



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA**

JONALDA CRISTINA DOS SANTOS PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PRESERVAÇÃO DE ISOLADOS DE
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS AO ARROZ**

SÃO LUÍS – MA

2021

JONALDA CRISTINA DOS SANTOS PEREIRA
Engenheira Agrônoma

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PRESERVAÇÃO DE ISOLADOS DE
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS AO ARROZ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Agroecologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thais Roseli Corrêa

SÃO LUÍS – MA
2021

Pereira, Jonalda Cristina dos Santos.

Caracterização molecular e preservação de isolados de bactérias diazotróficas associadas ao arroz / Jonalda Cristina dos Santos Pereira. – São Luís, 2021.

50 f

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, 2021.

Orientadora: Profa. Dra. Thaís Roseli Corrêa.

Coorientadora: Profa. Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues.

1.Métodos de conservação. 2.Bactérias não patogênicas. 3.Fixação biológica de nitrogênio. I.Título.

CDU: 633.18-29

JONALDA CRISTINA DOS SANTOS PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PRESERVAÇÃO DE ISOLADOS DE
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS AO ARROZ**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Maranhão, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, para obtenção do título de mestre em Agroecologia.

Orientadora: : Prof.^a Dr.^a Thais Roseli Corrêa

Co – Orientadora: Prof.^a Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues

Aprovada em: 22/12/2021

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Thais Roseli Corrêa (Orientadora)
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA



(1º examinador)
Prof.^a Dra. Camila Pinheiro Nobre
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA



(2º examinador)
Dra. Erlen Keila Candido e Silva
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Dedico este trabalho a todos os homens e mulheres que perderam suas vidas em decorrência da pandemia do Covid-19, o sol brilhará sobre nós novamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, toda honra e glória por ter permitido que eu chegasse até aqui.

À Universidade Estadual do Maranhão e ao Programa de Pós-Graduação pela experiência e conhecimento adquirido durante esses anos.

Aos meus pais Aldo dos Santos Pereira e Joana Batista Pereira pelo alicerce da vida e por sempre torcerem e acreditarem em mim.

Ao meu querido irmão Jonaldo dos Santos Pereira pelo apoio constante.

Ao meu esposo Anderson Augusto, pelo companheirismo, apoio, cuidado e torcida diários.

A minha filha Julia Cristina, minha fonte de inspiração. Tudo por ela e pra ela.

A minha tia Virvaldina Pereira pelas orações, torcida e por cuidar da minha filha durante todo o período do Mestrado.

Agradeço a minha orientadora, Dra Thais Roseli Corrêa, por ter me tratado com toda calma, inteligência, paciência, sabedoria e compreensão na realização desse trabalho e a minha co-orientadora Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues pela amizade, incentivo, disponibilidade na orientação, auxílio nas técnicas e grande exemplo de vida.

Aos meus amigos de Laboratório, pela troca, amizade, persistência ... Em especial meus amigos Leonardo, Larisse e Erlen que sempre estiveram disponíveis para me ajudar.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que eu pudesse chegar ao fim desta obra.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo financiamento da pesquisa.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação, pela boa convivência e amizade.

Aos professores da banca, pela disponibilidade, compreensão, análise e contribuições para o aperfeiçoamento e melhoria deste trabalho.

A todos, os meus sinceros agradecimentos!!!

“Mas ele foi ferido por causa das nossas transgressões, e moído por causa das nossas iniquidades; o castigo que nos traz a paz estava sobre ele, e pelas suas pisaduras fomos sarados.”

(Isaías 53:5)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÃO	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO	9
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 ARROZ: ORIGEM, ASPECTOS HISTÓRICOS E CULTIVO.....	16
2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	18
2.3 MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE BACTÉRIAS	20
2.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS BACTERIANOS	24
REFERÊNCIAS	26
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS	34
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de código dos isolados bacterianos coletados em municípios maranhenses sob cultivo de arroz de terras altas.	34
Tabela 2. Lista de <i>Primers</i> H e D e suas respectivas metodologias de ampliações.....	37

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Método de Repique Contínuo.	21
Figura 2. Método de Preservação em Óleo Mineral	22
Figura 3. Método de Criopreservação	23
Figura 1. Densidade óptica dos isolados de bactérias expostos a diferentes métodos de preservação.	39
Figura 2. Comportamento dos Primers na Amplificação do DNA.	41
Figura 3. Árvores filogenética construída a partir de sequência para o gene <i>nifH</i> de linhagens de bactérias identificadas como <i>Pseudomonas</i> sp.	42
Figura 4. Árvores filogenética construída a partir de sequência para o gene <i>nifD</i> de linhagens de bactérias identificadas como <i>Pseudomonas</i> sp.	43

RESUMO

PRESERVAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS AO ARROZ

Autora: Jonalda Cristina dos Santos Pereira (Mestranda)

Orientador(a): Prof^a Dra Thais Roseli Corrêa

As bactérias diazotróficas, simbióticas ou de vida livre, exercem papel importante na fixação biológica de nitrogênio e suprimento deste nutriente primário aos vegetais, dentre eles o arroz. O processo de conservação destes microrganismos é fundamental para suprir as demandas da pesquisa agrícola e deve garantir a manutenção das características originais dos isolados, livre de mutações. Os isolados bacterianos preservados em laboratório devem manter suas características originais, e livres de mutações. Este trabalho teve como objetivo avaliar métodos para preservação, e realizar caracterização molecular pela presença dos genes nifD e nifH, em isolados bacterianos importantes na fixação biológica de nitrogênio para a cultura do arroz. Foi realizada a comparação entre os métodos de preservação dos microrganismos a fim de detectar qual deles asseguram a viabilidade, morfologia, fisiologia e genética dos isolados, mantendo a cultura viável por longo tempo em isolados provenientes da da Coleção de Microrganismos Fitopatogênicos “Prof^o. Gilson Soares da Silva – MGSS” do Laboratório de Fitopatologia, da Universidade Estadual do Maranhão. Quanto a caracterização da variabilidade genética, foram testados os métodos de agrupamento entre os isolados, visando a formação de grupos com a maior distância genética identificada. Para a confirmação da presença do gene nif no genoma dos isolados, foram utilizados primers específicos, e as sequências obtidas foram validadas e comparadas com o banco de dados de nucleotídeos National Center for Biotechnology Information (NCBI). A criopreservação confere a melhor preservação dos isolados e ainda, quanto a conservação dos isolados, estes se mantiveram com sobrevida, estavéis e puros diante dos métodos de preservação, mantendo suas configurações e especificidades genéticas e fenotípicas. Os isolados apresentaram altas taxas de similariedade para os genes nifD e nifH do gênero das Pseudomonas. Esse tipo de estudo é importante para contribuir com as pesquisas referentes à análise de DNA e mapeamento genético, e para enfatizar a importância da manutenção de coleções vivas para estudos filogenéticos.

Palavras-chave: Métodos de conservação, bactérias não patogênicas, fixação biológica de nitrogênio.

ABSTRACT**PRESERVATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ISOLATES OF DIAZOTROPHIC BACTERIA ASSOCIATED WITH RICE**

Author: Jonalda Cristina dos Santos Pereira (Mestranda)
Advisor: Prof^a Dra Thais Roseli Corrêa

Diazotrophic bacteria, symbiotic or free-living, play an important role in biological nitrogen fixation and supply of this primary nutrient to plants, including rice. The conservation process of these microorganisms is essential to meet the demands of agricultural research and must guarantee the maintenance of the original characteristics of the isolates, free from mutations. Bacterial isolates preserved in the laboratory must maintain their original characteristics and be free from mutations. This work aimed to evaluate methods for preservation, and perform molecular characterization by the presence of nifs D and H genes, in bacterial isolates important in biological nitrogen fixation for rice. A comparison was made between the methods of preservation of microorganisms in order to detect which one ensures the viability, morphology, physiology and genetics of the isolates, keeping the culture viable for a long time in isolates from the Collection of Phytopathogenic Microorganisms “Prof^o. Gilson Soares da Silva – MGSS” from the Phytopathology Laboratory, State University of Maranhão. As for the characterization of genetic variability, grouping methods among the isolates were tested, aiming at the formation of groups with the greatest genetic distance identified. To confirm the presence of the nif gene in the genome of the isolates, specific primers were used, and the sequences obtained were validated and compared with the National Center for Biotechnology Information (NCBI) nucleotide database. Cryopreservation confers the best preservation of the isolates and, as for the conservation of the isolates, they remained with survival, stable and pure in the face of preservation methods, maintaining their genetic and phenotypic configurations and specificities. The isolates showed high similarity rates for the nifD and nifH genes of the *Pseudomonas* genus. This type of study is important to contribute to research related to DNA analysis and genetic mapping, and to emphasize the importance of maintaining living collections for phylogenetic studies.

Keywords: Conservation Methods, non-pathogenic bacteria, biological nitrogen fixation

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) classificado botanicamente como poáceae de cultivo anual, é um dos alimentos básicos consumidos por mais da metade da população mundial e representa 29% do total de grãos utilizados na alimentação. A nível mundial, o arroz tem o segundo maior volume de produção em grãos, sendo cultivado em mais de 168 milhões de hectares, em diferentes ecossistemas, em temperaturas e regimes hídricos distintos e produção de 741 milhões de toneladas de grãos (SOSBAI, 2016). No Brasil, a área total plantada é de aproximadamente 1.67 milhão de hectares, e com produção de 11.741 milhões de toneladas na safra 2020/2021 (CONAB, 2021).

No Maranhão, o arroz é uma cultura de grande destaque, pelo seu importante papel na segurança alimentar e por seu potencial de geração de renda. Todas as microrregiões do estado produzem o grão, com uma abrangência de 98% dos municípios, tal abrangência geográfica permite a produção da cultura nos mais diversos sistemas de cultivo, do plantio irrigado até o plantio de sequeiro em terras altas (BUOSI *et al.*, 2013).

As exigências pelo nitrogênio (N) na cultura do arroz são bem conhecidas, no entanto, para suprir a deficiência de N em solos, este elemento é normalmente fornecido à esta cultura em forma de adubos sintéticos como a ureia, fertilizante mais disponível no mercado. Portanto, o manejo do nitrogênio sempre foi uma das práticas agrícolas mais populares, com o objetivo de melhorar a eficiência de seu uso, pois na natureza, a maior parte do nitrogênio do solo está disponível na forma de combinações orgânicas, o que impede a assimilação pelas plantas (OKUMURA *et al.*, 2011). Cabe mencionar que a fertilização além de aumentar os custos de produção, também causa grandes impactos ambientais, principalmente devido à contaminação dos lençóis freáticos (CARVALHO; ZABOT, 2012).

Como a fertilização sintética é onerosa, a associação de microrganismos diazotróficos é importante ferramenta para auxiliar na fixação deste nutriente nas plantas. Várias espécies de bactérias potencialmente diazotróficas associadas a gramíneas foram identificadas, tais como: *Azospirillum* spp., *Burkholderia* spp., *Herbaspirillum* spp. e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BUOSI *et al.*, 2013).

Estudos recentes têm apontado que as espécies de *Pseudomonas* são encontradas no sistema radicular das plantas de arroz, destacando-as como microrganismos, além de fixadoras do nitrogênio atmosférico que também podem produzir ácido indol acético (IAA) e realizar as atividades de protease, catalase e urease, que promovem e melhoram significativamente em termos de saneamento e produção vegetal (FERREIRA *et al.*, 2014; PHAM *et al.*, 2017; GUPTA *et al.*, 2020). Portanto, inocular espécies desse gênero pode ser um método alternativo. A aplicação de nitrogênio em

diferentes culturas é ecológica e economicamente viável.

Um dos principais métodos alternativos para reduzir a quantidade de uso de fertilizantes químicos nos ambientes de produção agrícola são os inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio (SPAOLAOR *et al.*, 2016). Essas bactérias além de fixarem o nitrogênio na atmosfera também podem promover o crescimento das plantas, assim como induzir resistência a fitopatógenos (BALDOTTO *et al.*, 2010).

A importância da manutenção, e principalmente, da preservação de microrganismos, caracteriza-se como reflexo da necessidade de utilização de organismos ou espécimes a qualquer momento, quer para fins experimentais, didáticos, industriais ou estudos comparativos. Assim, conhecer o procedimento mais adequado de preservar culturas, e dispor de técnicas simples e eficientes, é de grande valor aos laboratórios de microbiologia. Para tanto, não basta garantir a sobrevivência do agente, mas também considerar a viabilidade e escolha de métodos que não promovam em maior ou menor grau a ocorrência de mutações ou variabilidades (SOLA *et al.*, 2012).

Dessa forma, ao explicitar sobre bactérias é pertinente destacar também sobre os métodos de preservação destas, uma vez que, estes asseguram a viabilidade, morfologia, fisiologia e genética das bactérias, mantendo a cultura por longo tempo e com o mesmo princípio: retardar ou paralisar o metabolismo celular. Destaca-se que não existe um método universal para armazenar patógenos de plantas, pois a seleção do método deve ser baseada na natureza do patógeno e nas suas vantagens e desvantagens.

