

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

**Ocorrência e Diversidade Genética de Bactérias
Diazotróficas Endofíticas em Diferentes Variedades de
Arroz**

Marivaine da Silva Brasil

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM DIFERENTES
VARIEDADES DE ARROZ**

MARIVAINÉ DA SILVA BRASIL

Sob a Orientação do Pesquisador
Dr. José Ivo Baldani

e Co-orientação dos pesquisadores
Dr.^a Vera Lúcia Divan Baldani

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências em Fitotecnia.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2005

633.18

B823o

T

Brasil, Marivaine da Silva, 1975-
Ocorrência e diversidade
genética de bactérias diazotróficas
endofíticas em diferentes
variedades de arroz / Marivaine da
Silva Brasil. - 2005.
105f.

Orientador: José Ivo Baldani
Tese(doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Instituto de Agronomia.

Bibliografia: f. 80 - 105.

1. Arroz - Cultivo - Teses. 2.
Arroz - Doenças e pragas - Teses.
3. Nitrogênio - Fixação - Teses. 4.
Bactérias nitrificantes - Teses.
I. Baldani, José Ivo, 1953-. II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Instituto de Agronomia.
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

MARIVAINÉ DA SILVA BRASIL

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Fitotecnia, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências em Fitotecnia**.

TESE APROVADA EM 28/02/2005.

José Ivo Baldani. Dr. EMBRAPA Agrobiologia
(Orientador)

Jean Luis Simões de Araújo. Dr., EMBRAPA Agrobiologia

Vera Lúcia Divan Baldani. Dr.^a, EMBRAPA Agrobiologia

Fábio Bueno dos Reis Jr. Dr., EMBRAPA Cerrados

Silvia Regina Goi. Dr.^a, UFRRRJ

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos são muitos, principalmente na etapa final da tese.

Agradeço em especial aos meus pais por terem sempre me apoiado e incentivado em todas as etapas que percorri na minha história de vida.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudo para realização dos meus estudos de Doutorado.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao Departamento de Fitotecnia e a seus professores.

Ao meu orientador José Ivo Baldani pela confiança, apoio, incentivo para a realização do presente trabalho.

Aos meus co-orientadores Vera Lúcia Divan Baldani e Jean Luis Simões de Araújo, pela ajuda e sugestões durante a parte prática do trabalho, além de toda confiança depositada em minha pessoa.

À Embrapa Agrobiologia, todo apoio de estrutura, financeiro e pessoal para a realização do trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Gramíneas (Lúcio, Wilson) de Bioquímica (Vanderley “*In memorian*” e Taís) e em especial a Aline do laboratório de Genoma pelo esforço e pela rapidez no sequenciamento das amostras. “Aline, valeu mesmo!”

Aos amigos do laboratório de Gramíneas: Verônica, Salomão, Joilson, Daniele, Liamara, Marinete, Gabriela, Bianca e Weber por todas as discussões calorosas sobre bactérias fixadoras de nitrogênio o que contribuiu muito para o meu conhecimento sobre esses microrganismos. Agradeço em especial a Sandy pela ajuda e apoio na etapa final do trabalho. “Muito obrigada amiguinha!”

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica: André, Paulo, Eder, Luc, Patrícia, Galvão, Jordano e Helma. Nesse laboratório agradeço em especial á minha amiga Patrícia de todos os momentos, desde um natal numa bancada do laboratório até um carnaval na Marquês de Sapucaí. “Amiga garanto que muitos desfiles iremos assistir juntas, ta!”

Aos meus amigos do alojamento com os quais convivi e conheci e que me agüentaram durante 6 anos. Vamos lá espero não esquecer ninguém, vou começar pelos antigos: Ricardinho, André Baiano, Elvino, Lindete, Silvia, Simony, Marta, Fernanda, Valéria, Jorge, Gustavo, Conceição, Adriano, Lincoln, Fabão, Flavinha, Márcio, Enderson, Erineudo, Zé Roberto, Jerri, Adriano, Brasil, Sérgio, Maria Rita, Ana Paula, Shaolin, Roberta, Elias, Claudia, Caludinha, Carla, Marinete, Glória, Fabito e Diego. Agradeço a todos que fizeram parte e ainda fazem parte da minha história, pois considero todos meus amigos.

