos órgãos de propagação (ETHUR *et al.*, 2007; GRIGOLETTI JUNIOR *et al.*, 2000; OLIVEIRA, 2012).

Várias espécies do grupo de pseudomonas fluorescentes são BPCP, sendo este grupo o mais estudado dentro do gênero *Pseudomonas* (LEISINGER & MARGRAFF, 1979; DWIVEDI & JOHRI, 2003). Elas podem ser utilizadas como agentes de controle biológico contra fitopatologias provocadas por fungos, devido à sua ação antagonista, por meio da produção de vários metabólitos antifúngicos (HOWELL & STIPANOVIC, 1978; WELLER &

COOK, 1983; COLYER & MOUNT, 1984; GUTTERSON *et al.*, 1986; JAMES JR. & GUTTERSON, 1986; DWIVEDI & JOHRI, 2003; HAAS & KEEL, 2003; KUMAR *et al.*, 2004; SARHAN & SHEHATA, 2014). Dentre os antibióticos produzidos por *Pseudomonas* fluorescentes, as fenazinas (Phz) são um grupo de grande importância (DWIVEDI & JOHRI, 2003; LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009).

1.5. PHENAZINA-1-ÁCIDO CARBOXÍLICO (PCA)

A família das fenazinas é composta por mais de 100 pigmentos heterocíclicos sintetizados por vários tipos de microrganismos, dentre eles, *Pseudomonas* spp. (BUDZIKIEWICZ, 1993; LEISINGER & MARGRAFF, 1979; LAURSEN & NIELSEN, 2004). Possuem atividade antibiótica, como a fenazina-1-carboxida (PCN) e a fenazina-1-ácido carboxílico (PCA) (GURUSIDDAIAH *et al.*, 1986; THOMASHOW *et al.*, 1990; CHIN-A-WOENG *et al.*, 1998; MAVRODI *et al.*, 1998). Em bactérias pseudomonas, a PCA é produzida basicamente por um *operon* de sete genes: *phzABCDEFG* (MAVRODI *et al.*, 1998, 2001; CHIN-A-WOENG *et al.*, 2001). O gene *phzF* sintetizaria a enzima PhzF, principal responsável pela síntese do metabólito, convertendo o ácido trans-2,3-diidro-3-hidroxi-antranílico em PCA (MCDONALD *et al.*, 2001; PARSONS *et al.*, 2004).

Kennedy *et al.* (2015) isolaram o metabólito 5-metil fenazina-1-ácido carboxílico betaína (MPCAB) de *P. putida*, estirpe PUW5. Este metabólito teria como precursor a fenazina-1-ácido carboxílico (PCA). Isto indicaria a produção deste tipo fenazina por linhagens de *P. putida*.

Em *P. putida* Pt12, Barros & de Souza (2016) identificaram uma sequência de cerca de 400 pb com 82% de identidade com o gene *PhzF* de *P. putida* DLL-E4 (AC: CP007620.1). Esta sequência de nucleotídeos corresponderia a uma sequência de 143 aa queque apresentou 87 % de identidade com uma isomerase de *P. putida* (AC WP_019437068.1) constituída por 262 aa (Figura 1).

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Pt12      -----LSETAYFVRNGETFDLR
WP_019437068.1  MQLEIFQVDAFSTEFPGGNPAAVIPLDSWLPDDVLQRIAEENNLSETAYFVRKGETFDLR
                *****:*****

Pt12      WFTPSVEVDLCGHTTLASAYVLFEQLGEQAEVLRFRSTRSGELRVSRGGDGLLAMDFPSKQ
WP_019437068.1  WFTPTVEVDLCGHATLASAYVLFEQLGEQAQVLRFNTRSGELRVSRGADGLLAMDFPAKQ
                ***:*****:*****:***.*****.*****:***

Pt12      PVAVDLPSGLLAALGLSSARAVYRSDDYVVVIDDRAVLASLKPDFVALSTF-----
WP_019437068.1  PVAVDMPAGLLQALGLSQAKAVYRSDDYVVVIDDAMLLETLPDFVALSAFDVIRGIAVTA
                *****:*:*** *****.*:*****:***.***:*****:*

Pt12      -----
WP_019437068.1  VGRGFDFVTRWFGPRVGVNEDPVTGSAHTSLAPLWAQRLGKNVLSCEQGGARKGQLQCEV

Pt12      -----
WP_019437068.1  PGNGRVIIISGRAALYLRGNVYI

```

Figura 1. Alinhamento da sequência isolada por Barros & de Souza em Pt12 com a sequência de *P. putida* (AC WP_019437068.1). As sequências de DNA foram convertidas para aa e alinhadas na plataforma *Clustal Omega*. “*” = completa similaridade entre aminoácidos; “.” = troca conservativa entre aminoácidos; “:” = troca semiconservativa entre aminoácidos.

O alinhamento entre as duas sequências proteicas mostra que a sequência isolada da estirpe Pt12 é uma sequência parcial, faltando 43 aa na extremidade amino-terminal e 91 aa na carboxi-terminal quando comparada a sequência completa do AC WP_019437068.1.

Desta forma, experimentos adicionais devem ser desenvolvidos objetivando o isolamento da sequência completa do gene *PhzF* do isolado Pt12, possibilitando uma melhor caracterização da proteína produzida por este gene, sua classificação e funcionalidade.

2. JUSTIFICATIVA

A utilização do controle biológico feito pela inoculação de bactérias endofíticas antagonistas em plantas pode substituir o controle feito por produtos químicos contra patógenos e herbívoros (GRIGOLETTI JUNIOR *et al.*, 2000; PING & BOLAND, 2004; BERG & HALLMANN, 2006). A

A caracterização molecular dos genes responsáveis pela síntese do composto antifúngico da *Pseudomonas putida*, isolado Pt12, de *P. tuberculatum* auxiliará na compreensão dos mecanismos de atuação de sua antibiose e sua contribuição na resistência à fusariose. Além de auxiliar na obtenção de genes alvos para manipulação genética através da regulação da expressão gênica, ampliando as possibilidades de aplicações biotecnológicas de estirpes no tratamento efetivo de fitopatologias (WALSH *et al.*, 2001; STROBEL *et al.*, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Isolar e caracterizar gene *PhzF* da síntese de fenazina na bactéria endofítica *Pseudomonas putida*, isolado Pt12.