Além da importância de determinar um método de preservação para armazenar os patógenos de plantas, a associação de estudos moleculares é de grande relevância, seja para uma caracterização à nível molecular da variabilidade genética dos patógenos armazenados, quanto para determinar se há uma manutenção das especificidades genéticas dos isolados armazenados. Cabe ressaltar que os avanços observados nas técnicas moleculares, tem permitido uma alta geração de informações como ao utilizar a reação em cadeia de polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), uma vez que esta reação possibilita a comparação de parentais próximas, com o intuito de incrementar os estudos relativos as associações de bactérias e gramíneas (BRAGA, 2012).

Portanto, a identificação e caracterização dessas bactérias fornecem subsídios para o melhor entendimento das bacterianas associadas a diferentes genótipos do arroz, e assim estabelecer futuras estratégias que beneficie o manejo desses microrganismos e a produção da cultura do arroz. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo testar métodos para preservação dos isolados bacterianos, além de analisar através de caracterização molecular esses isolados, verificando a presença dos genes *nifs*, importantes na fixação biológica de nitrogênio para a cultura do arroz.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ARROZ: ORIGEM, ASPECTOS HISTÓRICOS E CULTIVO

Pesquisadores relatam que o local de origem do arroz foi na Ásia, contudo, a Índia é considerada uma das regiões de maior diversidade, e onde ocorrem numerosas variedades endêmicas. As províncias de Belgala e Assam, bem como Mianmar, têm sido referidas como centros de origem dessa espécie. Duas formas silvestres são apontadas na literatura como precursoras do arroz cultivado: a espécie *Oryza rufipogon* Griff., procedente da Ásia, originando a *Oryza sativa* L.; e a *Oryza barthii* A.Chev. (*Oryza breviligulata*), derivada da África Ocidental, dando origem à *Oryza glaberrima* Steud. (EMBRAPA, 2007).

Considerando seu processo histórico, o arroz se dispersou pelo mundo inteiro, provavelmente, os portugueses que introduziram esse cereal na África Ocidental, e os espanhóis, os responsáveis pela sua disseminação nas Américas e portanto, seu uso na culinária passou a ser generalizado no globo (EMBRAPA, 2007).

Atualmente, o arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como o principal alimento de mais da metade da população mundial, somente na Ásia cerca de 60 a 70% do consumo calórico de mais de 2 bilhões de pessoas é proveniente do arroz e seus subprodutos (BORÉM; RANGEL, 2015).

O Brasil é indicado como o primeiro país a cultivar o arroz no continente americano, o cereal era chamado “milho d’água” (abati-uauapé) que os tupis, antes da chegada dos portugueses, colhiam próximo ao litoral (EMBRAPA, 2000). Em 1587, as lavouras arrozeiras já ocupavam terras na Bahia e, por volta de 1745, no Maranhão. Em 1766, a Coroa Portuguesa autorizou a instalação da primeira descascadora de arroz no Brasil, na cidade do Rio de Janeiro. A prática da orizicultura no Brasil, de forma organizada e racional, aconteceu em meados do século XVIII e daquela época até a metade do século XIX, o país foi um grande exportador de arroz, configurando-se como um importante fator socioeconômico do país (EMPRAPA, 2012).

Os açorianos introduziram o arroz vermelho em meados de 1619 a 1649, no Maranhão, onde foi cultivado quase que exclusivamente até 1772, quando seu cultivo foi proibido para forçar a produção do arroz branco, que era denominado de “arroz Carolina”, cujo o plantio foi incentivado para abastecer Portugal, que estava vivenciando déficit de cereais. Destaca-se que essa prerrogativa não se estendeu apenas para o arroz, mas em diversas outras culturas de cultivo no Estado (CONAB, 2015).

Atualmente, o Maranhão é considerado o maior produtor de arroz do Nordeste, possuindo

também destaque nacional, sendo o 5º estado de maior produtividade do país. Na Safra 2017/2018, o estado obteve uma área colhida de 130.386 hectares, o que representa um rendimento médio de 1.587 kg/ha. Presente em praticamente todo o território maranhense, os municípios que mais produziram a cultura foram: São Mateus do Maranhão, com 30.387 toneladas, seguida por Grajaú com 13.300 toneladas e Arari com 9.950 toneladas (SAGRIMA, 2019).

A atual cadeia produtiva é desenvolvida no estado através de dois ecossistemas propícios para a produção de arroz: várzea e terras altas. No ecossistema de várzea, existe o sistema de cultivo com irrigação controlada (arroz irrigado) e o cultivo sem irrigação controlada. No primeiro, a cultura é irrigada por inundação contínua e controlada com a formação e manutenção de lâmina de água até a maturação do arroz. Esse é o sistema adotado nos municípios de Arari, Igarapé do Meio, Pindaré, Viana e Vitória do Mearim, localizados na Baixada Maranhense. Quanto à modalidade sem irrigação controlada (arroz de várzea úmida), caracteriza-se pelo plantio do arroz em áreas de baixadas, nas quais as chuvas e as enchentes dos rios ou afloramento natural do lençol freático, são as fontes de água para o desenvolvimento das plantas (CONAB, 2015).

Quanto ao arroz de terras altas, ou arroz de sequeiro, o mesmo é caracterizado pelo plantio em áreas não alagadas, ficando à mercê de boas condições pluviométricas para o perfeito desempenho dos estágios fenológicos da cultura (HEINEMANN *et al.*, 2019).

O estado do Maranhão já figurou como o primeiro produtor de arroz de sequeiro ou arroz de terras altas no país, na década de 1970, e o segundo produtor de arroz no total, ocupando 20% das áreas de cultivo e participando com 18% da produção nacional. Na década de 1980, houve uma redução significativa no plantio e produção, nas áreas tradicionais de cultivo, localizadas nos vales dos rios, onde passaram a ser ocupadas pela pecuária bovina (CONAB, 2015).

Diante disso, observa-se que o arroz tem grande potencial de desenvolvimento no Maranhão, devido a área, solo e clima, contudo, a cultura do arroz apresenta baixa produtividade no estado, se comparada à de outras regiões do país. Essa diferença é associada ao fato do arroz maranhense ser um produto normalmente cultivado no sistema de terras altas, sem a utilização de insumos, e com um baixo nível tecnológico (FARIAS FILHO; FERRAZ JÚNIOR, 2009). Esses desafios são caracterizados também pelo pouco investimento realizado em tecnologia, corroborando para a baixa produtiva e portanto, na dinâmica de exportação.

Ainda, é importante considerar que no Maranhão, o arroz é cultivado por pequenos produtores, em cultivo simultâneo com outras culturas, como o feijão e o milho, sendo pouco frequente o cultivo isolado (SANTIAGO; BRESEGHELLO; FERREIRA, 2013). Geralmente o cultivo é feito em áreas de campos inundáveis (vazante), o agricultor define sua área de cultivo, associando três fatores importantes: baixa incidência de ervas espontâneas, disponibilidade de água

para o crescimento das plantas e maior fertilidade dos solos (FERRAZ JÚNIOR, 2000).

Farias Filho e Ferraz Júnior (2009), avaliaram e caracterizam o cultivo de arroz, em sistema de vazante, indicando o potencial agrícola e os atuais problemas desse sistema para a agricultura familiar, na região, foi possível observar que o cultivo de arroz, nesse sistema, possui grande importância socioeconômica e é caracterizado, na Baixada Maranhense, pela pouca utilização de insumos químicos, onde os trabalhos são, normalmente, realizados por mão-de-obra familiar, com o uso de instrumentos simples e em pequenas áreas. Mesmo diante dessa importância, ainda há poucos estudos científicos sobre a agricultura desenvolvida nas várzeas da baixada.

2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) é um elemento indispensável ao metabolismo vegetal com vistas à síntese de proteínas e enzimas fundamentais para a vida das plantas. A forma mineral do nitrogênio participa de inúmeros processos bioquímicos no sistema solo-planta (COUTINHO NETO; SILVA, 2016).

A utilização de microrganismos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, como as bactérias diazotróficas apresenta-se como uma alternativa natural para fornecer parcialmente o N requerido pelos vegetais, e reduzir assim o uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos em leguminosas, cereais e forrageiras (EMBRAPA, 2012).

Bactérias diazotróficas de vida livre são encontradas em diversas espécies vegetais, incluindo representantes da família Poacea, tais como arroz (*Oryza sativa* L.), milho (*Zea mays* L.) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) (BHATTACHARJEE *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2010).

Além de fixar o nitrogênio atmosférico, estas bactérias se caracterizam pela capacidade de produzir hormônios vegetais, solubilizar fosfato, serem antagônicas a espécies patogênicas, além de influenciar o metabolismo nitrogenado da planta, sendo consideradas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas - RPCP (MOREIRA *et al.*, 2010, HUNGRIA, 2011; JAMES; BALDANI, 2012). Dentre os hormônios vegetais produzidos pelas RPCP, destaca-se a síntese de ácido indol acético e de outros compostos indólicos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Assim observa-se que, bactérias diazotróficas endofíticas podem estimular o crescimento das plantas, aumentar a resistência a doenças bem como promover a fixação biológica do nitrogênio (BARBOSA, 2018).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo de fundamental importância para manutenção da vida do planeta, uma vez que apenas uma parcela relativamente pequena de procariotos é capaz de transformar o nitrogênio gasoso para forma assimilável. É caracterizado como

o segundo processo biológico mais importante na terra, e tem se mostrado imprescindível para a sustentabilidade da agricultura, tendo em vista que favorecem o fornecimento do nutriente às culturas com baixo custo econômico e promovem uma diminuição nos impactos ambientais, pela redução do uso de produtos químicos (HUNGRIA *et al.*, 2007).

No arroz, o sistema radicular pode ser colonizado por RPCP, promovendo o crescimento vegetal, aumentando o volume de raízes e melhorando a nutrição da planta. Dentre os microrganismos indicados como promotores de crescimento de plantas, estão bactérias do gênero *Azospirillum* (GUZMÁN *et al.*, 2012) e *Rhizobium* (YANNI *et al.*, 2001) que apresentam 99% de capacidade de promoção de crescimento e de FBN. Também há relatos de maior absorção de N, P, K e Fe em plantas de arroz inoculadas e aumento no vigor de plântulas de arroz após a inoculação com bactérias (FARIA, 2021).

A nitrogenase é a enzima mais importante associada a fixação de nitrogênio, composta de uma mistura equilibrada das proteínas, Ferro e Molibdênio-Ferro na proporção 2:1 (SUR *et al.*, 2010). Trata-se de uma molécula biologicamente complexa que reduz dinitrogênio gasoso à amônia sob temperatura e pressão adequadas.

Em plantas leguminosas, que possuem o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), a enzima nitrogenase desempenha importante papel para a produção agrícola, pois reduz o uso de fertilizantes nitrogenados. Entretanto, este processo também pode ser de fundamental importância em plantas não-leguminosas, tendo em vista que nos últimos anos ensaios utilizando o método da diluição isotópica de, N demonstraram o potencial da FBN em várias culturas não-leguminosas, dentre elas a do arroz (URQUIAGA *et al.*, 1992).

A simbiose com as gramíneas de interesse econômico, como milho, arroz e trigo (*Triticum turgidum* L.), pode estar associadas com bactérias do gênero *Azospirillum*. Outros exemplos importantes seriam a associação de bactérias do gênero *Beijerinckia* com a cana-de-açúcar, *Azotobacter paspali* com a grama batatais (*Paspalum notatum* Flugge) e determinados cultivares de trigo, com espécies do gênero *Bacillus* ssp. (VINHAL-FREITAS; RODRIGUES, 2010).

As espécies do gênero *Pseudomonas* ssp. são compostas por bastonetes gram-negativo, onipresente em águas e solos. Este gênero de bactérias é considerado como o mais adaptável aos ambientes e, segundo Yong *et al.* (2018) possui elevada capacidade de biodegradar vários tipos de compostos orgânicos.

No contexto da agricultura, as bactérias deste gênero têm importância devido as suas contribuições para o crescimento das plantas e controle de doenças, além disso estudos recente destacam o potencial destas bactérias para a fixação do nitrogênio atmosférico (PHAM *et al.*, 2017). Entre as suas características principais estão o rápido crescimento *in vitro*, utilização acelerada de

exsudados de sementes em germinação e raízes, colonização e multiplicação na rizosfera e no interior de plantas, produção de grande variedade de metabólitos (antibióticos, sideróforos e substâncias promotoras de crescimento) e competição contra outros microrganismos (CAMPOS, 2010).

2.3 MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO DE BACTÉRIAS

A escolha do método de manutenção mais adequado, deve levar em consideração as características do agente em estudo, bem como as vantagens e desvantagens de cada técnica disponível. Para o estudo com células, tecidos e microrganismos, há o anseio pelo desenvolvimento de metodologias mais adequadas à sua conservação, porém, observa-se uma lacuna entre as publicações científicas pertinentes, verificando-se um número reduzido de estudos abordando a problemática da seleção e validação de protocolos, principalmente, na manutenção de microrganismos (HEINEMANN *et al.*, 2019).

Existe uma ampla variedade de métodos recomendados para manutenção das culturas em laboratório, descritos na literatura, no entanto, não existe um método específico para os diferentes grupos de bactérias, devendo-se levar em consideração aquele que mantiver, mesmo após longos períodos, as características originais da cultura, ou seja, viabilidade e patogenicidade (HEINEMANN *et al.*, 2017).