Valeu a Pena! Hehe! E agora eu “brindo a vida, meus amores, minha família!” (O Rappa).

BIOGRAFIA

Marivaine da Silva Brasil; nasceu na cidade de Corumbá, MS, em 12 de março de 1975. Em 1993 concluiu o 2º Grau na escola Cirandinha/CEAC – OBJETIVO. Licenciou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul no ano de 1999, quando ingressou no curso de Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, na linha de pesquisa de Microbiologia do Solo. Defendeu a dissertação intitulada “Ocorrência e Diversidade de Bactérias Diazotróficas Associadas a Gramíneas Forrageiras no Pantanal da Nhecolândia” em março de 2001, no mesmo ano ingressou no curso de Doutorado em Fitotecnia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo na presente data o seu trabalho de Tese de Doutorado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPITULO 1 - Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a diferentes variedades de arroz.....	3
Resumo	4
Abstrat.....	5
2. INTRODUÇÃO	6
2.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1.1 A cultura do Arroz.....	7
2.1.2 Importância da fixação biológica de nitrogênio (FBN) para a cultura do arroz...	8
2.1.3 Bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de arroz.....	8
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.2.1 Experimento em Vasos.....	13
2.2.2 Contagem de bactérias dizotróficas no solo	13
2.2.3 Desinfestação superficial da parte aérea das plantas	14
2.2.4 Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de diferentes variedades de arroz	14
2.2.5 Caracterização genotípica dos Isolados Bacterianos	15
2.2.6 Amplificação da região do gene <i>nifH</i> da nitrogenase.....	19
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
2.3.1 Contagem de bactérias diazotróficas no solo	20
2.3.2 Eficiência do processo de desinfestação da parte aérea da planta.....	20
2.3.3 Isolamento e caracterização fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas...	22
2.3.4 Caracterização genotípica de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de plantas de arroz.....	24
2.3.5 Análise polifásica dos isolados Bacterianos.....	43
3. CONCLUSÕES.....	47
Capítulo 2- AJUSTE da técnica de PCR com “primers” que flanqueiam a região dos genes <i>nif</i> HD PARA A DETECÇÃO DE bactérias diazotróficas em plantas de arroz.....	48
Resumo	49
Abstract	50
4. INTRODUÇÃO	51
4.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	52
4.1.1 O processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN)	52
4.1.2 A enzima nitrogenase	53
4.1.3 Genes codificadores e reguladores da nitrogenase	55
4.1.4 O uso de genes <i>nif</i> para a análise de diversidade de bactérias diazotróficas	56
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	58