3.2 ESPECÍFICOS

- Isolar a sequência gênica do *PhzF* a partir do DNA genômico da *Pseudomonas putida*, isolado Pt12.
- Caracterizar a sequência proteica correspondente à hipotética proteína PhzF.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DESENHO DE PRIMERS

Barros & Souza (2016) identificaram um fragmento parcial do gene *PhzF* no isolado Pt12 (Figura 2). Este fragmento de cerca de 400 pb foi analisado na plataforma BLAST do NCBI (ALTSCHUL *et al.*, 1990), tendo o gene *PhzF* da *P. putida*, estirpe DLL-E4 (AC: CP007620.1) como sequência mais próxima.

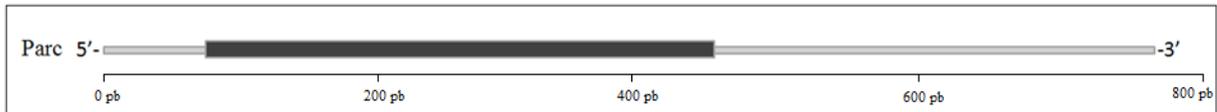


Figura 2. Fragmento isolado por Barros e de Souza (2016) destacado. O tamanho completo do gene *PhzF* no isolado Pt12 foi baseado na sequência que este gene apresenta no isolado DLL-E4.

O desenho dos *primers* utilizados neste trabalho foi baseado na sequência parcial isolada por Barros & Souza e na sequência do gene *PhzF* da estirpe DLL-E4 e realizado no *software Vector NTI Advance* (LU & MORIYAMA, 2004). Ao todo, foram desenhados 16 *primers* (9 *forwards* e 8 *reverses*) (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência de *primers* desenhados para ensaios de PCR.

<i>Primers</i>	Sequências
PHEN-F1	5' CGATGCCGTGCTCACCCGC 3'
PHEN-F2	5' CAACTGGCTGGTGC GGCACTGGA 3'
PHEN-F3	5' GCTGTACCCGATGCCCTCAAG 3'
PHEN-F4	5' GTGACCCTGGTGTGCTGCG 3'
PHEN-F5	5' GGCAACCCGGCGGCAGT 3'
PHEN-R1	5' ACTGGCCGCAGAAGCCGCGCT 3'
PHEN-R2	5' ACAGTTGCCCGAGGTCAGATG 3'
PHEN-R3	5' TACAACGCCGCCCGCCCGCTGA 3'
PHEPUT-F1	5' GCAGCGCATCGCCGAAGAGAACA 3'
PHEPUT-F2	5' GATCGGGCAACAAGGAGTGTGTGCATG 3'
PHEPUT-F3	5' CATGCAACTTGAAATCTTCCAGGTCGATGC 3'
PHEPUT-R1	5' GTAACGGCGATGCCGCGCACAT 3'
PHEPUT-R2	5' CAGTTGCCCGAGGTCAGATATACACCGTACC 3'
PHEPUT-R4	5' TCAGATATACACCGTACCGCGCAGGTACAAC 3'
PHEPt12-F1	5' AGCAGGCCGAGGTGCTGCGCT 3'
PHEPt12-R1	5' CGATAGACCGCTCTGGCGCTGCTC 3'

4.2. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *Pseudomonas putida* (isolado Pt12).

O DNA genômico da bactéria Pt12 foi obtido de acordo com metodologia descrita por Nascimento *et al.* (2015). Inicialmente a bactéria foi inoculada em meio *Tryptic Soy* (TS) e incubada com agitação a 27°C *overnight* para crescimento da cultura bacteriana. Em seguida, as células foram coletadas através de centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi congelado e descongelado por no mínimo 3 vezes para lise celular. Em seguida, as células lisadas foram ressuspensas em tampão de extração (10 mM Tris HCl pH 8,0; 50 mM de EDTA pH 8,0; 50 mM NaCl). O produto foi vortexado em baixa velocidade, e logo em seguida foram adicionados 75 µL de SDS 20% e 10 µL de RNase (10 mg/mL), seguido de incubação a 65°C durante 60 minutos. O lisado foi extraído com soluções de fenol-clorofórmio. Posteriormente, o DNA foi precipitado em acetato de sódio 0,3 M e 2,5 volumes de etanol, seguido de centrifugação a 12.000 rpm, por 20 minutos. Por último, o DNA foi seco por meio de incubação à temperatura ambiente durante 15 minutos, ressuspensado em água ultra pura e armazenado a -20°C.

4.3. AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO GENE *PhzF* A PARTIR DO DNA GENÔMICO DO ISOLADO Pt12.

Para o isolamento dos fragmentos do gene foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, com temperatura de anelamento de 55°C durante 1 minuto, seguido de 72°C por 4 minutos; por fim, 20 minutos a 72°C para extensão. Logo em seguida, os fragmentos obtidos foram analisados em gel preparativo de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizados em transluminador UV. Para o isolamento de dois fragmentos foram realizadas duas *nested* PCRs (Tabela 2). As condições destes ensaios foram similares as condições da PCR original, alterando-se apenas a combinação de *primers*.

4.4. PURIFICAÇÃO E CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE DNA NO VETOR PGEM-T EASY

Os fragmentos amplificados do tamanho esperado foram purificados a partir do gel de agarose, utilizando colunas de sílica do kit Gel DNA Recovery (*Zymo Research*, USA), de acordo com as orientações do fabricante. Durante a eluição do DNA purificado, foi realizada centrifugação a 10.000 rpm, por 2 minutos.

O DNA purificado foi ligado ao vetor *pGEM-T easy* (Promega, USA), novamente seguindo as informações fornecidas pelo fabricante. O sistema de ligação foi feito em tubo de micro-centrífuga (0,5 mL) e foi composto por: 3 μ L de fragmento de DNA purificado (~100-150 ng), 1 μ L de vetor (50 ng μ L⁻¹), 5 μ L de tampão 2X e 1 μ L (3U) de T4 DNA ligase. O sistema foi homogeneizado e incubado a 4°C *overnight*.