Nesse sentido, a importância da preservação, bem como da manutenção de microrganismos é imprescindível, não somente para utilização em laboratórios, mas para conhecer suas especificidades estruturais, objetivando identificar seus aspectos a serem úteis em experimentos e ainda, fomentar estudos comparativos e definir melhor técnica de preservação (SOLA *et al.*, 2012). Deste modo, esses mesmos autores definem os métodos de manutenção de microrganismos de acordo com tempo máximo de preservação:

- Métodos de curto prazo: repique contínuo;
- Métodos de médio prazo: preservação em óleo mineral, preservação em água esterilizada, congelamento a -20°C , preservação em solo estéril;
- Métodos de longo prazo: liofilização, criopreservação.

O método de repique contínuo também conhecido como “subcultura” ou “repicagem periódica”, é um método tradicional bastante utilizado por microbiologistas e fitopatologistas, que consiste na transferência frequente da cultura para um meio estéril e após o crescimento, armazenadas em baixas temperaturas (CEFAR EM NOTÍCIAS, 2011). É considerada uma técnica comum para se alcançar viabilidade a curto prazo, utilizado constantemente em bactérias (COSTA; FERREIRA, 1991).

De acordo com Romeiro (2006), a repetição do processo de repicagem deve ser feita em período específico de acordo com as necessidades e particularidades de cada isolado. no entanto, é importante que o repique seja refeito previamente, de forma a evitar o consumo completo do substrato pelo microrganismo, bem como a desidratação do meio. A fim de evitar a secagem do meio sólido, é aconselhável que os isolados sejam conservados em tubos de ensaio com tampa rosqueável ou selados com parafina, protegidos da luz e mantidos em temperatura entre 5 e 8°C (Figura 1).

Figura 1. Método de Repique Contínuo.



Fonte: Bedendo (2018).

As vantagens deste método são: o baixo custo, não requer equipamentos especializados, não necessita de reativação, não provoca estresse ou injúria celular e o manuseio é simples, possibilitando para as bactérias viabilidade de cinco a 12 meses (ALFENAS; FERREIRA, 2007). Este método clássico apresenta como desvantagens perdas de características genéticas resultante de mutações, maior probabilidade de contaminação por conta da manipulação constante das culturas devido aos repiques contínuos, e disponibilidade de espaço para armazenamento das culturas (COSTA; FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

O meio de cultura adequado é um fator importante para conservação do microrganismo, pois pode proporcionar um intervalo maior de tempo entre as repicagens. Estes meios devem apresentar baixas concentrações de açúcares a fim de evitar crescimento excessivo e prevenir modificações (HIRSCH; MAUCLINE, 2015).

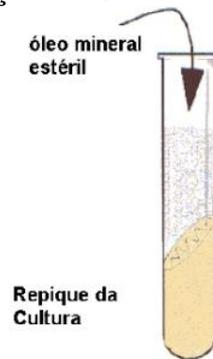
Além disso, a idade das culturas também influencia o emprego deste método de preservação, pois culturas velhas tendem a produzir culturas-filhas alteradas, tanto do ponto de vista morfológico como fisiológico (GIRÃO *et al.*, 2004).

A manutenção em óleo mineral é considerado como uma alternativa simples, que consiste na aplicação de uma camada de 1 (um) centímetro de óleo mineral estéril sobre uma cultura de microrganismos, a fim de limitar a quantidade de oxigênio disponível, provocando assim uma redução

no crescimento e metabolismo do fitopatógeno (ROMEIRO, 2006).

A manutenção de culturas submersas em óleo mineral promove a redução do consumo de oxigênio em torno de 10% em poucas horas. No entanto, de acordo com Costa e Ferreira (1991) as camadas de óleo superiores a 1 (um) centímetro não devem ser usadas, pois pode ocasionar a redução da viabilidade dos microrganismos em condições de esgotamento total de oxigênio. Para a conservação de culturas em tubo inclinado, todo o meio deve ser recoberto pelo óleo, assim o contato dos microrganismos com o ar promove desidratação total da cultura devido à evaporação da água (Figura 2).

Figura 2. Método de Preservação em Óleo Mineral



armazenamento em geladeira

Fonte: Bedendo (2018)

Como vantagens, Canhos *et al.* (2004) e Costa *et al.* (2009) relataram que esta técnica proporciona uma maior longevidade às estirpes, quando comparada ao repique contínuo, bem como a diminuição da velocidade de desidratação do meio de cultura. Todavia, apresentam desvantagens semelhantes à técnica de subcultivo, como o risco de contaminações, instabilidade genética e dificuldades com a utilização do óleo (manuseio e esterilização). Com relação ao processo de esterilização, recomenda-se evitar a formação de umidade buscando evitar riscos de contaminação e manter um controle de temperatura, tendo em vista que temperaturas elevadas proporcionam formação de produtos tóxicos aos microrganismos conservados.

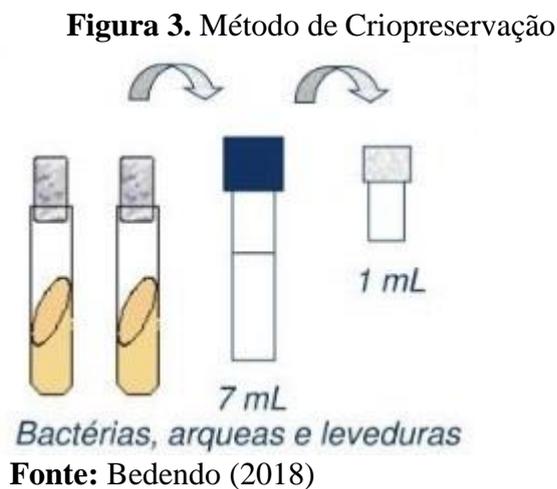
Quanto ao processo de esterilização Romeiro (2006) descreveu a existência de dois procedimentos possíveis para a limpeza do óleo: autoclavagem a 1 atm por 30 minutos, com posterior secagem a 150°C, ou aquecimento a 170°C por 1 hora.

Os óleos mais recomendados para a conservação de microrganismos são: parafina e vaselina (BARKER, 2002), estes devem ser puros e de boa qualidade, apresentar alta viscosidade, densidade relativa entre 0,8 e 0,9 à temperatura de 20°C e, além disso, devem ser isentos de produtos tóxicos.

Pesquisadores relatam que as bactérias podem ser conservadas por períodos de um a sete

anos dependendo da espécie, enquanto fungos sobrevivem por um a cinco anos e as leveduras por até sete anos (COSTA; FERREIRA, 1991; ABREU; TUTUNJI, 2003; COSTA *et al.*, 2009).

A Criopreservação consiste na utilização de baixas temperaturas (-20 a -70°C) para conservar diversos tipos celulares, visando minimizar danos a materiais biológicos, tais como: tecidos, células animais e vegetais, bactérias, fungos e vírus durante o processo de congelamento e armazenamento a frio (Figura 3).



Segundo Costa *et al.* (2009) apesar da existência de diversas técnicas de manutenção de microrganismos, o princípio do congelamento-descongelamento se manteve entre os mais importantes e viáveis para a preservação celular.

Para assegurar a efetividade da criopreservação de microrganismos, uma série de fatores deve ser levada em consideração, tais como: a espécie à qual o microrganismo pertence, tipo de cepa, tamanho e estrutura celular, a fase e a taxa de desenvolvimento, a temperatura de incubação, a composição do meio de cultivo, o pH, a osmolaridade e aeração, o teor de água da célula, o teor lipídico e a composição do meio de congelamento, a taxa de resfriamento, a temperatura e o tempo de estocagem, a taxa de aquecimento e o meio de recuperação (COSTA *et al.*, 2009).

As bactérias podem ser armazenadas em tecido de planta ou cultura pura, sendo que a velocidade de congelamento deve ser lenta (-20 a -40°C), pois do contrário, pode haver formação interna de cristais de gelo causando danos irreversíveis à membrana e a morte celular. Estes danos estão relacionados com o comportamento da água, sob condições de baixas temperaturas. A água congelada expande-se ao cristalizar, e no processo de fusão tende a recrystalizar e aglutinar, formando longos e protuberantes cristais de gelo, capazes de produzir uma série de danos mecânicos, bioquímicos e osmóticos à célula (CARVALHO, 2007).

Portanto, além da cuidadosa manipulação das variações de temperatura empregadas no processo de resfriamento e congelamento de materiais biológicos, é frequente a inclusão de

substâncias protetoras aos sistemas de criopreservação, conhecidas como “agentes crioprotetores”, com intuito de prevenir a cristalização, via depressão da atividade de água (HUBALEK, 2003).

As vantagens deste método permitem o armazenamento por longos períodos, contaminação reduzida e a estabilidade das estruturas biológicas, todavia, necessitam de manutenção constante e o custo com os equipamentos é elevado (HIRSCH; MAUHLIN, 2015).

2.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS BACTERIANOS

A caracterização genética das bactérias diazotróficas tem possibilitado o acesso a novos conhecimentos relacionados a complexidade da FBN, que não ocorre apenas em virtude do processo bioquímico, mas também envolve a organização gênica, e permite sugerir a existência de outros genes, que podem ter contribuições essenciais para este processo em diversas bactérias diazotróficas (REIS; TEIXEIRA, 2015).

Nesse sentido, dentre as técnicas utilizadas para a diferenciação de espécies e raças, em nível de polimorfismo do DNA, encontra-se a reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), a qual se destaca pela rapidez e precisão na detecção, a confiabilidade, e o fato de não serem influenciados pelas condições ambientais (BORÉM; CAIXETA, 2006).

A técnica de PCR consiste na amplificação *in vitro* de um segmento de DNA, delimitado por um par de *primers* (oligonucleotídeos) de sequências específicas, utilizando-se da atividade enzimática da DNA polimerase. Assim, os *primers* se pareiam com a fita simples do DNA-molde e servem de iniciadores para a síntese de uma nova fita de DNA (SOUZA, 2015). Consequentemente, ocorre um aumento na quantidade de uma determinada sequência de DNA, representando então um grande recurso para o estudo destas sequências, e permitindo uma série de aplicações.

Para o sequenciamento genético de bactérias são utilizadas duas abordagens: os processos computacionais de *binning* para os casos onde a análise deve ser feita sem um genoma de referência, ou a classificação, para as situações em que existe um genoma de referência, que foi a abordagem usada nessa pesquisa. Os métodos de classificação permitem que sejam recrutadas sequências específicas com base em alinhamentos, os quais são comparados aos genomas de referência que estão disponíveis nos bancos de dados públicos (LANGMEAD; SALZBERG, 2012).

A utilização mais intensiva de PCR e sequenciamento de DNA na última década, possibilitou a identificação de forma mais precisa dos isolados bacterianos, bem como auxiliou na descoberta de novas bactérias em laboratórios de microbiologia. A amplificação da sequência 16S rDNA na PCR tem desempenhado um papel fundamental nesse processo, tendo em vista que favorece a identificação de bactérias, a descoberta de novos gêneros de bactérias e espécies (WOO *et al.*, 2008).

O gene 16S rDNA tem sido usado de maneira ampla em análise taxonômica e filogenética, o que permite identificar de maneira precisa as bactérias (BRAGA, 2012; MUS *et al.*, 2016) que compõem a diversidade de microrganismos diazotróficos. Assim, é possível fazer o emprego destes microrganismos como inoculantes em culturas agrícolas, especialmente para os cereais, os quais tem evidenciado resultados positivos e promissores (KASCHUK *et al.*, 2006).

A amplificação de outros genes por PCR poderá garantir a precisão e a confiabilidade do esquema filogenético dos isolados bacterianos, uma vez que supera a limitação do gene 16S rDNA na resolução filogenética em grau de gêneros e espécies (MEINTANIS *et al.*, 2008).

Atualmente, várias sequências completas de muitas espécies já são conhecidas e registradas em bancos genéticos, como o National Center for Biotechnology Information (NCBI). Desta forma, pesquisas têm utilizado o sequenciamento total ou parcial do gene 16S rRNA para estudos de filogenia, visto que a sequência do gene 16S rDNA corresponde a regiões altamente conservadas do DNA bacteriano (BRAGA, 2012; LI *et al.*, 2016).

Além dos estudos do gene 16S rDNA, trabalhos recentes têm dado destaque para os genes fixadores de nitrogênio (*nif*), que são genes requeridos para a estrutura, biossíntese, assim como a regulação da nitrogenase, e são encontrados em todos os diazotróficos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os genes *nif* HDK são responsáveis por codificar a nitrogenase, onde o gene *nifH* codifica para as subunidades γ da proteína Fe e os genes *nifD* e *nifK* codificam as subunidades α e β da proteína MoFe respectivamente (SUR *et al.*, 2010). A atividade da nitrogenase de MoFe é a mais utilizada por bactérias diazotróficas, entretanto a organização e o número de genes *nif* necessários para a síntese e montagem dessa enzima variam entre as bactérias diazotróficas (LI *et al.*, 2016).

Santos *et al.* (2020) reportaram em sua pesquisa de sequenciamento genético que quase todas as bactérias diazotróficas apresentavam um conjunto mínimo de seis genes *nif* que tem a função de montar o co-FeMo in vitro, sendo eles: *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN* e *nifB*.