4.2.1	Desenho de “primers” que flanqueiam as regiões do nifH-D, D e D-K.....	58
4.2.2	Extração de DNA total das estirpes tipo de bactérias diazotróficas.....	61
4.2.3	Extração de DNA de tecidos de plantas de arroz.....	62
4.2.4	Otimização da reação de PCR para os pares de “primers” nifH/D2, D1/D2 e D1/nifK.....	62
4.2.5	Clonagem do produto de amplificação por PCR com o par de “primers” nifH/D2 a partir de amostras de DNA extraídas de plantas de arroz.....	63
4.2.6	Protocolo de extração de DNA plasmidial.....	65
4.2.7	Amplificação do DNA plasmidial utilizando o par de “primers” T7/SP6.....	66
4.2.8	Sequenciamento do produto de amplificação por PCR com os “primers” nifH/D2 das estirpes tipo diazotróficas e dos clones selecionados.....	67
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.3.1	Otimização da reação de PCR utilizando os pares de “primers” nifH/D2, D1/D2 e D1/nifK.....	68
4.3.2	Sequenciamento da região flanqueada pelos “primers” nifH/D1 a partir do produto de PCR das estirpes de referência de bactérias diazotróficas.....	72
4.3.3	Clonagem do produto de PCR flanqueados pelos pares de “primers” nifH/D1 obtidos a partir de amostras de DNA extraídas do colmo de plantas de arroz... ..	73
4.3.4	Sequenciamento dos clones obtidos.....	75
5.	CONCLUSÕES	78
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Região de alinhamento dos “primers” espécie-específicos desenhados para <i>Burkholderia kururuensis</i> e <i>B. tropica</i> e outras espécies de bactérias.....	16
Tabela 2 – “Primers” utilizados para amplificação e sequenciamento do gene 16S DNAr dos isolados bacterianos.....	19
Tabela 3 - Nº de bactérias diazotróficas estimado pelo método do número mais provável (NMP) no solo antes do plantio, obtidos nos meios semi-sólidos NFb, LGI, JNFb e JMV.....	20
Tabela 4 - Eficiência dos métodos de desinfestação do colmo e das folhas de três cultivares de arroz, sobre a população nativa de bactérias diazotróficas, cultivadas em meios JNFb e JMV.....	21
Tabela 5 - Origem dos isolados bacterianos caracterizados fenotipicamente como <i>Herbaspirillum</i> spp. e das estirpes tipo utilizadas como referência para a caracterização morfológica e molecular.....	25
Tabela 6 - Caracterização molecular dos isolados bacterianos através da utilização do par de “primers” 1440/HS, específico para <i>H. seropedicae</i>	26
Tabela 7 - Origem dos isolados bacterianos caracterizados fenotipicamente como <i>Burkholderia</i> spp. e das estirpes tipo utilizadas como padrão de referência para a caracterização morfológica e molecular.....	27
Tabela 8 - Caracterização molecular dos isolados bacterianos identificados fenotipicamente como <i>Burkholderia</i> spp. *, através da técnica de PCR e uso do par de “primers”, BKTF/BKR específicos para <i>B. kururiensis</i>	29
Tabela 9 -Perfil de restrição da região 16S DNAr dos isolados bacterianos caracterizados como <i>Herbaspirillum</i> spp., após a digestão com as enzimas <i>MspI</i> e <i>AluI</i> e tipos de agrupamento gerados pela técnica de ARDRA.....	31
Tabela 10 - Perfil de restrição do produto de amplificação da região 16S DNAr dos isolados bacterianos caracterizados como <i>Burkholderia</i> spp., após a digestão com as enzimas <i>AluI</i> e <i>Hinfi</i> e os tipos de agrupamento gerados pela técnica de ARDRA.....	34
Tabela 11 – Taxonomia polifásica dos isolados bacterianos originados das cultivares IR 42, IAC 4440 e CNA7553 e caracterizados fenotipicamente como pertencentes gênero <i>Herbaspirillum</i>	44
Tabela 12 – Taxonomia polifásica dos isolados bacterianos originados das cultivares IR 42, IAC 4440 e CNA7553 e caracterizados fenotipicamente como pertencentes gênero <i>Burkholderia</i>	45