4.5. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

O sistema de ligação foi inserido em células eletrocompetentes (*Escherichia coli*, estirpe TOP10), por meio de eletroporação a 1700 mV, com uso de meio LB enriquecido com 20 mM de glicose. A cultura eletroporada foi incubada por 1 hora, a 37°C. Em seguida foi espalhada de forma homogênea em placas de Petri contendo meio LB ágar e ampicilina (100 μ g/mL). Por fim, a cultura foi novamente incubada a 37°C, durante 12 horas.

A ampicilina fez a primeira seleção de colônias - apenas as colônias com células transformadas com vetor com o gene de resistência ao antibiótico cresceram na placa. As colônias transformadas foram repicadas para novas placas contendo X-GAL (5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo) e IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo) para a seleção dos clones recombinantes de acordo com a coloração das colônias. Os clones de coloração branca (recombinantes) foram utilizados nas PCRs de colônias.

4.6. AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO GENE *PhzF* A PARTIR DOS CLONES RECOMBINANTES ISOLADOS.

As condições dos ensaios de PCR na análise dos clones recombinantes foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, com temperatura de anelamento de 55°C durante 1 minuto, seguido de 72°C por 4 minutos. Os fragmentos obtidos foram novamente analisados em gel de agarose corado com brometo de etídio e visualizados em transluminador UV.

4.7. SEQUENCIAMENTO

Para a reação para o sequenciamento foi utilizado o *Big Dye Terminator kit*, seguindo as instruções do fabricante. Foi utilizado o sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems, EUA). Os fragmentos obtidos foram alinhados no programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) para montar-se a sequência completa do gene. Esta sequência posteriormente foi analisada nas plataformas *Clustal Omega* da EMBL-EBI (MCWILLIAM *et al.*, 2013) e *Translate Tool* da ExPASy (GASTEIGER *et al.*, 2003).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seis combinações de *primers* amplificaram fragmentos com tamanho esperado (Tabela 2). Na Figura 3 são mostradas as posições esperadas destes fragmentos, em relação a sequência parcial.

Tabela 2. Combinações de *primers* desenhados que apresentaram amplificação com tamanho esperado.

Combinação	Primers	Sequências	Fragmento
A-5'	PHEPUT-F3	5' CATGCAACTTGAAATCTTCCAGGTCGATGC 3'	432 pb
	PHEPt12-R1	5' CGATAGACCGCTCTGGCGCTGCTC 3'	
B-3'	PHEPt12-F1	5' AGCAGGCCGAGGTGCTGCGCT 3'	540 pb
	PHEPUT-R2	5' CAGTTGCCCGAGGTCAGATATACACCGTACC 3'	
C-3'	PHEPt12-F2	5' TGTCGAAGTTGACCTGTGCGGCCAT 3'	595 pb
	PHEPUT-R4	5' TCAGATATACACCGTACCGCGCAGGTACAAC 3'	
D-3'	PHEPt12-F1	5' AGCAGGCCGAGGTGCTGCGCT 3'	527 pb
	PHEPUT-R4	5' TCAGATATACACCGTACCGCGCAGGTACAAC 3	
C-3'	PHEPt12-F2	5' TGTCGAAGTTGACCTGTGCGGCCAT 3'	595 pb
	PHEPUT-R4	5' TCAGATATACACCGTACCGCGCAGGTACAAC 3'	
C α -3' <i>nested</i>	PHEPt12-F1	5' AGCAGGCCGAGGTGCTGCGCT 3'	527 pb
	PHEPUT-R4	5' TCAGATATACACCGTACCGCGCAGGTACAAC 3	
C-3'	PHEPt12-F2	5' TGTCGAAGTTGACCTGTGCGGCCAT 3'	595 pb
	PHEPUT-R4	5' TCAGATATACACCGTACCGCGCAGGTACAAC 3'	
C β -3' <i>nested</i>	PHEPt12-F1	5' AGCAGGCCGAGGTGCTGCGCT 3'	502 pb
	PHEN-R3	5' TACAACGCCGCCCGCCCGCTGA 3'	
Controle de 170 pb	PHEPt12-F1	5' AGCAGGCCGAGGTGCTGCGCT 3'	170 pb
	PHEPt12-R1	5' CGATAGACCGCTCTGGCGCTGCTC 3	

Todos os *amplicons* com tamanhos esperados foram amplificados com a utilização de um *primer* baseado na sequência parcial do gene da Pt12 (PHEPt12) e outro *primer* baseado na sequência do gene em na estirpe DLL-E4 (PHEPUT e PHEN).

Para confirmar que os fragmentos amplificados correspondiam a sequência de interesse, foram utilizados os *primers* (PHEPt12-F1 E PHEPt12-R1) flanqueando uma região de 170 pb específica do gene *PhzF* da Pt12, próxima à região central do gene (Figura 3).