Desde sua primeira descrição, em *Klebsiella pneumoniae*, genes *nif*, associados à fixação de nitrogênio já foram identificados em várias espécies de diazotróficos associativos, endofíticos obrigatórios, espécies de vida livre e simbióticas como cianobactérias e rizóbios. Em *K. pneumoniae*, foram identificados e sequenciados 21 genes *nif*, localizados numa região 20kb do genoma (SOLA *et al.*, 2012).

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. **Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB**. *Universitas Ciências da Saúde*, v. 02, n. 2, p. 236-25. Disponível em: <http://www.publicacoesacademicas.uniceub>. Acesso em: 12 jul. 2021.
- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A. **Inoculação de Fungos Fitopatogênicos**. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). *Métodos em Fitopatologia*. Viçosa. UFV. p. 121, 2007. Disponível em: br/index.php/cienciasaude/article/viewFile/535/356. Acesso em 15 jun. 20121
- BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVARES, F.L.; VIANA, A.P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 34, p. 349-360, 2010
- BARBOSA, Ernandes Silva. **Impacto de herbicidas sobre bactérias diazotróficas associadas à cultura do arroz vermelho**. 2018. 59 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2018.
- BARKER, K. **Manual de iniciação científica em laboratórios de pesquisas biomédicas**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 474 p.
- BEDENDO, I. P. **Manutenção de culturas de fungos e bactérias**. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2018.
- BHATTACHARJEE, R.B.; AQBAL, S.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.80, p.199-209, 2008.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; Brasília, DF: Embrapa Café, 2006. 532 p.
- BORÉM, A.; RANGEL, P. H. N. **Arroz do plantio à colheita**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2015, 242 p.
- BRAGA, L. F. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de arroz (*Oryza sativa*)**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) - Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2012.
- BUOSI, T.; MUNIZ, L. C.; FERREIRA, C. M. **Caracterização e diagnóstico da cadeia produtiva do arroz no Estado do Maranhão**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2013. 35p.
- CAMPOS, J. T. **Rizobactérias promotoras de crescimento de cana-de-açúcar**. 2010. 59f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Curso de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2010.
- CANHOS, V. P.; UMINO, C. Y.; MANFIO, G. P. **Coleções de culturas de microrganismos. Resumo: Coleções de culturas de microrganismos [online]**. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP – Centro de Referência em Informação Ambiental – CRIA, 2004. Disponível em: <http://www.biota.org.br/pdf/v72cap03.pdf>. Acesso em 02 jun. 2021.
- CARVALHO, F. D. Indução de estruturas esféricas ou similares durante a cristalização da água por processos físicos ou químicos. **Ciência Agrotécnica**, v. 31, n. 3, p. 814-820, 2007.

CARVALHO, N. L.; ZABOT, V. Nitrogênio: nutriente ou poluente? **Revista eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 960-974, 2012.

CEFAR EM NOTÍCIAS. **Procedimentos para a conservação de microrganismos. Informativo Cefar de Microbiologia**. Ano VII - Ed. 43 - Out/Nov/Dez 2011 – Circulação Trimestral, 2011.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **A cultura do Arroz**. Org. Aroldo Antonio de Oliveira Neto. Brasília: CONAB, 2015. Disponível em: www.conab.gov.br. Acesso: 09 mar de 2021.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos (2013 -)**, v. 1, n. 1, 2021. Brasília: CONAB, 2021. Disponível em: www.conab.gov.br. Acesso: 15 mar de 2021.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAUJO, S. A. C.; ROLIM, B. N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, Goiânia, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009. Disponível em: [http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo10_2009 .pdf](http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo10_2009.pdf). Acesso em 08 maio 2021.

COUTINHO NETO, A. A.; SILVA, P. P. A. **Nitrogênio: um dos elementos essenciais para as Plantas**. VI Botânica no Inverno 2016. Miguel P. H. (org.), São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016. 223p.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS. **Origem e História do feijoeiro comum e do arroz**. 2000. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164370/1/CNPAF-2000-fd.pdf>. Acesso em: 10 de mar. 2021.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS. **Origem e História do Arroz**. 2007. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/arroz/historia.htm>. Acesso em: 10 de mar. 2021.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISAS AGROPECUÁRIAS. **Resposta de Genótipos de Arroz Irrigado à Fixação Biológica de Nitrogênio**. 2012. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/954388/1/Circular136.pdf>. Acesso em: 10 de mar. 2021.

FARIA, D. R. **Rizobactérias e silício na intensificação da mitigação do arroz de terras altas ao déficit hídrico e a brunose**. 2021. 117 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021.

FARIAS FILHO, M. S. F.; FERRAZ JÚNIOR, A. S. L. A cultura do arroz em sistema de vazante na baixada maranhense, periferia do sudeste da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia. v. 39, n. 2, p. 82-91, abr./jun. 2009.

FERRAZ JÚNIOR, A. S. L. **Arroz de sequeiro em aléias de leguminosas em solos de baixa fertilidade natural**. 2000. 196 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.

- FERREIRA, V.; WIEDMANN, M.; TEIXEIRA, P.; STASIEWICZ, M. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 1, p. 150-170, 2014.
- GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 229-233, 2004.
- GUPTA, V.; KUMAR, G. N.; BUCH, A. Colonization by multi-potential *Pseudomonas aeruginosa* P4 stimulates peanut (*Arachis hypogaea* L.) growth, defence physiology and root system functioning to benefit the root-rhizobacterial interface. **Journal of Plant Physiology**, v. 248, p. 1-30, 2020.
- GUZMÁN, A.; OBANDO, M.; RIVERA, D.; BONILLA, R. Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) asociadas al cultivo de algodón (*Gossypium hirsutum*). **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 14, n. 1, p. 182–190, 2012.
- HEINEMANN, A. B.; RAMIREZ-VILLEGAS, J.; REBOLLEDO, M. C.; COSTA NETO, G. M. F.; CASTRO, A. P. Upland rice breeding led to increased drought sensitivity in Brazil. **Field Crops Research**, v. 231, n. April, p. 57–67, 2019.
- HEINEMANN, A.B., RAMIREZ-VILLEGAS, J., NASCENTE, A., ZEVIANI, W., STONE, L., SENTELHAS, P. Upland rice cultivar responses to row spacing and water stress across multiple environments. **Experimental Agriculture**, v. 53, p. 609–626, 2017.
- HIRSCH, P. R.; MAUCLINE, T. H. The importance of the microbial N cycle in soil for crop plant nutrition. **Advances in Applied Microbiology**, v. 93, p. 45-71, 2015.
- HUBALEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, New York, v. 46, p. 205-229, 2003.
- HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja - Documentos, 283).
- JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. **Plant Soil**, v. 356, p. 1-3, 2012.
- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean grown under the no-tillage 65 and conventional systems in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.32, n.2, p.210-220, 2006.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357-359, 2012.
- LI, X. X.; LIU, Q.; LIU, X. M.; SHI, H. W.; CHEN, S. F. Using synthetic biology to increase nitrogenase activity. **Microbial Cell Factories**, v. 15, p. 43-46, 2016.

- MEINTANIS, C.; CHALKOU, K.; KORMAS, K.; LYMPEROPOULOU, D.; KATSIFAS, E. HATZINIKOLAOU, D.; KARAGOUNI, A. D. Application of rpoB sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus *Geobacillus*. **Letters in applied microbiology**, v. 46, p. 395-401, 2008.
- MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NOBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p. 74-99, 2010.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. 2006.
- MUS, F.; CROOK, M.B.; GARCIA, K.; GARCIA C. A.; GEDDES, B.A.; KOURI, E. D.; PARAMASIVAN, P.; RYU, M. H.; OLDROYD, G. E. D.; POOLE, P. S.; UDVARDI, M. K.; VOIGT, C. A.; ANÉ, J. M.; PETERS, J. W. Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3698-3710, Jul 1 2016
- OKUMURA, H.; KIMOTO, T.; SUDA, JUN. reduction of threading dislocation density in 2h-aln grown on 6h-sic(0001) by minimizing unintentional active-nitrogen exposure before growth. **Applied Physics Express**, v. 4, n. 2, 2011.
- PHAM, V. T. K.; REDIERS, J; GHEQUIRE, M. G. K.; NGUYEN, H. H.; MOT, R.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. **Archives of Microbiologu**, v. 199, p. 513-517, 2017.
- REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Nitrogen fixing bacteria in the family Acetobacteraceae and their role in agriculture. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, 2015.
- ROMEIRO, R. S. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Material didático, [online], Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 2006. Disponível em: <www.ufv.br/dfp/bac/uni11.pdf>. Acesso em 15 abr. 2019.
- SAGRIMA. SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E PESCA Governo do Maranhão. **Perfil da Agricultura Maranhense**. Dezembro/2019. Disponível em: <<https://sigite.sagrима.ma.gov.br/wpcontent/uploads/2020/04/Perfil-da-Agropecu%C3%A1ria-Maranhense-2018-1.pdf>>. Acesso em: 02 mar de 2021.
- SANTIAGO; C. M.; BRESEGHELLO, H. C. P.; FERREIRA, C. M. **Arroz: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2a. ed. rev. ampl. – Brasília, DF: Embrapa, 2013.
- SANTOS, K. D. Genômica comparativa e diversidade de operons contendo genes nif em bactérias diazotróficas. 2020. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2020.
- SOLA, C.; OLIVEIRA, A. P.; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. Enciclopédia Biosfera, **Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 14, 2012.
- SOSBAI. SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Reunião Técnica do Arroz Irrigado, Pelotas, 200p., 2016.

- SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, Botucatu, July/Sept. 2015.
- SPALAOR, L. T.; GONÇALVES, L. S. A.; SANTOS, O.; OLIVEIRA, A. L. M.; SCAPIM, C.; BERTAGNA, F. A. B.; KUKI, M. C. Plant growth-promoting bacteria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 33-40, 2016.
- SUR, S.; BOTHRA, A. K.; SEN, A. Symbiotic Nitrogen Fixation – A Bioinformatics Perspective. **Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 257-273, 2010.
- URQUIAGA, S. CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, p. 105-114, 1992.
- VINHAL-FREITAS, I. C.; RODRIGUES, M. B. Fixação Biológica do Nitrogênio na Cultura do Milho. **Agropecuária Técnica**, v. 31, n. 2, 2010. Disponível em: <<https://periodicos.ufpb.br/index.php/at/article/download/4515/4636>>. Acesso em: 07 mar. 2021.
- WOO, A. J.; MORAN, T. B.; SCHINDLET, Y. CHOE, S. K. LANGER, N. B.; SULLIVAN, M. R.; FUJIWARA, Y.; PAW, B. H.; CANTOR, A. B. Identification of ZBP-89 as a Novel GATA-1 Associated Transcription Factor Involved in Megakaryocytic and Erythroid Development. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 8, p. 2675-2689. 2008.
- YANNI, Y.G.; RIZK, Y.; ABD-EL, F.F.K.; SQUARTINI, A.; CORICH, V.; GIACOMINI, A.; DE BRUIJN, F.; RADEMAKER, J.; MAYA, J.F.; OSTROM, P.; VEJA, H.M.; HOLLINGSWORTH, R.I.; MARTINEZ, E.M.; MATEOS, P.; VELAZQUEZ, E.; WOPEREIS, J.; TRIPLETT, E.; UMALI, G.M.; ANARNA, J.A.; ROLFE, B.G.; LADHA, J.K.; HILL, J.; MUJOO, R.; NG, P.K.; DAZZO, F.B. The beneficial plant growth promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 845-870, 2001.
- YONG, Y.; DYKES, G.; LEE, S. M.; CHOO, W. S. Biofilm inhibiting activity of betacyanins from red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) and red spinach (*Amaranthus dubius*) against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of applied microbiology**, v. 126, 2018.

CAPÍTULO II

**BACTÉRIAS DIAZÓTRÓFICAS: PRESERVAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR**

DIAZOTROPHIC BACTERIA: PRESERVATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION

BACTÉRIAS DIAZÓTRÓFICAS: PRESERVAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Jonalda Cristina dos Santos Pereira
Thais Roseli Corrêa

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate methods for the preservation of bacterial isolates, in addition to analyzing these isolates through molecular characterization, verifying the presence of *nif* D and H genes, which are important in biological nitrogen fixation for rice cultivation. Studies of preservation methods were carried out, considering the continuous rise, mineral oil and cryopreservation, as perspectives of preservation of the explained bacteria. Molecular characterization of the isolates was carried out through DNA extraction, gene amplification, in order to understand the genetic diversity among the isolates. The isolates used were obtained from the collection of phytopathogenic microorganisms at the State University of Maranhão, and came from rice crops. As for the characterization of the genetic variability, the methods of grouping among the isolates were tested, aiming at the formation of groups with the greatest genetic distance identified. To confirm the presence of the *nif* gene in the genome of the isolates, specific primers were used, and the sequences obtained were validated and compared with the National Center for Biotechnology Information (NCBI) nucleotide database. Cryopreservation provides the best preservation of isolates, ensuring survival, stability and purity, maintaining genetic and phenotypic characteristics. Finally, the presence of genetic variability in these isolates was confirmed and the presence of *nif* genes related to nitrogenase synthesis was verified.