Tabela 13 - Otimização das condições da PCR utilizando os “primers” nifH/D2.	68
Tabela 14 - Otimização das das condições da PCR utilizando os “primers” D1/D2. ...	69
Tabela 15 - Otimização das das condições da PCR utilizando os “primers” D2/nifK..	70
Tabela 16 – Condições finais de otimização da reação de PCR com a utilização de diferentes pares de “primers” desenhados a partir do operon <i>nifHDK</i>	70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Desenho esquemático das técnicas utilizadas para a análise de taxonomia polifásica. Adaptado de Vandamme et al (1996). 12
- Figura 2** – Número de isolados bacterianos caracterizados morfológicamente como pertencentes a *Azospirillum* spp., *Burkholderia* spp. *Herbaspirillum* spp. e *Sphingomonas* spp. originados dos cultivares CNA 7553, IR 42 e IAC 4440 de arroz. 22
- Figura 3** - Número de isolados bacterianos originados da raiz, colmo e folhas dos cultivares de arroz CNA 7553, IR 42 e IAC 4440. 24
- Figura 4** - Perfil eletroforético do produto de amplificação da região flanqueada pelos “primers” específicos 1440/HS. 26
- Figura 5** - Perfil eletroforético do produto de amplificação da região flanqueada pelos “primers” específicos para *B. kururiensis* (A) e *B. tropica* (B) de diversas estirpes tipo e isolados de plantas de arroz. 28
- Figura 6** – Perfis de restrição dos fragmentos amplificado da região 16S DNAr das estirpes tipo Z67 (*H. seropedicae*), M4 (*H. rubrisubalbicans*), 84b (*H. frisingense*) e dos isolados bacterianos caracterizados como *Herbaspirillum*. *MspI* (A) e *AluI* (B). 30
- Figura 7** - Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtidos através da técnica de ARDRA de 55 isolados bacterianos caracterizados como pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* obtidos de três cultivares de arroz (CNA 7553, IR 42 e IAC 4440) e três estirpes de referência (Z67, M4 e 84b). Nível de similaridade aproximado de 22%. 32
- Figura 8** – Perfis de restrição dos fragmentos amplificados da região 16S DNAr das estirpes M130 (*B. brasiliensis*), Kp23 (*B. kururiensis*), Ppe8 (*B. tropica*) TVV75 (*B. vietnamiensis*) e dos isolados bacterianos caracterizados como *Burkholderia* spp. *AluI* (A), *HinfI* (B) e *RsaI* (C). 35
- Figura 9** - Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtidos através da técnica de ARDRA de 50 isolados bacterianos caracterizados como pertencentes ao gênero *Burkholderia* e obtidos de três cultivares de arroz (CNA 7553, IR 42 e IAC 4440) e quatro estirpes tipo (M130, KP23, Ppe8 e TVV75). Nível de similaridade aproximado de 27%. 36
- Figura 10** - Árvore filogenética pressuposta para as seqüências 16S DNAr de 11 isolados bacterianos obtidos neste estudo e microrganismos representativos das subclasses alfa e beta Proteobacteria e bactérias Gram-Positivas disponíveis no GenBank (número de acesso entre parênteses). A árvore foi construída pelo método de agrupamentos vizinhos (“neiborjoin”). A análise de bootstrap foi feita com 100 repetições. 39
- Figura 11** – Perfil eletroforético do produto de amplificação da região flanqueada pelos primers nifHF e nifHR para os isolados bacterianos identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus* através da análise filogenética do gene 16S DNAr. 40
- Figura 12** - Árvore filogenética pressuposta para as seqüências 16S DNAr de 9 isolados bacterianos obtidos neste estudo e microrganismos representativos das subclasses alfa e beta Proteobacteria disponíveis no GenBank (número de acesso entre parênteses). A árvore foi construída pelo método de “neiboirjoin” (agrupamentos vizinhos). A análise de bootstrap foi feita com 100 repetições. 41