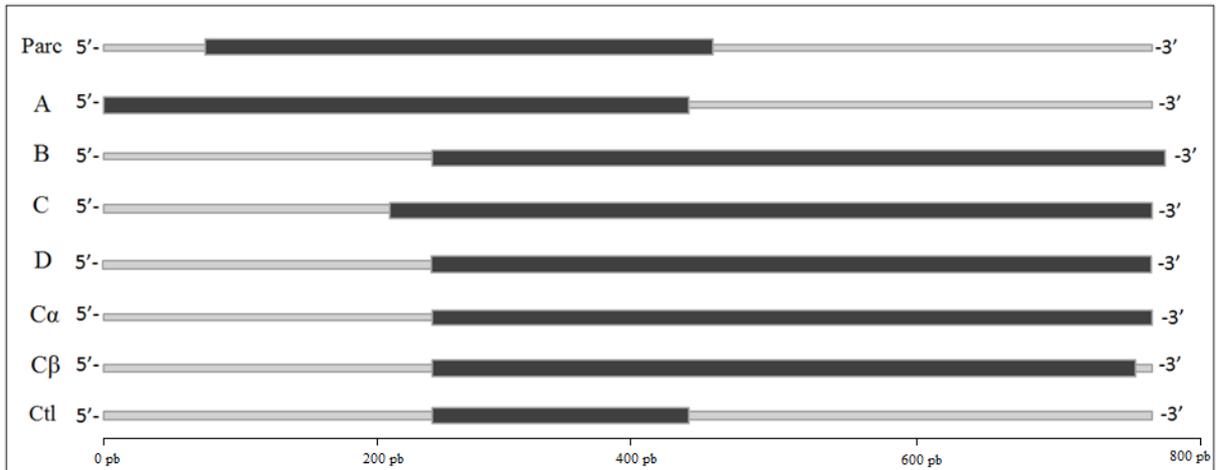


Figura 3. Posição da seqüência controle de 170 pb (Ctl) comparada com as posições esperadas dos fragmentos do gene *PhzF* isolados e clonados (especificados na Tabela 1) e com a posição da seqüência parcial isolada por Barros & de Souza (Parc).

A extremidade 5' foi isolada a partir do fragmento "A" de 432 pb. Posteriormente, a extremidade 3' foi isolada a partir dos fragmentos "Cα" e "Cβ", de 527 pb e 502 pb (Figura 4, item A). Apenas clones transformados com estes fragmentos apresentaram resultado positivo conclusivo para PCR de colônia com *primers* da seqüência controle de 170 pb (Figura 4, item B).

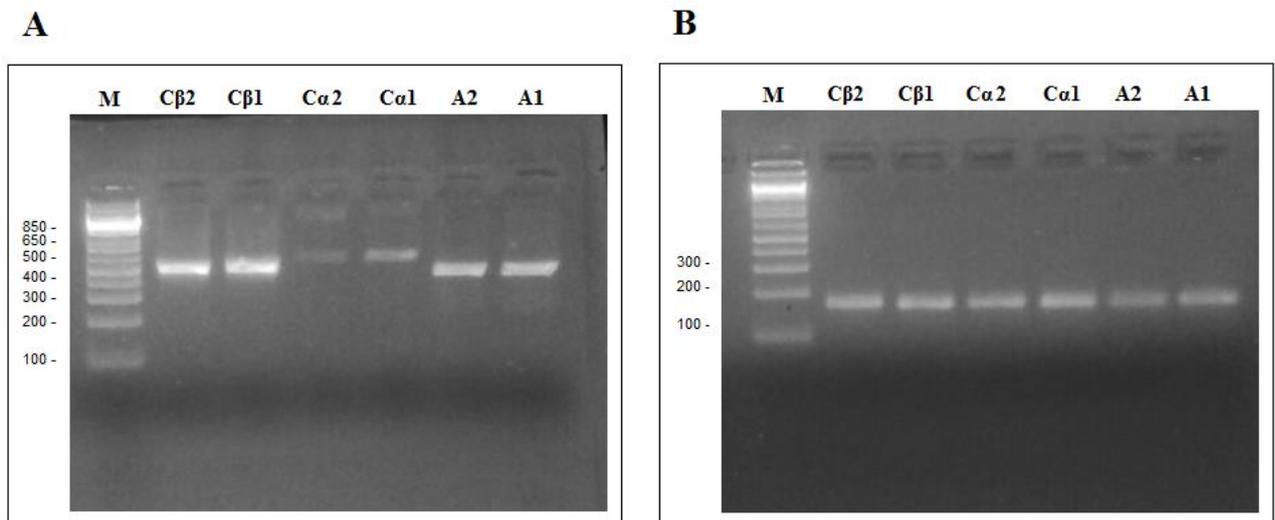


Figura 4. A) Visualização do tamanho dos fragmentos transformados nos clones A1, A2, Cα1, Cα2, Cβ1 e Cβ2. B) Amplificação da seqüência controle de 170 pb em PCR de colônia dos clones A1, A2, Cα1, Cα2, Cβ1 e Cβ2. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Houve várias tentativas para o isolamento da porção 3' do gene. Os fragmentos B (540 pb) e D (527 pb) apresentaram resultados semelhantes. Ambos os fragmentos apresentaram tamanho esperado entre 500 e 650 pb (Figura 5, item A) porém o resultado para os ensaios de

PCR de colônia da sequência controle foi negativo. Ao invés da amplificação de um fragmento de 170 pb, ocorreu, em ambos os casos, a amplificação de um fragmento de cerca de 500 pb (Figura 5, item B). Isto indicaria que ambos os fragmentos não são de interesse.

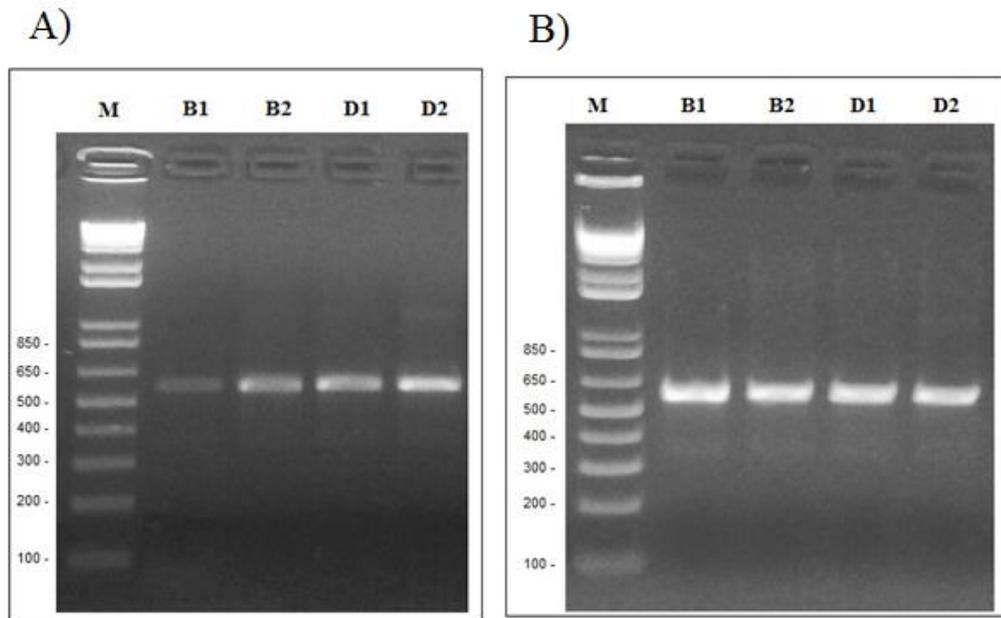


Figura 5. A) Visualização do tamanho dos fragmentos transformados nos clones B1, B2, D1 e D2. B) Amplificação da sequência controle de 170 pb em PCR de colônia dos clones B1, B2, D1 e D2. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Um clone transformado com o *amplicon* amplificado pela combinação de *primers* “C” apresentou resultado positivo para a sequência de 170 pb. Porém este resultado não se repetiu em testes seguintes. A partir deste resultado, foram realizados ensaios de *nested* PCR do *amplicon* “C” com *primers* que originaram os fragmentos “C α ” e “C β ”.