Index terms: Preservation methods; characterization of the isolates; *nifs* gen

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar métodos para preservação em isolados bacteriano, e caracterização molecular pela presença dos genes *nifs* D e H, importantes na fixação biológica de nitrogênio para a cultura do arroz. Os isolados, oriundos de cultivos de arroz, foram obtidos da coleção de microrganismos fitopatogênicos da Universidade Estadual do Maranhão. Foram realizados estudos de métodos de preservação, considerando os métodos repique contínuo, óleo mineral e criopreservação. Para a análise molecular, foi realizada uma caracterização a partir da extração de DNA, amplificação dos genes, à fim de compreender a diversidade genética entre os isolados, onde foram testados os métodos de agrupamento entre os isolados, visando a formação de grupos com a maior distância genética. Para a confirmação da presença do gene *nif* no genoma dos isolados, foram utilizados *primers* específicos, e as sequências obtidas foram validadas e comparadas com o banco de dados de nucleotídeos National Center for Biotechnology Information (NCBI). Dentre os métodos de preservação, a criopreservação demonstrou uma maior eficiência, garantindo a sobrevivência, estabilidade e pureza, mantendo as características genéticas e fenotípicas dos isolados. Há variabilidade genética dos isolados associados a fixação biológica do nitrogênio na cultura do arroz, também foi confirmado a presença dos genes *nif*, que está relacionado a síntese de nitrogenase.

Termos para indexação: Métodos de preservação; caracterização dos isolados; genes *nifs*

INTRODUÇÃO

O nitrogênio é o nutriente mais requerido pelas plantas, essencial nas etapas de crescimento, desenvolvimento e reprodução, sendo o mais utilizado, absorvido e exportado pelas culturas. Embora seja abundante na terra, a sua disponibilidade no solo não é suficiente para suprir as demandas, fazendo-se necessário a utilização de fertilização nitrogenada que além de ser onerosa, não é totalmente absorvida pelas culturas, sendo metade dispersada na atmosfera ou depositada no solo, contribuindo para o aumento de gases de efeito estufa, e riscos de contaminação do lençol freático (SILVEIRA; BRAZ; DIDONET, 2003).

Alguns microrganismos são capazes de reduzir o nitrogênio gasoso para a forma inorgânica amônia, em um processo biológico conhecido como “Fixação Biológica de Nitrogênio” (FBN). Isso acontece pela presença da nitrogenase, que é uma enzima extremamente versátil, pois além de N_2 , catalisa a redução de vários outros substratos, assim como é responsável pela quebra da ligação tríplice usando energia celular na forma de adenosina trifosfato (ATP) (BELLENGER et al., 2020).

Muitos estudos têm evidenciado a ocorrência e importância de bactérias diazotróficas no processo de fixação de nitrogênio, bem como na promoção de crescimento em diversas culturas, como no arroz. Esses microrganismos geralmente são de vida livre, encontradas nos solos ou colonizando o interior das plantas, em associação com várias espécies de importância agrônômica, utilizadas como inoculantes em sementes de várias espécies de plantas, para o estímulo do crescimento das raízes e a fixação do nitrogênio atmosférico (MOREIRA et al., 2010).

As bactérias diazotróficas associativas são encontradas em diversas espécies vegetais, essas bactérias conseguem fazer a fixação do nitrogênio atmosférico, além de ter a capacidade de produzir hormônios vegetais, solubilizar fósforo, serem antagônicas a espécies patogênicas, além de influenciar o metabolismo nitrogenado da planta, sendo consideradas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas – RPCP (JAMES; BALDANI, 2012).

A caracterização genética das bactérias diazotróficas tem possibilitado o acesso a novos conhecimentos relacionados a complexidade da FBN, dentre elas a identificação de genes *nifs* que contribuem para a estrutura, biossíntese e regulação da nitrogenase (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A caracterização molecular dos isolados de bactérias diazotróficas se faz necessário para identificar a presença dos genes *nifs K, D e H*, e, afim de obter a confirmação da característica de fixação biológica de nitrogênio, em espécies que não costumam desempenhar esta atividade, abrindo espaços para desenvolver novas pesquisas. Deste modo, este estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade celular e pureza dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* preservados em direntes

metodos, bem como caracterizar se os mesmos apresentam os genes nif, importantes na fixação biológica de nitrogênio.

MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram obtidos da Coleção de Microrganismos Fitopatogênicos “Prof. Gilson Soares da Silva – MGSS” do Laboratório de Fitopatologia, da Universidade Estadual do Maranhão, oriundos de plantas de arroz, mantidos em meio King armazenadas à temperatura de 4°C, estocadas em duplicata, com seus respectivos números de registro, data de isolamento e local de origem, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Lista de código dos isolados bacterianos coletados em municípios maranhenses sob cultivo de arroz de terras altas.

Localidade	Isolados	Nº registro
Arari	ARAf	MGSS357
	ARAr	MGSS358
	PMf	MGSS379
	PMr	MGSS380
Bacabal	BACf	MGSS359
	BACr	MGSS360
	CATEr	MGSS364
	CATEf	MGSS363
Belágua	EBLf	MGSS367
	EBLr	MGSS368
	SNr	MGSS388
	SNf	MGSS387
	ABf	MGSS353
	Abr	MGSS354
	CRf	MGSS363
	CRr	MGSS364
	IGAf	MGSS371
	IGAr	MGSS372
	355f	MGSS393
	355r	MGSS394
	APf	MGSS355
	APr	MGSS356
PRf	MGSS381	
PRr	MGSS382	
Itapecuru	ITAr	MGSS374
	ITAf	MGSS373
Governador Newton Bello	NBf	MGSS375
	NBr	MGSS376
São Benedito do Rio Preto	ESBf	MGSS369
	ESBr	MGSS370
	VERM SBr	MGSS390
	VERM SBf	MGSS389
São Bento	PJf	MGSS377
	PJr	MGSS378

	SM2r	MGSS384
	SM2f	MGSS383
São Mateus	SM3r	MGSS386
	SM3f	MGSS385
	DACAr	MGSS366
Urbano Santos	DACAf	MGSS365
	AVf	MGSS391
	AVr	MGSS392
Total de isolados		42

*As letras minúsculas “f” e “r” nos códigos dos isolados, representam isolamento da folha e raiz respectivamente.

Os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* mantidos pela Coleção de Microrganismos Fitopatogênicos “Prof. Gilson Soares da Silva – MGSS” passaram por um processo onde inicialmente as culturas foram riscadas em placas contendo meio NFB Sólido (15 g ágar/litro) acrescido de 20 mg de extrato de levedura, as quais foram mantidas em NFB Semi-sólido e armazenadas à temperatura de 4°C (Dobereiner *et al.*, 1995).

Para avaliar a viabilidade celular e pureza dos isolados os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram preservados em repique contínuo, óleo mineral e criopreservação. Onde inicialmente os isolados depositados na coleção foram transferidos para placa de Petri contendo meio de cultura King B (MgSO₄7H₂O, 1.5 g; K₂HPO₄, 1.5g; glicerina, 10 ml; para 1000 ml de H₂O destilada; pH 7.2) por 24 horas a 28 °C (KING; WARD; RANEY, 1954).

Para preservação nos métodos repique contínuo e óleo mineral, após crescimento das colônias dos isolados estes foram transferidos para tubos de ensaio contendo King B e conservadas em geladeira a 4-5 °C. As repicagens periódicas foram feitas a cada 20 semanas por 9 meses, observando-se as características fenotípicas das colônias.

Enquanto no método do óleo mineral, após o período de incubação foi adicionada uma camada de óleo mineral “Nujol”, previamente esterilizado em autoclave por 60 minutos a 1 atm e 121°C e em seguida mantido em estufa a 110°C por 1 h. A camada de óleo foi de aproximadamente 2 cm, quantidade suficiente para cobrir todo meio de cultura contendo as bactérias, e posteriormente armazenados em refrigerador com temperatura de 10°C por 9 meses.

No Método de Criopreservação os isolados foram cultivados em meio King B. Após o crescimento das colônias, estas foram removidas com tampão fosfato e centrifugadas a 1320 rpm a 40 segundos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi redissolvido em solução de fosfato e glicerol a 15%. Esta solução serviu para proteger as células contra os danos causados pelo congelamento. Em seguida, foram colocadas assepticamente 5-10 gotas em ampolas de vidro, que foram seladas e congeladas de forma lenta em freezer a -20 a -40° C de modo a evitar a formação de cristais de gelo e posteriormente submetidas ao congelamento final com temperatura de -70°C por 9 meses.

DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE

Aos nove meses de encubação, as culturas bacterianas foram repicadas em triplicatas para meio King B e mantidos em BOD por 48h a 28°C. Após esse período foi adicionado em cada placa 10mL de solução salina tampão fosfato, realizada a raspagem do crescimento da cultura e transferido para cubeta para leitura no Espectrofotômetro, aferido a absorbância a 540 nm.

Os dados da viabilidade celular de todos os métodos aplicados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e realizado o teste de Tukey a 5% para determinação do melhor método de preservação durante o período estocado.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

A extração de DNA de isolados de bactérias foram realizadas por meio do método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). As colônias foram repicadas em meio King B sólido e mantidas à temperatura de 30°C em BOD. Após crescimento das colônias uma ponteira foi utilizada para realizar a raspagem de uma pequena quantidade de células da colônia, colocando-as em contato direto com a solução tampão (1N NaOH/ 10% de SDS, Água Milli-Q-autoclavada) (NIEMAN *et al.*, 1997), e mantendo-as em ebulição durante 15 min em Banho Maria a 95 °C. Posteriormente os eppendorfs foram transferidos para o gelo por 5 minutos e depois centrifugados por 30 a 40 segundos a 13200 rpm.

Logo após foram adicionados 120 µL de TE 1X em cada, e passaram por nova centrifugação a 4 °C por 5 minutos a 13200 rpm. Após a centrifugação uma alíquota de 70 µL foi retirada do sobrenadante (DNA) e transferida para outro eppendorf.

Após extração do DNA dos isolados foi dado início a amplificação via PCR, para detecção dos genes *nifD* e *H*, utilizando 11 *primers*. A reação de PCR foi constituída por 10 ng de DNA, 1,0 µM de cada primer, 2,5 µL de tampão de reação 10 X, 0,75 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTPs, 0,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 18,25 µL de água miliQ em 25 µL. Os ciclos de amplificação foram específicos para cada primer conforme Tabela 2.

Tabela 2. Lista de Primers H e D e suas respectivas metodologias de ampliações.

PRIMER	CONDIÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO
nifHFOR nifHRev	Desnaturação inicial 5 min a 94 °C, 30 ciclos a 94 °C por 45 seg, anelamento a 55 °C por 45 seg e extensão a 72 °C por 45 seg; extensão final a 72 °C por 5 min. No final da amplificação, as amostras foram resfriadas e mantidas a 4 °C.
nifHf nifHI	94 °C a 4 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s; 58 °C por 30 seg e 72 °C por 1 min e 30 seg; finalizando com 10 minutos de extensão a 72 °C.
nifH1F nifH1R	Desnaturação inicial a 94 °C para 5 min, seguido por 40 ciclos de 94°C para 10 seg; 60 °C para 10 seg e 72 °C para 15 seg, e uma prorrogação final a 94 °C para 15 seg.
nifH2F nifH2R	Desnaturação inicial a 94 °C para 5 min, seguido por 40 ciclos de 94°C para 10 seg; 60 °C para 10 seg e 72 °C para 15 seg, e uma prorrogação final a 94 °C para 15 seg.
M13F forward M13R reverse	94 °C a 5 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 seg; 50 °C por 30 seg e 72 °C por 90 seg; e após o último ciclo 72 °C por 7 min, finalizando com resfriamento a 4 °C.
FGPH19 PolR	5 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 56 °C; 2 min a 72°C e 30 min a 72 °C.
PolF PolR1	Desnaturação inicial (5 min a 94 °C); 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94 °C), anelamento (45 seg a 55 °C); extensão (1 min a 72 °C); um ciclo de extensão final (10 min a 72 °C); 4 °C final.
19F 407R	94 °C a 4 min; 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 45 seg e 72 °C por 2 min e uma etapa final de extensão de 72 °C por 4 min.
nIFhfIVE NifHreS	95 °C por 3 min; seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 10 seg e de 60°C por 30 seg.
NifDf NifDr	95 °C por 3 min; seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 10 seg e de 60°C por 30 seg.
HfHr	94 °C a 5 min; 35 ciclos a 94 °C por 1 min; 50 °C por 1 min e 72 °C por 2 min; e após o último ciclo 72 °C por 10 min, finalizando com resfriamento a 4 °C.

O gel de agarose foi corado com Gelred (0,5 µg/mL) e lavado em água destilada. As bandas de DNA foram visualizadas em transiluminador UV acoplado a um sistema de foto documentação MultiDoc-it® (UVP). O marcador de tamanho molecular foi de 1kb DNA Ladder® (BIOLABS).

Os genes amplificados e purificados foram enviados para sequenciamento no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, onde foram adicionados 2 microlitros da Exosap em 5 microlitros do produto da PCR e incubados no termociclador a 37° C por 15 min e a 80° C por 15 minutos. Após o sequenciamento foi realizada a análise dos dados e elaboração de árvore filogenética.