Figura 13 – Resultado da análise utilizando por BLASTn comparando a seqüência flanqueada pelos “primers 1440/HS da estirpe tipo de <i>H. seropedicae</i> e isolados bacterianos identificados como pertencentes a essa espécie.....	42
Figura 14 - Alinhamento da seqüência flanqueada pelos “primers” 1440/HS mostrando a região de 267 pb a 350 pb. Seqüência de 37 isolados bacterianos identificados como <i>H. seropedicae</i> e a estirpe de referência da espécie Z67. O Alinhamento foi feito por Clustal_W 1,8 software e editados no programa GeneDoc.	43
Figura 15 – Visão geral dos cinco principais grupos filogenéticos de bactérias fixadoras de nitrogênio baseado nas seqüências dos genes estruturais da enzima nitrogenase conforme descrito por RAYMOND et al. (2004).	53
Figura 16 – Enzima e cofatores do complexo da nitrogenase (LEHNINGER, 2002). .	54
Figura 17 – Desenho esquemático do arranjo dos genes estruturais da enzima nitrogenase (<i>nif</i> HDK) e seus principais reguladores (<i>nif</i> A, <i>nif</i> B, <i>nif</i> ENX).....	55
Figura 18 – Alinhamento de diferentes seqüências da região do gene <i>nif</i> D de diversas bactérias diazotróficas e escolha da região para o desenho dos pares de “primers”:	59
Figura 19 – Alinhamento de diferentes seqüências da região dos genes <i>nif</i> H e <i>nif</i> K de diversas bactérias diazotróficas e escolha da região para o desenho dos pares de “primers”:	60
Figura 20 – Representação esquemática dos três genes <i>nif</i> HDK indicando os sítios flanqueados pelos quatro pares de “primers” <i>nif</i> H, D1, D2, e <i>nif</i> K usado no estudo e o tamanho estimado do produto de amplificação pela técnica de PCR.	61
Figura 21 – Vetor utilizado para a clonagem do produto amplificação gerado pelos “primers” <i>nif</i> H/D2 (Figura obtida do site www.promega.com).....	65
Figura 22 – Perfil de amplificação da região flanqueada pelos primers <i>nif</i> H/D2 do DNA extraído de culturas puras das estirpes tipo de bactérias diazotróficas....	71
Figura 23 – Perfil de amplificação da região flanqueada pelos primers <i>nif</i> H/D2 do DNA extraído de colmos e raízes de plantas de arroz.....	72
Figura 24 - Produto de PCR flanqueado pelos pares de “primers” <i>nif</i> H/D1 a partir do DNA de 7 estirpes de referência de bactérias diazotróficas, submetidas ao processo direto de sequenciamento utilizando os “primers degenerados <i>nif</i> H/D1.....	73
Figura 25 – Perfil de amplificação da reação de PCR com os pares de “primers” T7/SP6 de 34 clones obtidos da clonagem do produto de PCR com os primers <i>nif</i> H/D1 do DNA extraído do colmo da cultivar IR 42. As setas brancas indicam o produto de PCR. O Padrão de peso molecular utilizado foi o 1 Kb ladder plus (Invitrogen).....	74
Figura 26 – Perfil de amplificação dos produtos de PCR com primers T7/SP6 com novos DNA plasmídias extraídos dos clones obtidos da clonagem do produto de PCR com os primers <i>nif</i> H/D1 do DNA extraído do colmo da cultivar IR 42. As setas brancas indicam o produto de amplificação. O padrão de peso molecular utilizado foi o 1Kb ladder (Promega).....	74
Figura 27 - Perfil de amplificação dos produtos de PCR com primers T7/SP6 com DNA plasmídias extraídos dos clones obtidos da clonagem do produto de PCR com os primers <i>nif</i> H/D1 do DNA extraído do colmo da cultivar IAC 4440. O padrão de peso molecular utilizado foi o 1Kb ladder (Promega).....	75
Figura 28 – Comparação por BLASTn da seqüência de 3 possíveis clones obtidos da variedade IAC 4440.	76