Os clones transformados com os fragmentos “A”, “C α ” e “C β ” também apresentaram resultado positivo para o sequenciamento. A partir do alinhamento dos fragmentos sequenciados foi possível construir uma sequência de 713 pb. Somada às sequências dos *primers*, foi possível obter uma sequência do tamanho de 789 pb (Figura 5). Este é o tamanho esperado para o gene *PhzF* no isolado Pt12, baseando-se nas sequências correspondentes nas estirpes *P. putida* DLL-E4 (AC CP007620.1), *P. plecoglossicida* NyZ12 (AC CP010359.1) e *P. monteilii* SB3101 (AC CP006979.1).

```

catgcaacttgaaatcttccaggtcgatgccccctttccgcccagccctttggtggcaacccg
M Q L E I F Q V D A F S A E P F G G N P
gccccggtgatccccgctgcaaagctggctgccggacgatctgctgcaacgcatcgccgaa
A A V I P L Q S W L P D D L L Q R I A E
gagaacaacctgtcggaaaccgctacttctgtgcgcaatggcgaaaccttcgacctgccc
E N N L S E T A Y F V R N G E T F D L R
tggttcacccccagtgctcgaagttgacctgtgcccgatgccaccctggcgctggcctac
W F T P S V E V D L C G H A T L A S A Y
gtgctgttcgagcaactggcgagcaggccgaggtgctgcccgttcagtagccgtagcgggt
V L F E Q L G E Q A E V L R F S T R S G
gaactgctgtcagccggggggcgacggcctgctggcgatggactttccggccaagcag
E L R V S R G G D G L L A M D F P A K Q
ccggtggctgtcagacctgccggccggctgctggcgccgttggggctgagcagcgcaga
P V A V D L P A G L L A A L G L S S A R
gccgtctatcgctcggatgattatgtggtggatcgacgaccggggcggtacttgcctcg
A V Y R S D D Y V V V I D D R A V L A S
ttgaagcctgatttcgcttgcctgtcgacattcgacgtacggcgcatcgccggtgacggct
L K P D F V A L S T F D V R G I A V T A
gccccgcccgatcatgatttcgtcaccggttggttcggcccacgggttgggggtcaacgaa
A G R D H D F V T R W F G P R V G V N E
gaccggctcaccggctctgcccatacctcgctggcaccgctgtggtccgcccattgctgggc
D P V T G S A H T S L A P L W S A M L G
aagcgcgattgacctgcaacaaggcgggcccgcgcaaggccagctgcattgtgaagtg
K R A L T C E O G G A R K G Q L H C E V
ccaggcaatggccgggtgatcattcagcggccggccggcgttgtaacctgcccgggtacggtg
P G N G R V I I S G R A A L Y L R G T V
tatatctga
Y I -

```

Figura 6. Sequência do gene *PhzF* e da hipotética proteína PhzF da *P. putida*, isolado Pt12. As regiões em destaque correspondem aos *primers* PHEPUT-F3 (5'), PHEN-R3 e PHEPUT-R4 (3'). Análise na plataforma *Clustal Omega*.

A hipotética proteína PhzF produzida por este gene, constituída por 262 aminoácidos, apresentou resíduos homólogos ao Glu45, His74 e Asp208, três resíduos de aminoácidos críticos para a atividade catalítica da proteína, presentes em espécies de pseudomonas fluorescentes, como *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*. (LIU *et al.*, 2015; MAVRODI *et al.*, 2010; PARSON *et al.*, 2004) (Figura 6). A sequência proteica também apresentou homólogos para os

resíduos Gly73, Ser213 e Thr211, essenciais para a atividade catalítica através de ponte de hidrogênios (BLANKENFELDT, 2004; LIU et al., 2015).

Amino-terminal

	30	40	50	60	70	80	90
P. fluorescens 2-79	PPAQMQR	IAREM	NLS	ESTFVLK	PRNGG	DALIRI	FPTVNE
P. aeruginosa PAO1	SGERMQR	MAREM	NLS	ESTFVLR	PQQDG	DARIRI	FPTVNE
P. putida S16	LPDDVLQ	RIAEEN	NLS	ETAYFVR	NGETFD	LRWFPT	PVEV
P. putida HB3267	LPDDVLQ	RIAEEN	NLS	ETAYFVR	NGETFD	LRWFPT	PVEV
P. putida DOT-T1E	LPDDVLQ	RIAEEN	NLS	ETAYFVR	KGETFD	LRWFPT	PVEV
P. putida Pt12	LPDDLQ	RIAEEN	NLS	ETAYFVR	NGETFD	LRWFPT	PSVEV

Carboxi-terminal

	170	180	190	200	210	220	230
P. fluorescens 2-79	LHPDHR	ALS	NFHD	MAINC	FAGAG	RRRSR	MFSPAY
P. aeruginosa PAO1	LHPDHR	ALCDF	PD	LAVNCF	FAGAGR	HWRSR	MFSPAY
P. putida S16	SAFDVR	GIAV	TAA	GRGFD	FVTR	WFGP	RVGVNE
P. putida HB3267	LAFDVR	GIAV	TAA	GRGFD	FVTR	WFGP	RVGVNE
P. putida DOT-T1E	SAFDVR	GIAV	TAA	GRGFD	VVTR	WFGP	RVGVNE
P. putida Pt12	STFDVR	GIAV	TAA	GRD	HDFV	TRW	FGRP

Figura 7. Alinhamento das seqüências de aa da enzima PhzF de *P. fluorescens* 2-79 (AC AAC18905.1) e *P. aeruginosa* PAO1 (AC AAC64492.1) e nas linhagens de *P. putida* DOT-T1E (AC AFO48928.1), S16 (AC AEJ14259.1), HB3267 (AC AGA74580.1) e Pt12. Os resíduos em destaque demonstram a posição dos principais sítios responsáveis pela funcionalidade da PhzF em *P. putida*, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*. Alinhamento feito no software *Bioedit Sequence Alignment Editor*.