Para as árvores utilizou-se o método *maximum likelihood* e como substituição usou-se Tamura-Nei. O teste de filogenia empregado foi o de bootstrap (com 500 simulações) e o percentual de substituição de nucleotídeos usou-se o percentual uniforme. As árvores são responsáveis por fazer o agrupamento dos isolados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes a viabilidade da preservação dos isolados mostrou que os isolados

apresentaram crescimento de colônias em todos os métodos, entretanto, o método de criopreservação foi o que melhor preservou os isolados. No método de criopreservação, o isolado de folha “MGSS 389”, apresentou densidade óptica significativamente menor que os demais, enquanto que o isolado “MGSS 355”, apresentou a melhor preservação. No caso dos isolados provenientes de raiz, conservados em criopreservação, não houve diferença significativa entre os isolados (Figura 1).

O uso de aditivos crioprotetores tem a finalidade de mitigar os problemas relacionados a instabilidade dos microrganismos, em relação aos métodos de preservação (WESSMAN *et al.*, 2011). A criopreservação foi considerada como o método mais eficiente para a preservação dos isolados, o que pode estar relacionado ao uso do glicerol, pois este apresenta compatibilidade com as estruturas celulares, permite a manutenção dos isolados, e a recuperação estrutural após o descongelamento (CASTRO *et al.*, 2020).

Lobo *et al.*, (2019) reportaram que o uso de criopreservação é capaz de manter as colônias de bactérias crescendo por períodos de 2-3 meses até dois anos, desde que mantidos em temperaturas abaixo de -20° . Angshumanjana *et al.*, (2016) indicaram que as colônias de bactérias como a *Staphylococcus* mantiveram-se viáveis quando mantidas em criopreservação por até três meses, sem apresentar variações nos isolados.

O método de preservação em óleo mineral apresentou resultados similares aos da criopreservação para os isolados de raiz, em que não houve diferença significativa entre os isolados expostos a esse método. Quanto aos isolados de folhas, que foram submetidos a preservação em óleo mineral, para a característica “viabilidade celular, o isolado MGSS389 apresentou os menores resultados. Os isolados MGSS359 e MGSS373 também apresentaram médias de densidade óptica inferiores aos demais isolados. Enquanto que MGSS367, MGSS379, MGSS355 foram os isolados que apresentaram melhor preservação, com maiores médias de densidade óptica (Figura 1).

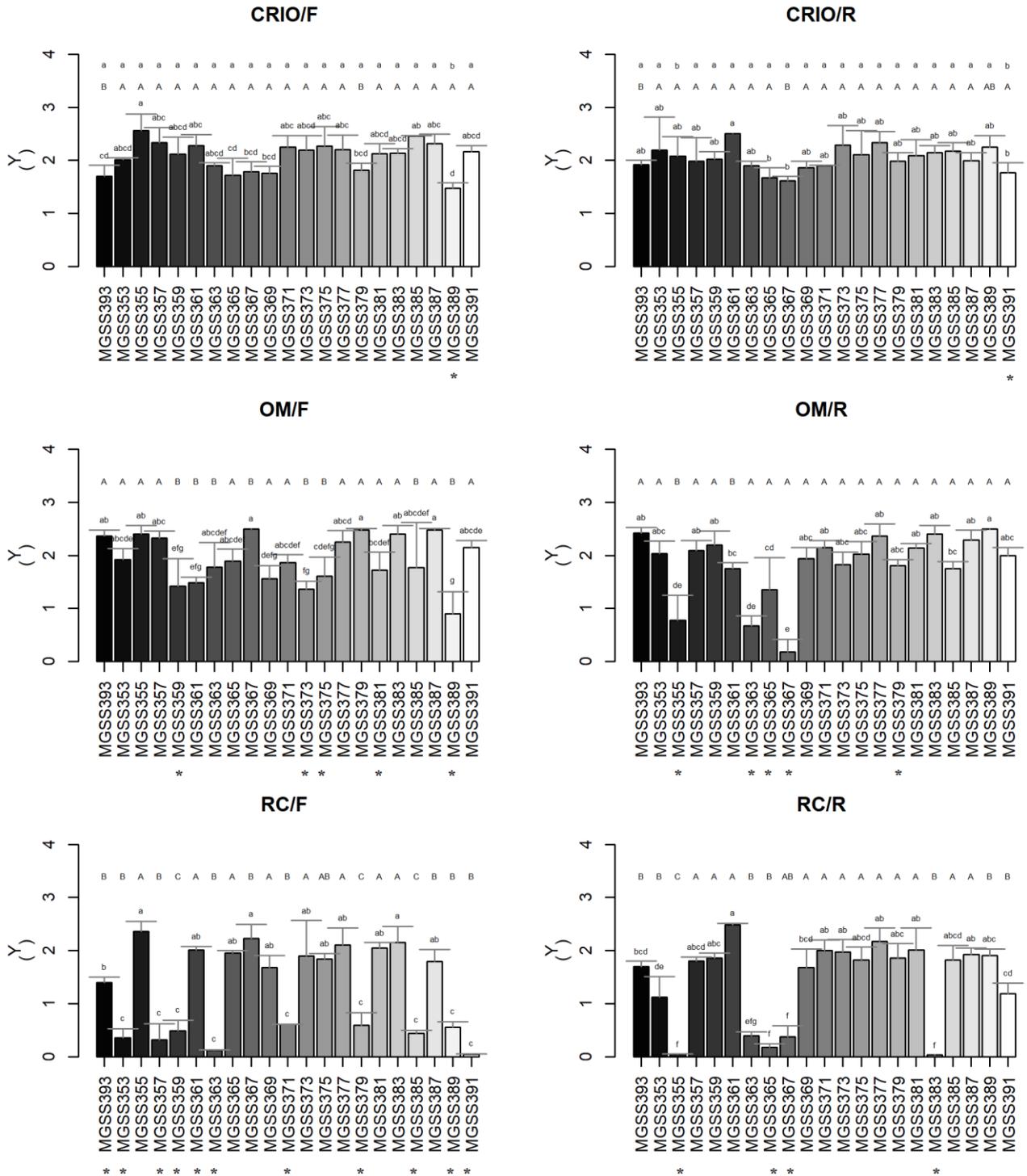


Figura 1. Densidade óptica dos isolados de bactérias expostos a diferentes métodos de preservação.

CRIO: em criopreservação; OM: manutenção em óleo mineral; RC: repique contínuo;

*: indica diferença significativa;

As letras maiúsculas “F” e “R” nos métodos, representam isolamento da folha e raiz, respectivamente.

O uso de óleo mineral para preservação de colônias de bactérias é reportado em diversos estudos de forma bem sucedida, sendo um dos métodos mais utilizados, por ser simples de ser aplicado, e apresentar baixo custo (MAHMMOUD, 2020). Ji e Jin (2014) evidenciaram que as colônias do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus*, além da *Escherichia coli*, preservadas por óleo mineral, mantiveram-se viáveis por três anos, e suas características fenotípicas não apresentaram alterações.

O método de repique contínuo apresentou maiores variações quanto a preservação dos isolados, principalmente para os isolados de folhas, em que MGSS353, MGSS357, MGSS359, MGSS363, MGSS371, MGSS379, MGSS385, MGSS389 e o MGSS391, apresentaram diferenças significativamente menores quanto a densidade óptica que os demais isolados expostos a esse método. Os isolados MGSS355, MGSS367, MGSS383 foram os que apresentaram melhor preservação nesse método. Nos isolados de raiz expostos a esse método, não houve diferença significativa entre os isolados, entretanto MGSS355, MGSS361, MGSS365, MGSS367, MGSS383 apresentaram valores menores aos demais.

O método de repique contínuo é simples e amplamente utilizado, entretanto é considerado como uma opção viável apenas para coleções de culturas pequenas, pois necessita de tempo e trabalho constante para a sua manutenção. Guimarães (2011) destaca que esse método apresenta altos índices de contaminação por ácaros e outros microrganismos, e é inadequada para uso a longo prazo. Apesar das desvantagens que o repique contínuo apresenta, diversas coleções são mantidas dessa forma, pois em alguns casos é o único método recomendado para certos grupos de microrganismos.

O isolado de folha MGSS389 apresentou diferenças significativas em relação aos demais, em todos os métodos de preservação utilizados, com médias de densidade óptica menores que os demais isolados. O isolado de folha MGSS355, por sua vez, apresentou médias significativamente maiores que os demais isolados, para os três métodos de preservação.

Castro et al (2020) recomenda que cada isolado seja mantido no mínimo em dois métodos de preservação diferente, sendo que um deles deve ser obrigatoriamente a criopreservação ou liofilização, uma vez que são métodos eficientes para a preservação dos espécimes a longo prazo.

As reações de PCR para amplificação dos genes *nifD* e *nifH* foi realizada para os 42 isolados estudados com a utilização de 11 *primers*. O *primer* PolF foi o que melhor possibilitou a detecção da presença de genes na leitura da amplificação do DNA, seguido dos *primers* M13F *forward* e FGPH19 (Figura 2).

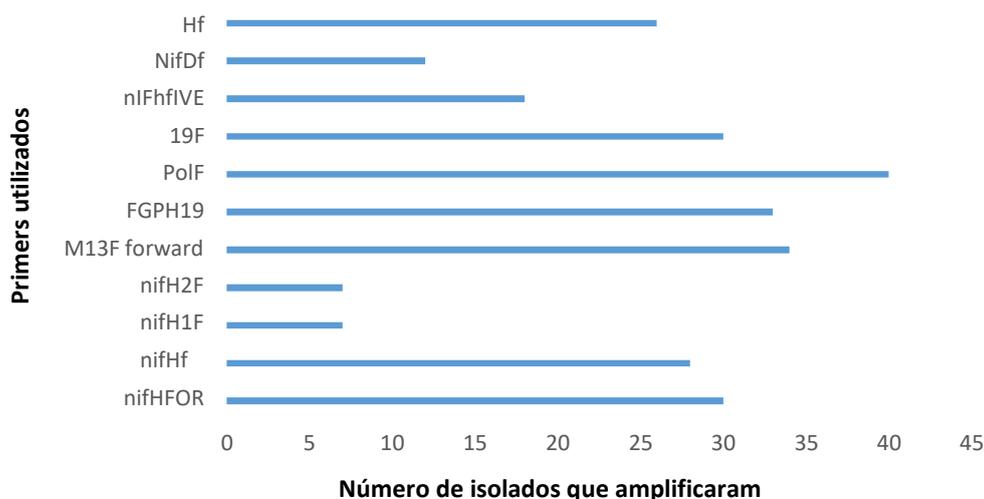


Figura 2. Comportamento dos *Primers* na Amplificação dos genes *nifD* e *nifH* do DNA de isolados bacterianos associados a síntese da nitrogenase na cultura do arroz.

Coelho et al. (2009) em pesquisa realizada com bactérias diazotróficas do gênero *Paenibacillus* teve resultados satisfatórios para amplificação do *nifH* com a utilização do Primer PolF. Ayyaz (2016) ao estudar as sequências de 16S rRNA de *Azospirillum* encontrados na rizosfera da cultura do trigo, os quais também fizeram uso dos primers PolF na fase de amplificação do *nifH*.

Houve diferença em relação a cobertura de sequência para os genes *nifs*, essa disparidade pode estar relacionada a diferenças na cobertura, e na especificidade do *primer*. Portanto, é fundamental que o *primer* possua um banco de dados, que represente toda a diversidade da sequência alvo, pois isso permite a maior eficiência dos resultados (GABY; BUCKEY, 2012).

Detectou-se a variabilidade genética nos isolados MGSS387r, MGSS375f, MGSS385r, MGSS355f, MGSS359r, MGSS365r, MGSS387f para os genes *nifD* e *nifH*. Os genes amplificados e purificados foram a base para a elaboração da árvore filogenética.