LISTA DE ABREVIACOES

PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
ATP	Adenosina trifosfato
DNAr	DNA ribossomal
RNAr	RNA ribossomal
<i>nif</i>	Gene que codifica a nitrogenase
<i>nifH</i>	Gene que codifica para Fe-proteína ou componente II da nitrogenase.
<i>nifHDK</i>	Gene que codifica para Fe-proteína ou componente II assim como para subunidade $\alpha_2\beta_2$ da MoFe-proteína ou componente I da nitrogenase.
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfatados
TAE	Tris Acetato EDTA
TE	Tampão de Tris EDTA
ARDRA	Amplified rDNA restriction analysis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
“hairpin”	Formação de grampo por auto-pareamento
“primers”	Oligonucleotídeos, chamados iniciadores, utilizados na reação de PCR
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio

RESUMO

BRASIL, Marivaine da Silva. **Ocorrência e Diversidade Genética de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Variedades de Arroz RJ**. Seropédica: UFRRJ, 2005. 105 pp. (Tese de Doutorado em Fitotecnia).

Em áreas de clima tropical, o nitrogênio é um dos principais nutrientes limitantes para o crescimento e produtividade da cultura de arroz, devido a baixa quantidade encontrada desse elemento nos solos. O pouco nitrogênio disponível para a cultura pode ser proveniente da mineralização do nitrogênio do solo presente na matéria orgânica, da fixação biológica realizada por bactérias diazotróficas tais como aquelas *Azotobacter*, *Klebsiela*, *Azospirillum*, *Serratia*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, bem como através da adubação química com fertilizantes nitrogenados. É possível que diferentes variedades de arroz possam exercer um efeito seletivo sobre as populações desses microrganismos. Esse estudo foi realizado com o objetivo de isolar, caracterizar e estudar a diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a três variedades de arroz (IR42, IAC 4440 e CNA 7553) cultivadas em vasos com solo sob condições de alagamento. O trabalho foi dividido em dois capítulos sendo que o primeiro refere-se ao isolamento e caracterização de isolados bacterianos obtidos de amostras de diferentes partes de plantas de arroz visando identificar novas estirpes que possam ser utilizadas em futuros experimentos de inoculação. O segundo capítulo refere-se ao desenho de “primers” para a amplificação da região que flanqueia os genes *nifH-D* e a otimização da reação de PCR para a detecção de bactérias fixadoras de nitrogênio, em amostras de DNA extraídas de plantas de arroz, sem a necessidade de isolamento da bactéria em meio de cultivo. Foram instalados dois experimentos e as plantas foram coletadas durante a fase vegetativa, florescimento, enchimento e maturação dos grãos. Amostras de raízes, colmos e folhas foram separadas para o isolamento de bactérias diazotróficas em meios de cultivo específicos assim como para a detecção dessas bactérias a partir do DNA extraído dos tecidos da planta. De maneira geral, foi observada uma diversidade de espécies diazotróficas entre os isolados obtidos para as três cultivares de arroz analisado. Além do isolamento de *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia kururiensis* foi observado a ocorrência de *Azospirillum amazonense* e outras espécies que não constam na literatura como pertencentes ao grupo das bactérias fixadoras de nitrogênio em arroz. Os novos “primers” desenhados para a região dos genes *nifH-D* possibilitaram a detecção de bactérias diazotróficas a partir da análise de DNA extraído do colmo de plantas de arroz, embora a metodologia necessite ainda de pequenos ajustes para que possa ser utilizado para ampliar o conhecimento sobre a diversidade das bactérias endofíticas presentes nas cultivares de arroz.

Palavras-Chave: 16S DNAr, genes *nifHDK*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, sequenciamento

ABSTRACT

Brasil, Marivaine da Silva. **Occurrence and genetic diversity of endophytic diazotrophic bacteria associated with rice varieties RJ**. Seropédica: UFRRJ, 2005. 105 pp. (Thesis of Doctorate in crop Science).

In areas of tropical climate the nitrogen is one of the most limiting nutrient to the plant growth and productivity of rice crop due to its low amount present in the soils. The nitrogen available can be derived from the N mineralization and biological nitrogen fixation carried out by diazotrophic bacteria such as *Azotobacter*, *Klebsiela*, *Azospirillum*, *Serratia*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum* and *Burkholderia*. It is possible that different rice varieties can exert a selective effect on the population of these bacteria. The aims of this study were to isolate, characterize and verify the genetic diversity of endophytic diazotrophic bacteria associated with three rice varieties (IR42, IAC4440 and CNA 7553) cultivated in pots with soil and maintained under flooding conditions. The work was divided in two chapters, the first ones dealing with the isolation and characterization of bacterial isolates obtained from different plant tissues of rice plants envisaging future use of them in inoculation experiments. The second chapter refers to the design of new pairs of primers flanking the *nifH-D* region (~1400 bp) as well as to optimize the PCR reaction aiming to detect nitrogen-fixing bacteria in DNA extracted from rice plant tissues with no requirement of bacterial isolation. Two experiments were carried out with the rice varieties grown in pots and sampled at the vegetative, flowering, ripening and grain filling stages. Samples of roots, stems and leaves were used to isolate the bacteria in nitrogen-free semi-solid media and also detect these diazotrophic bacteria in DNA extracted from the same plant tissues. In general, it was observed a genetic diversity among the diazotrophic species obtained from the three rice varieties. Besides the isolation of *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia kururiensis*, it was also observed the occurrence of *Azospirillum amazonense* and other species so far not known as nitrogen-fixing bacteria in rice. The new primers designed to amplify the region of the *nifH-D* genes by PCR allowed the detection of nitrogen-fixing bacteria in DNA samples extracted from stems of the rice varieties. However, the methodology requires small improvement so that the diversity of endophytic diazotrophic bacteria colonizing these rice varieties could be better understood.