As posições destes resíduos essenciais para funcionalidade da PhzF encontrados na seqüência do isolado P12 se assemelham às de outras linhagens de *P. putida*, mostrando-se conservadas na espécie e ligeiramente diferentes comparados aos de outras espécies. Porém a não identificação da produção da PCA e a não caracterização da atividade enzimática da PhzF nas linhagens de *P. putida* impossibilitam a inferência da produção da PCA pelo isolado Pt12.

A confirmação do gene *PhzF* com uma possível proteína PhzF funcional indica a produção de fenazina pelo isolado Pt12, porém outras estratégias são necessárias para averiguação da produção do metabólito.

6. CONCLUSÃO

Foi possível realizar o isolamento do gene *PhzF* de *Pseudomonas putida*, isolado Pt12, que corresponde a uma proteína deduzida de 262 aminoácidos, incluindo os principais resíduos de aminoácidos conservados e relacionados a atividade de proteínas PhzF em outras espécies de bactérias pseudomonas.

A presença destes resíduos conservados indica que a PhzF do isolado Pt12 seja funcional, com uma possível síntese do metabólito PCA por esta bactéria. Porém são necessárias outras abordagens para a confirmação da funcionalidade da PhzF, assim como a própria produção da fenazina pela estirpe P12.

7. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, F. C. & CONDURÚ, J. M. P. Cultura da pimenta-do-reino na Região Amazônica. **Belem: IPEAN, Série Fitotecnia**, 2: 149. 1971.
- ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. de L.R. Pimenta-do-reino e suas doenças na Região Amazônica. **Correio Agrícola**, 213: 114-119. 1977.
- ALBUQUERQUE, F. C.; VELOSO, C. A. C.; DUARTE, M. L. R.; KATO, O. R. Pimenta-do-reino: recomendações básicas para seu cultivo. **Belém: EMBRAPA, UEPAE de Belém**, p. 40. 1989.
- ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R.; BENCHIMOL, R. L.; ENDO, T. Resistência de piperáceas nativas da Amazonia a infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. **Acta Amaz**, 31: 341-348. 2001.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410. 1990.
- ANDO, A.; ALBUQUERQUE, F. C. de.; POLTRONIERI, M. C.; TULMANN NETO, A. Obtenção de mutantes resistentes à fusariose (*Fusarium solani* f. sp. *piperis*) em pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) através de irradiação gama. In: **SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE PIMENTA-DOREINO E CUPUAÇU**, 1, 1996. Belém. Anais do Seminário Internacional Sobre Pimenta-Doreino e Cupuaçu: Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental / JICA, p.237-243. (Documentos, 89). 1997.
- BARROS, N. L. F.; DE SOUZA, C. R. B. Molecular characterization of a *Pseudomonas putida* bacterium from *Piper tuberculatum* (Piperaceae) with potential on fungal phytopathogenic control. In: **BRAZILIAN-INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICS**, 2016, Caxambu. Anais do Brazilian-International Congress of Genetics.
- BEDENDO, I. P.; Doenças vasculares. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, L. AMORIN, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.
- BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environ Microbiol**, 7: 1673–1685. 2005.
- BERG, G.; HALLMANN, J. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In: **Microbial Root Endophytes**. SCHULZ, B.J.E.; BOYLE, C.J.C.; SIEBER, T.N. (ed). Springer-Verlag, Berlin, p. 53–69. 2006.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. 1995. **Manual de fitopatologia**. Vol. 1. 6. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 2005.
- BLANKENFELDT, W. Structure and function of the phenazine biosynthetic protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(47):16431–16436. 2004.

- BOUIZGARNE, B. Bacteria for Plant Growth Promotion and Disease Management. In: Bacteria in Agrobiology: Disease Management. **MAHESHWARI, D.K.** (ed). Springer, p. 15-47. 2013.
- BUDZIKIEWICZ, H. Secondary metabolites: fluorescent pseudomonads. **FEMS Microbiol. Rev**, 104: 209–228. 1993.
- BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK; S. GOTT, K. P.; BACKHOUSE, D. Laboratory manual for Fusarium research. Sydney: University of Sydney, 1994.
- CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V.; VAN DER BIJ, A. J.; VAN DER DRIFT, K. M. G. F.; SCHRIPISEMA, J.; KROON, B.; SCHEFFER, R. J.; KEEL, C.; BAKKER, P. A. H. M.; TICHY, H. V.; DE BRUIJN, F. J.; THOMAS-OATES, J. E.; LUGTENBERG, B. J. J. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. **Mol. Plant-Microbe Interact**, 11: 1069-1077. 1998.
- CHIN-A-WOENG, T. F. C.; THOMAS-OATES, J. E.; LUGTENBERG, B. J. J.; BLOEMBERG, G. V. Introduction of the *phzH* Gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 Extends the Range of Biocontrol Ability of Phenazine-1-Carboxylic Acid-Producing *Pseudomonas* spp. Strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 14: 1006-1015. 2001.
- COLYER, P. D. & MOUNT, M. S. Bacterization of potatoes with *Pseudomonas putida* and its influence on post harvest soft rot diseases. **Plant Disease**, 68: 703–706. 1984.