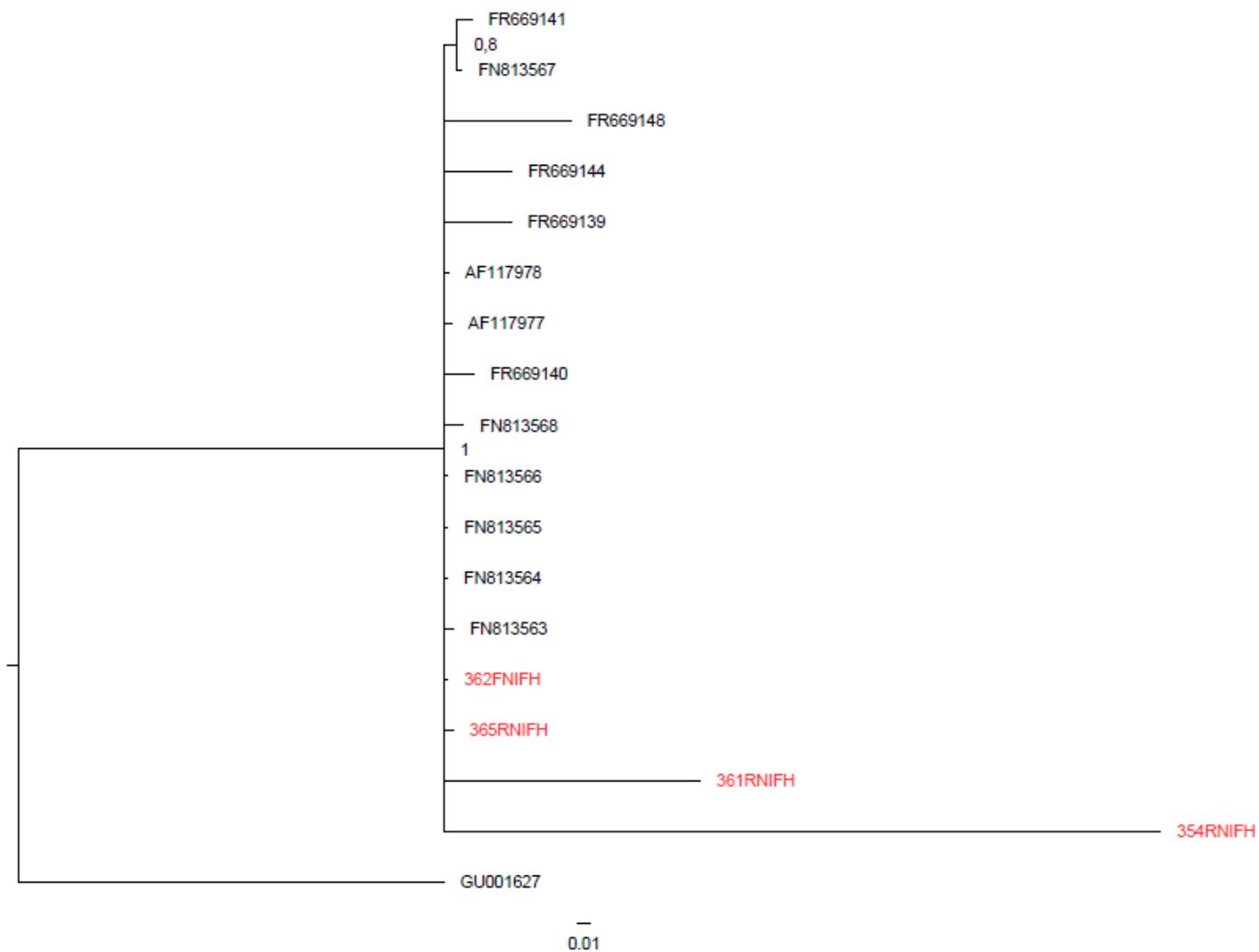


Figura 3. Árvore filogenética construída a partir de sequência para o gene *nifH* de linhagens de bactérias identificadas como *Pseudomonas* sp.

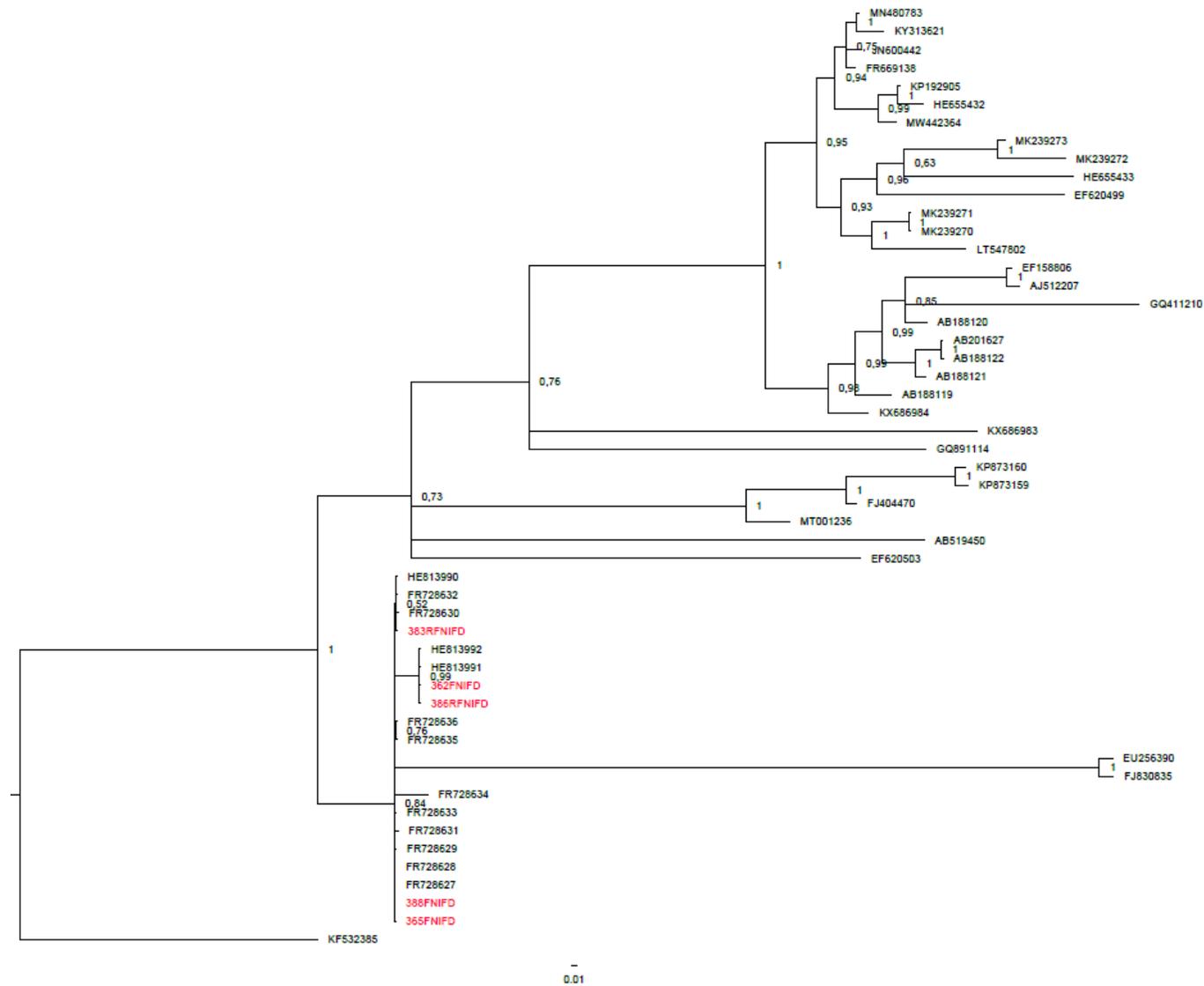


Figura 4. Árvore filogenética construída a partir de seqüência para o gene *nifD* de linhagens de bactérias identificadas como *Pseudomonas* sp.

A partir da árvore filogenética construída foi possível observar que os isolados 362FNIFH, 365RNIFH, 361RNIFH, 354RNIFH estão filogeneticamente próximos de isolados da espécie *P. stutzeri* (Figura 3). Por sua vez, os isolados 388FNIFD e 365FNIFD compartilham mesmo ancestral com sequências da espécie de *P. stutzeri* (FR728627, FR728628, FR728629 e FR728631). O isolado 383RFNIFD agrupou-se em um clado com as sequências FR728730, FR728632 e HE813990, que pertencem a espécie de *P. stutzeri* (Figura 4).

A *P. stutzeri* é uma proteobactéria diazotrófica que foi originalmente isolada da rizosfera do arroz. Normalmente coloniza as superfícies das raízes, mas também pode penetrá-las e crescer endofiticamente. Os genes para a síntese, maturação e funcionamento da nitrogenase estão agrupados em uma ilha genômica, sugerindo que a propriedade de fixação biológica de nitrogênio é adquirida por transferência lateral de genes de um ancestral diazotrófico (ZHAN et al., 2019).

A ampla diversidade filogenética dos microrganismos que realizam a fixação de N é responsável por uma variabilidade genética considerável, mesmo para o caso do *nifH*, pois esse gene apresenta alto grau de degeneração das sequências de nucleotídeos (MARUSINA et al., 2001).

O conjunto das sequências de nucleotídeos dos genes *nifDH* que estão disponíveis no GenBank ainda é pequeno, se comparado às sequências de outros genes que são estudados com maior frequência, como no caso do gene 16S rRNA (SOUZA, 2017). Nesse sentido, este estudo tem relevada importância para essa área de pesquisa, pois contribui com informações a respeito dos genes *nifDH* para a cultura do arroz no estado do Maranhão, onde trabalhos relacionados a caracterização de isolados quanto a fixação biológica do nitrogênio ainda são escassos.

O gene *nifH* tem a função de fazer a codificação da subunidade de proteína de ferro da nitrogenase. Vale destacar que a análise filogenética obtida a partir desse gene, apresenta consistência com a filogenia do gene ribossomal presente no gene 16S dos microrganismos diazotróficos (ZEHR et al., 2003).

Entre os genes do operon *nif*, o *nifH* é o mais estudado, e possui uma extensa biblioteca de coleções sequenciadas que foram obtidas tanto em microrganismos cultivados, quanto em não cultivados, e que foram isolados em ambientes diversos (UEDA et al., 1995; HAMELIN et al., 2002).

Os estudos de diversidade de nitrogenases são amplamente realizados usando como base as análises filogenéticas do *nifH*, e em alguns casos usa o *nifD*, entretanto a quantidade de sequências relativas a esse gene ainda são escassas, o que faz com que a análise nesse sentido sejam mais limitadas do que as do *nifH*, (POTRICH, 2001).

O uso dos genes *nifD* e *nifH* em pesquisas relacionadas a fixação biológica do

nitrogênio, se deve em função dos genes *nifHDK* terem a função de codificar as proteínas estruturais do complexo enzimático, a chamada “nitrogenase” (KOIRALA; BRÖZEL, 2021). Esse complexo é formado por duas metalo-proteínas, a Fe-proteína e a MoFe-proteína, onde o gene *nifH* é responsável por codificar as subunidades γ da proteína Fe, enquanto que os genes *nifD* e *nifK* fazem a codificação de subunidades α e β da proteína MoFe (SUR *et al.*, 2010).

CONCLUSÃO

Entre os métodos de preservação dos isolados bacterianos estudados, foi verificado que a criopreservação é o método que melhor conserva os isolados de arroz, pois além de garantir a manutenção da pureza, estabilidade e sobrevivência, mantém suas configurações e especificidades genéticas e fenotípicas.

Os isolados de *Pseudomonas* ssp. estudados apresentaram os genes *nif*, os quais são relacionados com a síntese da enzima nitrogenase.

REFERÊNCIAS

- ANGSHUMANJANA, A.; DIPJITDEY, A. J.; TUDU, N. Selection of Storage Methods for Maintenance of Different Stock Cultures. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. 5(10):1097-1104, 2016.
- AYYAZ, K.; ZAHEER, A.; RASUI, G.; MIRZA, M.S. Isolation and identification by 16S rRNA sequence analysis of plant growth-promoting azospirilla from the rhizosphere of wheat. **Brazilian Journal of Microbiology**. 47(3):542-550, 2016.
- BELLENGER, J. P.; DAMAJOUX, R.; ZHANG, X.; KRAEPIEL, A. M. L. Biological nitrogen fixation by alternative nitrogenases in terrestrial ecosystems: a review. **Biogeochemistry**. 149(1):53-73, 2020.
- CASTRO, H. C.; CHAGAS, E. F.; LIBERAL, M. H. T.; CARDOSO, C. V.; BARBOSA, E. V.; MAGALHÃES, H. Uso de crioprotetores para a preservação de coleções microbianas mantidas para PD&I. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**. 3(1):143-156, 2020.
- COELHO, M.R.R.; CARNEIRO, N.P.; MARRIEL, I.E.; SELDIN, L. Método molecular para estudos ecológicos de bactérias diazotróficas do gênero *paenibacillus* em amostras ambientais. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 27p.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.
- GABY, J. C.; BUCKLEY, D. H. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. **Plos One**. 7(7):1-12, 2012.
- GUIMARÃES, L. C. **Método de preservação de fungos potencialmente toxigenicos**. 2011. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras,

Lavras, 2011.

HAMELIN, J.; FROMIM, N.; TARNAWSKI, S. et al. *nifH* gene diversity in the bacterial community associated with the rhizosphere of *Molinia coerulea*, an oligonitrophilic perennial grass. **Environmental Microbiol.** 4(8):477-481, 2002.

JAMES, E.K.; BALDANI, J.I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. **Plant and Soil.** 356(1):1-3, 2012.

JI, Y. X.; JIN, R. C. Effect of different preservation conditions on the reactivation performance of anammox sludge. **Separation and Purification Technology.** 133(1):32-39, 2014.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **The Journal of laboratory and clinical medicine.** 44(2):301-307, 1954.

KOIRALA, A.; BRÖZEL, V.S. Phylogeny of nitrogenase structural and assembly components reveals new insights into the origin and distribution of nitrogen fixation across bacteria and archaea. **Microorganisms.** 9(8):1-21, 2021.

LOBO, C. B.; TOMÁS, M. S. J.; VIRUEL, E.; FERRERO, M. A.; LUCCA, M. E. Development of low-cost formulations of plant growth-promoting bacteria to be used as inoculants in beneficial agricultural technologies. **Microbiological research.** 219(1):12-25, 2019.

MAHMMOUD, E. N. Comparison of Preservation Methods of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Bacteria J Pure Appl Microbiol.** 14(3): 2173-2180, 2020.