Keywords: 16S DNAr, genes *nifHDK*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, sequencing

1. INTRODUÇÃO GERAL

O arroz é o cereal que serve de alimento para mais da metade da população mundial (CHOUDHURY & KENNEDY, 2004). O censo realizado pelo IRRI (INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE) em 2002 mostra que a área mundial plantada com arroz é de 147,14 milhões de hectares e a produção é de 576,28 milhões de mega gramas. No Brasil o arroz é um alimento indispensável, sendo que sua plantação pode ser para consumo próprio, para produção em larga escala ou para ser utilizado como cultura de rotação.

Nos países da região tropical, o nitrogênio é o principal nutriente limitante da cultura do arroz, interferindo no seu crescimento e na produtividade. Nessas regiões, grande parte dos compostos nitrogenados disponíveis para a cultura é proveniente da mineralização do nitrogênio do solo presente na matéria orgânica e da fixação biológica dos microrganismos de vida livre como *Azotobacter*, *Klebsiela* e aqueles que se associam com a planta como as dos gêneros *Azospirillum*, *Serratia*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* (KUNDUN & LADHA, 1995). Nesses países a maior parte do cultivo do arroz é feita sob condições de alagamento e dessa forma favorece o crescimento e a fixação de nitrogênio por algas do tipo *Anabaena*, que se associam simbioticamente com a pteridófita *Azolla* e microrganismos fotossintéticos como as cianobactérias.

Em 1929 SEN descobriu que plantas de arroz podem se beneficiar da associação com bactérias diazotróficas que colonizam a sua rizosfera, através do isolamento de *Azotobacter* spp. das raízes desse cereal. Desde então, diversos microrganismos fixadores de nitrogênio foram isolados da rizosfera de plantas de arroz cultivadas em condições de sequeiro e irrigado (BALDANI, 1996), como as espécies de *Azospirillum* (BALDANI & DÖBEREINER, 1980), *Klebsiela* (LADHA et al., 1983), *Alcaligenes* (YOU & ZHOU, 1989). Entretanto, a descoberta de bactérias denominadas endofíticas, que colonizam o interior das raízes e colmos de plantas, sugerem que estes microrganismos podem fornecer o nitrogênio fixado diretamente ao seu hospedeiro (BODDEY et al., 1995; REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998). Em razão desta descoberta, muitos estudos têm sido realizados buscando isolar microrganismos endofíticos em plantas de arroz. Sabe-se hoje que o tecido deo arroz é colonizado por diversos microrganismos endofíticos como, por exemplo, o *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986) *Azoarcus* spp. (REINHOLD et al., 1986), *Burkholderia* spp. (BALDANI, 1996), *Serratia marcescens* (GYANESHWAR et al., 2001).

Os microrganismos diazotróficos endofíticos apresentam vantagens quando comparados com os de vida livre e associativo, pois não precisam competir por exsudatos das raízes e o nitrogênio fixado pode ser diretamente assimilado pelas plantas evitando perdas (BALDANI et al., 1997) Em vista destas vantagens, há um esforço intensivo por parte dos pesquisadores da área em demonstrar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) por esses microrganismos.

É possível que diferentes variedades de arroz possam exercer um efeito seletivo sobre as populações de microrganismos. Há poucos registros de avaliação da biodiversidade em relação às variedades de arroz a e microbiota fixadora de N₂ associada a ela (RODRIGUES, 2003; STOLTZFUS et al., 1997). Dessa maneira essa tese foi dividida em dois capítulos, sendo que no primeiro foi avaliada a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de diferentes variedades arroz. O segundo

refere-se ao ajuste da técnica de PCR utilizando “primers” que flanqueiam as regiões do gene *nifHD* para a detecção de bactérias diazotróficas em plantas de arroz.