- DASGUPTA, A. & DATTA, P. C. Cytotaxonomy of piperaceae. **Cytologia**, 41: 697-706, 1976.
- DESER. Departamento de estudos sócio-econômicos. Secretaria de Agricultura Familiar. Curitiba, novembro, 2008.
- DUARTE, M. L. R. & ALBUQUERQUE, F. C. Eficiência de diferentes fungicidas no tratamento de estacas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) infectadas por *Nectria haematococca* (*Fusarium solani* f. sp. *piperis*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 6: 169-175, 1980.
- DUARTE, M. L. R. Cultivo da Pimenta do Reino na Região Norte. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, p. 185. 2004.
- DUARTE, M. L. R.; ALBUQUERQUE, F. C.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Cap. 58 Doenças da Pimenteira-do-Reino (*Piper nigrum*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. *et al.* (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. v. 2. 4ª Ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005. p. 507-516.

- DUEHOLM, M. S.; ALBERTSEN, M.; D'IMPERIO, S.; TALE, V. P.; LEWIS, D; NIELSEN, P. H.; NIELSEN, J. L. Complete Genome Sequences of *Pseudomonas monteilii* SB3078 and SB3101, Two Benzene-, Toluene-, and Ethylbenzene-Degrading Bacteria Used for Bioaugmentation. *Genome Announc.* 2014.
- DUIJFF, B. J.; GIANINAZZI-PEARSONAND, V.; LEMANCEAU, P. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. **New Phytol**, 135: 325–334. 1997.
- DWIVEDI, D. & JOHRI, B. N. Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation. **Curr Sci**, 85: 1693–1703. 2003.
- ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M. F. B.; FLORES, M. G. V. Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. **Ciência Rural**, Santa Maria, 37: 1794- 1797. 2007.
- FILGUEIRAS, G. C.; HOMMA, A. K. O.; SANTOS, M. A. S. Conjuntura do mercado da pimenta-do-reino no Brasil e no mundo. In: Workshop da pimenta-do-reino do Estado do Pará. Belém, PA. Situação atual e alternativa para a produção sustentável. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009.
- GAIA, J. M. D; MOTA M. G. C; DERBYSHIRE, M. T. V. C; OLIVEIRA, V. R.; COSTA, M. R.; MARTINS, C. S.; POLTRONIERI, M. C.; Caracterização de ACs de pimenta-do-reino com base em sistemas enzimáticos. **Horticultura brasileira**, v. 25, n. 3, jul.- set. 2007.
- GASTEIGER E., GATTIKER A., HOOGLAND C., IVANYI I., APPEL R. D., BAIROCH A. *ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis* Nucleic Acids Res. 31:3784-3788. 2003.
- GRIGOLETTI JUNIOR, A.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Revista Floresta**, 30: 155-165. 2000.
- GURUSIDDAIAH, S.; WELLER, D. M.; SARKAR, A.; COOK, R. J. Characterization of antibiotic produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens* inhibitory to *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and *Pythium* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 29: 488–495. 1986.
- GUTTERSON, N. I.; LAYTON, T. J.; ZEIGLE, J. S.; WARREN, G. J. Molecular cloning of genetic determinants for inhibition of fungal growth by fluorescent pseudomonad. **Journal of Bacteriology**, 165: 696–703. 1986.
- HAAS, D. & KEEL, C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. **Annu Rev Phytopathol**, 41: 117–153. 2003.

- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.*, 43: 895-914. 1997.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98. 1999.
- HOLLIDAY, P. A. **Dictionary of Plant Pathology**. Cambridge University Press, Cambridge. 1989.
- HOWELL, C. R.; STIPANOVIC, R. D. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. **Phytopathology**, 69: 480–482. 1978.
- HU, X.; WANG, J.; WANG, F.; CHEN, Q.; HUANG, Y.; CUI, Z. Complete genome sequence of the *p*-nitrophenol-degrading bacterium *Pseudomonas putida* DLL-E4. *Genome Announc.* 2014.
- IBGE. 2017. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Banco de dados**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. AC em: 29 de Maio de 2017.
- JAMES JR., D. W. & GUTTERSON, N. I. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. **Applied and Environmental Microbiology**, 52: 1183–1189. 1986.
- KENNEDY, R. K.; NAIK, P. R.; VEENA, V.; LAKSHMI, B. S.; LAKSHMI, P.; KRISHNA, R.; SAKTHIVEL, N. 5-Methyl phenazine-1-carboxylic acid: a novel bioactive metabolite by a rhizosphere soil bacterium that exhibits potent antimicrobial and anticancer activities. **Chem Biol Interact.** doi:10.1016/j.cbi.2015.03.002. 2015
- KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMI, A. F.; CAMARGO, L. E. A.; Rezende, J.A.M. Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas. 3.ed. São Paulo: **Agronômica Ceres Ltda.** p. 725. 1997.
- KRISHNAMURTHY, K. & GNANAMANICKAM, S. S. Biological control of sheath blight of rice: induction of systemic resistance in rice by plant-associated *Pseudomonas* spp. **Curr Sci** 72, p. 331–334. 1997.
- KUMAR, R. S.; AYYADURAI, N.; PANDIARAJA, P.; REDDY, A. V.; VENKATESWARLU, Y.; PRAKASH, O.; SAKTHIVEL, N. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. **Journal of Applied Microbiology**, 98: 145–154. 2004.
- LAURSEN, J. B. & NIELSEN, J. Phenazine Natural Products: Biosynthesis, Synthetic Analogues, and Biological Activity. **Chem. Rev.**, 104: 1663-1686. 2004.

- LEISINGER, T. & MARGRAFF, R. Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads. **Microbiol. Rev.**, 43: 422–442. 1979.
- LI, X.; LI, C. Z.; MAO, L. Q.; YAN, D. Z.; ZHOU, N. Y. Complete genome sequence of the cyclohexylamine-degrading *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12. *J Biotechnol.* 2015 Apr 10;199:29-30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.02.011. Epub 2015 Feb 17.