MARUSINA, A.; BOULYGINA, E.; KUZNETSOV, B.; TOUROVA, T.; KRAVCHENKO, I. A system of oligonucleotide primers for amplifying *nifH* genes from various taxonomic groups of prokaryotes. **Mikrobiologiya.** 70(1): 86-91, 2001.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NOBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae.** 1(2):175-196, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: UFLA, 2006. 623p.

NIEMAN, S.; PUEHLER, A.; TICHY, H.V.; SIMON, R.; SELBITSCHKA, W. Evaluation of the resolving power three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. **Journal of Applied Microbiology.** 82(1):477- 484, 1997.

POTRICH, D. P. L. M. Partial characterization of *nif* genes from the bacterium *Azospirillum amazonense*. **Brazil Journal of Medical and Biological Research.** 34(9):1105-1113, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, 1989. 2028p.

SILVEIRA, P.M.; BRAZ, A.J.B.P.; DIDONET, A.D. Uso do clorofilômetro como indicador da necessidade de adubação nitrogenada em cobertura no feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** 38(9):1083-1087, 2003.

- SOLA, C.; OLIVEIRA, A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE, C.S.M. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera - Centro Científico Conhecer**. 8(14):1938-1418, 2012.
- SOUZA, F. G. **Isolamento, identificação e seleção de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal associadas à cultura do sorgo, em solos de diferentes biomas**. 2017. 203 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.
- SUR, S.; BOTHRA, A. K.; SEN, A. Symbiotie Nitrogen Fixation – A Bioinformatics Perspective. **Biotechnology**. 9(3):257-273, 2010.
- UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N. et al. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of nifH gene sequences. **Journal of Bacteriology**. 177(5):1414-1417, 1995.
- WESSMAN P.; MAHLIN, D.; AKHTAR, S.; RUBINO, S.; LEIFER, K.; KESSLER, V. Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 91(14):2518-2528, 2011.
- ZAHN, Y.; DENG, Z.; YAN, Y.; ZHANG, H.; LU, C.; YANG, Z.; SHANG, L.; HUANG, Y.; LV, F.; LIU, Y. WANG. S.; CHEN, S.; ZHANG, X. X.; CHENG, Q.; LIN, M. NfiR, a New Regulatory Noncoding RNA (ncRNA), Is Required in Concert with the NfiS ncRNA for Optimal Expression of Nitrogenase Genes in *Pseudomonas stutzeri* A1501. **Applied and Environmental Microbiology**. 35(14):1-18, 2019.
- ZEHR, J.P.; JENKINS, B.D.; SHORT, S.M. et al. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**. 5(7):539-554, 2003.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Formulários e preparação de manuscritos

1. Os conceitos e conclusões incluídos nos trabalhos são de inteira responsabilidade dos autores.
 2. Ciência e Agrotecnologia é uma revista científica editada trimestralmente pela Editora da Universidade Federal de Lavras (Editora UFLA). Publica trabalhos científicos nas áreas de Ciências Agrárias, Zootecnia e Veterinária, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Economia e Administração do Agronegócio, Engenharia Rural, elaborados por pesquisadores de comunidades científicas nacionais e internacionais. A submissão de um manuscrito a este periódico exige que ele não tenha sido publicado nem esteja sob consideração para publicação em outro lugar. Após a aceitação para publicação, os autores atribuem à revista direitos autorais completos do manuscrito em todos os idiomas e países.
 3. Processo de publicação: Os manuscritos submetidos serão encaminhados ao corpo editorial para serem inicialmente avaliados em termos de relevância comparativa para outros trabalhos da mesma área que foram submetidos para publicação. Se for considerado relevante, o trabalho será submetido a revisores cegos. Se aprovado e se necessário, o manuscrito pode retornar ao autor correspondente para correções. Se as correções não forem retornadas dentro do prazo exigido, o processo de publicação será automaticamente cancelado. As correções solicitadas não atendidas sem justificativa também podem levar à anulação. Após estas revisões, o manuscrito receberá correções de nomenclatura científica, inglês, referências e português. Após essas correções, o manuscrito será editado e publicado.
 4. Custo da publicação: O custo para publicação é de US \$ 15,00 (quinze dólares) por página editada (página impressa no formato final) até seis páginas e US \$ 30,00 (trinta dólares) para cada página adicional. Uma taxa não reembolsável de US \$ 30,00 (trinta dólares) deve ser paga no momento do envio, que será descontado do custo final do manuscrito editado (formato final). Na apresentação, o recibo do depósito bancário ou transferência bancária (a pagar ao FUNDECC / Livraria, Banco do Brasil, Agência 0364-6; Conta número 75.353-X) deve ser enviado em anexo no campo “Upload de Arquivo”.
 5. Os manuscritos devem ser submetidos eletronicamente (www.editora.ufla.br), redigidos em inglês e utilizar apenas abreviações e nomenclaturas convencionais, sem abreviaturas no título. Os manuscritos devem ser editados usando o programa Microsoft Word para Windows em papel tamanho A4 (21 cm x 29,7cm), espaço duplo usando fonte Times New Roman, tamanho 12, com uma margem de 2,5 cm no lado esquerdo e direito, e na parte superior e margens mais baixas, cabeçalho e nota de rodapé. O manuscrito não deve exceder no máximo 25 páginas e uma carta deve ser enviada ao Editor solicitando sua publicação.
- Todos os autores devem assinar a carta de submissão, contendo o nome completo do autor sem abreviações, grau de título e endereço de trabalho (rua, número, código postal, cidade, estado, país e email). No envio, este documento deve ser anexado no campo “Carta de Apresentação”. Qualquer outra inserção, exclusão ou alteração na ordem dos autores deve ser informada por um documento assinado por todos os autores (incluindo o autor excluído, se for o caso).
6. Cada manuscrito deve ser organizado no seguinte formato:
 - a) TÍTULO (letras maiúsculas) suficientemente claro; conspícuo e completo, sem abreviações e palavras supérfluas, escrito em inglês e português. Recomenda-se começar com o termo que representa o aspecto mais importante, com outros termos em diminuição de importância;
 - b) Nome (s) completo (s) do (s) autor (es) (sem abreviaturas) no lado direito com um nome abaixo do primeiro. O manuscrito deve ter no máximo 6 (seis) autores;
 - c) ABSTRACT deve ser escrito continuamente em um parágrafo e não deve exceder 250 palavras. Pelo menos, deve conter uma breve introdução, objetivo (s) e principais resultados,
 - d) ÍNDICE TERMOS com 3 a 5 palavras-chave que expressem o conteúdo do trabalho e sejam diferentes daquelas utilizadas no título e separadas por vírgula;
 - e) RESUMO (resumo traduzido para o português);
 - f) TERMOS PARA INDEXAÇÃO (termos indexados traduzidos para o português);
 - g) INTRODUÇÃO (incluindo revisão de literatura e objetivos);

h) MATERIAL E MÉTODOS;

i) RESULTADOS E DISCUSSÃO (pode incluir tabelas e figuras);

j) CONCLUSÃO (S);

k) RECONHECIMENTO (S) (opcional) com estilo escrito sério e claro, indicando o (s) motivo (s) do(s) reconhecimento (s);

l) REFERÊNCIAS (sem citações de teses, dissertações e / ou resumos).

7. NOTA LEGAL: Deve conter título de título (MS, PhD, Dr, etc), instituição de trabalho com endereço completo (rua, número, CEP, caixa postal, cidade, estado, país) e e-mail do correspondente. autor.

8. TABELAS: Devem conter um título claro e conciso, sendo explicativo. Tabelas não devem conter linhas verticais. As linhas horizontais devem separar o título dos dados apresentados e na parte inferior da tabela. Tabelas devem ser feitas no Microsoft Word (tabela - tabela de inserção), com cada valor inserido em uma única célula, localizada centralmente.

9. FOTOGRAFIAS, GRÁFICOS, FIGURAS, SÍMBOLOS OU FÓRMULAS CONTIDAS NO PAPEL DEVEM SEGUIR AS REGRAS ABAIXO:

As figuras listadas acima devem ser inseridas após sua citação no texto e também enviadas em arquivos separados anexados ao campo ARQUIVOS DE MANUSCRITOS.

9.1. As fotografias podem ser coloridas ou em preto e branco, claras e com contraste, inseridas no texto após sua citação e também em um arquivo separado, salvo na extensão “TIFF” ou “JPEG” com resolução de 300 dpi. As cópias de imprensa só publicam fotografias em preto e branco.

9.2. As figuras podem ser coloridas ou em preto e branco, claras e com contraste, inseridas no texto após a citação e também em um arquivo separado, salvo na extensão “TIFF” ou “JPEG” com resolução de 300 dpi. Eles devem ser descritos usando fonte Times New Roman, tamanho 10, sem negrito, sem caixa de texto e organizados em ordem. As cópias de imprensa só publicam figuras em preto e branco.

9.3. Os gráficos devem ser inseridos no texto após a citação. Os gráficos devem ser descritos preferencialmente no Excel, utilizando fonte Times New Roman, tamanho 10, sem negrito, salvos em extensão XLS e transformados em arquivos TIFF ou JPG com resolução de 300 dpi.

9.4. Símbolos e Fórmula Química devem ser apresentados usando um processador de texto que permite edição para o Adobe InDesign CS6 (ex: MathType), mantendo seu layout original.

10. CITAÇÃO NO TEXTO PELO SISTEMA ALFABÉTICO (AUTOR DATA)

Dois autores: Davis e Jones (2014).

Três autores: Silva, Pazeto e Vieira (2013).

Mais de três autores: Ribeiro et al. (2014).

Nota: Quando dois autores da mesma obra são citados, devem ser separados por “e”, se não estiverem incluídos na sentença, devem ser separados por “;”. Outras citações no mesmo texto, devem apresentar os autores em ordem alfabética de seus sobrenomes, seguidos de data e separados por “;”: Araújo (2010); Nunes Junior (2011); Pereira (2012) e Souza (2013).

11. REFERÊNCIAS:

Todas as referências e suas citações corretas no texto são de responsabilidade do (s) autor (es).

Informação geral:

- O nome do periódico deve estar completamente escrito (sem abreviações) em negrito.

- Todas as referências devem listar o volume da revista, edição (entre parênteses), páginas inicial e final e ano de publicação.

- As referências devem ser colocadas em ordem alfabética, alinhadas à esquerda e simples espaçadas em uma referência e espaçadas duplas entre as referências.

EXEMPLOS (TIPOS MAIS COMUNS).

PAPEL DO JORNAL:

- até três autores:

PINHEIRO, A. C. M. ; NUNES, C. A. ; VIETORIS, V. Sensomaker: uma ferramenta para caracterização sensorial de produtos alimentares. *Ciência e Agrotecnologia*, 37 (3): 199-201, 2013.

-Mais de três autores:

MENEZES, M. de de et al. Abordagem de mapeamento digital de solos baseada em lógica fuzzy e conhecimento de especialistas em campo. *Ciência e Agrotecnologia*, 37 (4): 287-298, 2013.

LIVRO

a) livro completo: FERREIRA, D.F. Estatística multivariada. Lavras: Editora UFLA, 2008. 672p.

b) Capítulo de livro com autores específicos:

BERGEN, W.G. ; MERKEL, R.A. Acréscimo de proteínas. Em: PEARSON, A.M. ; DUTSON, T.R. Regulação do crescimento em animais de produção: avanços na pesquisa de carnes. Londres: Elsevier Science, 1991. v.7, p.169-202.

c) Capítulo do livro sem autores específicos:

JUNQUEIRA, L.C. ; CARNEIRO, J. Tecido muscular. Em: _____. Histologia básica. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

DISSERTAÇÃO E TESE:

Não deve ser citado.

RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS OU OUTROS EVENTOS:

Não deve ser citado.

DOCUMENTOS ELETRÔNICOS:

Os estudos publicados apenas online são referenciados de acordo com as regras específicas para cada tipo de documento, com a adição das informações de endereço eletrônico apresentadas em (<>) precedidas da expressão “Disponível em” e a data em que o documento foi acessado, precedido pela expressão : “Acessado em:”. Nota: Não é recomendado fazer referência a material eletrônico de curta duração na web. De acordo com os padrões internacionais, a divisão do endereço eletrônico no final da linha deve ser sempre após a barra (/).

a) LIVRO COMPLETO:

TAKAHASHI, T. (Coord.). Tecnologia em foco. Brasília, DF: Socinfo / MCT, 2000. Disponível em: <http // www.socinfo.org.br>. Acesso em: 22 de agosto de 2000.

b) PARTE DE UM LIVRO

TAKAHASHI, T. Mercado, trabalho e oportunidades. Em: _____. Sociedade do conhecimento no Brasil: livro verde. Brasília, DF: Socinfo / MCT, 2000. cap.2. Disponível em:

<http://www.socinfo.gov.br>. Acesso em: 22 de agosto de 2000.

c) PAPEL JORNAL (ACESSO ONLINE):

AVELAR, A.E.de; REZENDE, D.C.de. Hábitos alimentares fora do lar: um estudo de caso em Lavras MG. **Organizações Rurais & Agroindustriais**. 15(1):137-152, 2013. Available at:

<http://revista.dae.ufla.br/index.php/ora/article/view/652> Accessed on: August, 18, 2014.