- LIU, F.; ZHAO, Y-L.; WANG, X.; HU, H.; PENG, H.; WANG, W.; et al. Elucidation of Enzymatic Mechanism of Phenazine Biosynthetic Protein PhzF Using QM/MM and MD Simulations. **PLoS ONE** 10(9): e0139081. doi:10.1371/journal.pone.0139081. 2015.
- LOON, L. C.; BAKKER, P. A.; PIETERSE, C. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol.** 36: 453-483. 1998.
- LUGTENBERG, B. & KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annu Rev Microbiol.**, 63: 541-556. 2009.
- LU, G & MORIYAMA, E. "Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite". *Briefings in Bioinformatics.* 5 (4): 378–388. doi:10.1093/bib/5.4.378. 2004.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, 1: 89-111. 2004.
- MAVRODI, D. V.; KSENZENKO, V. N.; BONSALL, R. F.; COOK, R. J.; BORONIN, A. M.; THOMASHOW, L. S. A Seven-Gene Locus for Synthesis of Phenazine-1-Carboxylic Acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. **J Bacteriol**; 180(9): 2541–2548. May 1998.
- MAVRODI, D. V.; BONSALL, R. F.; DELANEY, S. M.; SOULE, M. J.; PHILLIPS, G.; THOMASHOW, L. S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, **J. Bacteriol.**, 183: 6454 - 6465. 2001.
- MAVRODI, D.V.; PEEVER, T. L.; MAVRODI, O. V.; PAREJKO, J. A.; RAAIJMAKERS, J. M.; LEMANCEAU, P.; et al. Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway. **Appl Environ MicroBiol.**; 76(3):866–879. 2010. doi: 10.1128/AEM.02009-09 PMID: 20008172
- MCDONALD, M., MAVRODI, D. V., THOMASHOW, L. S., and FLOSS, H. G. Phenazine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: branchpoint from the primary shikimate biosynthetic pathway and role of phenazine-1,6-dicarboxylic acid, *J. Am. Chem. Soc.* 123, 9459-9460. 2001.

- MEDEIROS, M. A.; VILELA, N. J.; FRANÇA, F. H. Eficiência técnica e econômica do controle biológico da traça-do-tomateiro em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, 24: 180-184. 2006.
- MCWILLIAM, H.; LI, W.; ULUDAG, M.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y. M.; BUSO, N.; COWLEY, A. P.; LOPEZ, R. *Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI*. Nucleic acids research 2013 Jul;41(Web Server issue):W597-600 [doi:10.1093/nar/gkt376](https://doi.org/10.1093/nar/gkt376). 2013.
- NAKASHIMA, S. *et al.* Levantamento do Solo em Pimentais na Região de Imigração no Município de Tomé-Açu. Belém-Pará, 2003.
- NASCIMENTO, S. B.; LIMA, A. M.; BORGES, B. N.; SOUZA, C. R. B. Endophytic bacteria from *Piper tuberculatum* Jacq.: isolation, molecular characterization, and in vitro screening for the control of *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, the causal agent of root rot disease in black pepper (*Piper nigrum* L.). **Genet. Mol. Res.**, 14: 7567-7577. 2015.
- OLIVEIRA, C. S. **Controle da fusariose da pimenta-do-reino com aplicação de *Trichoderma Harzianum***. Tese (Mestrado em Agricultura Tropical). Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, São MATEUS. 2012. 41p.
- PARSONS, J. F.; SONG, F.; PARSONS, L.; CALABRESE, K.; EISENSTEIN, E.; LADNER, J. E. Structure and Function of the Phenazine Biosynthesis Protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens* 2-79. **Biochemistry**, 43 (39): 12427–12435. 2004.
- PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, 3: 69-72. 2004.
- PING, L. & BOLAND, W. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Trends Plant Sci**, 9: 263–266. 2004.
- PRABHAKARAN NAIR, K.P. Agronomy and economy of black pepper and cardamom. The “King” and “Queen” of Spices. London, **Elsevier Science Publishing**. p. 366. 2011.
- RODRIGUES, W. & ATAÍDE, I. T. Sistema Agroflorestal: “Agricultura em andares”. Belém: POEMAR/Bolsa Amazônia. p. 31. 2001.
- SARHAN, E. A. D. & SHEHATA, H. S. Potential Plant Growth-promoting Activity of *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* spp. as Biocontrol Agents Against Damping-off in Alfalfa. **Plant Pathology Journal**, 13: 8-17. 2014.
- SANTOS, T. T. & VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, 32: 199-212. 2011.

- SCHULZ B. & BOYLE C. What are endophytes? Microbial Root Endophytes (Schulz BJE, Boyle CJC & Sieber TN, eds). **Springer-Verlag**, Berlin. p. 1–13. 2006.
- SHANAHAN, P.; GLENNON, J. D.; CROWLEY, J. J.; DONNELLY, D. F.; O’GARA, F. Liquid chromatographic assay of microbially derived phloroglucinol antibiotics for establishing the biosynthetic route to production, and the factors affecting their regulation. **Anal. Chim. Acta**, 272: 271–277. 1993.
- SILO-SUH, L. A.; LETHBRIDGE, B. J.; RAFFEL, S. J.; HE, H.; et al. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 2023-2030. 1994.
- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **J Nat Prod**, 67: 257–268. 2004.
- STURZ, A. V. & MATHESON, B. G. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. **Plant Soil** 184: 265–271. 1996.
- THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M.; BONSALE, R. F.; PIERSON, L. S. Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, 56: 908–912. 1990.
- TREMACOLDI, C. R. Principais doenças fúngicas da pimenteira-do-reino no Estado do Pará e recomendações de controle. – Belém, PA : Embrapa Amazônia Oriental, 2010.
- VENTURA, J. A.; COSTA, H. Manejo da fusariose da pimenta-do-reino no Estado do Espírito Santo. Vitória: Incaper, 2004.
- WALSH, U. F.; MORRISEY, J. P.; O’GARA, F. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. **Current Opinion in Biotechnology**, 12: 289–295. 2001.
- WELLER, D. M. & COOK, R. J. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. **Phytopathology**, 73: 463–469. 1983.