Desta forma este estudo teve como objetivo geral:

- Avaliar a ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em três variedades de arroz

A hipótese formulada foi:

A diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de arroz está relacionada com as variações na contribuição da FBN observadas nas diferentes variedades de arroz. A detecção de novas estirpes contribuirá para maximizar a fixação biológica de nitrogênio em arroz.

**CAPITULO 1 - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A DIFERENTES
VARIEDADES DE ARROZ**

RESUMO

Brasil, Marivaine da Silva. **Ocorrência e Diversidade Genética de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Variedades de Arroz RJ**. Seropédica: UFRRJ, 2005. 105 pp. (Tese de Doutorado em Fitotecnia).

Com o objetivo de estudar a ocorrência e caracterizar fenotipicamente e genotipicamente as bactérias diazotróficas endofíticas associadas a três variedades de arroz (IR42, IAC4440 e CNA7552) foram implantados dois experimentos em vasos (4 kg solo/vaso) e crescidas sob condições de alagamento. Foram realizadas 4 coletas (fase vegetativa, floração, enchimento de grão e maturação). Amostras de raízes, colmos e folhas foram separadas, desinfestadas superficialmente e inoculadas em meios de cultivos específicos para o isolamento de bactérias diazotróficas. Após a verificação do crescimento (formação de película característica) em meio de cultivo, esses isolados bacterianos foram caracterizados fenotipicamente. Um total de 168 bactérias foram obtidas, as quais foram distribuídas em 4 grupos: 55 isolados pertencentes ao gênero *Herbaspirillum*, 50 ao gênero *Burkholderia*, 56 ao gênero *Azospirillum* e 7 pertencentes ao gênero *Sphingomonas*. Os maiores números de isolados foram obtidos da cultivar de arroz IR42 (61), seguido da IAC 4440 (55) e CNA 7553 (47) e a parte da planta com maior número de isolados foi a raiz em todas as cultivares analisadas. As bactérias identificadas morfológicamente como pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* foram caracterizadas genotipicamente através do uso de técnicas moleculares como o uso de “primers” espécie-específicos, análise de restrição dos produtos de amplificação da região 16S DNAr (ARDRA) e sequenciamento do gene ribossomal 16S. A utilização dos “primers” específicos para *Herbaspirillum seropedicae* permitiu a identificação de 40 isolados bacterianos como pertencentes a essa espécie. Para os isolados bacterianos caracterizados como *Burkholderia*, através do uso de “primers” espécie-específicos para *B. kururiensis* e *B. tropica*, puderam ser identificados 42 isolados bacterianos como pertencentes a espécie *B. kururiensis*. A análise dos perfis polimórficos gerados pela técnica de ARDRA confirmou os resultados gerados pela utilização de “primers” específicos para *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia kururiensis*. Não foi observada influência dos cultivares de arroz no agrupamento dos isolados bacterianos nos dois grupos de bactérias analisadas (*Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp). O sequenciamento do gene 16S DNAr de isolados bacterianos representantes de todos os subgrupos formados na análise de ARDRA permitiu verificar que os isolados bacterianos foram distribuídos nos ramos de bactérias Gram positivas e negativas dentro das subclasses alfa, beta e gama proteobactérias.

Palavras – Chave: 16S DNAr, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, sequenciamento.

ABSTRAT

BRASIL, Marivaine da Silva. **Occurrence and genetic diversity of endophytic diazotrophic bacteria associated with rice varieties RJ Seropédica**: UFRRJ, 2005. 105 pp. (Thesis of Doctorate in Crop Science).

The objective of this study was to evaluate the occurrence and the phenotypic and genotypic characterization of endophytic diazotrophic bacteria associated with rice varieties. Two experiments were implanted in pots (4 kg soil/pot) and plants were grown under wetland conditions. Four harvests were accomplished (vegetative phase, flowering, grain filling and maturation). Samples of roots, stems and leaves were separated, superficially disinfected and inoculated in culture medium for isolation of the diazotrophic bacteria. After positive growth (pellicle formation), the isolates were phenotypically characterized. A total of 168 bacteria were obtained and distributed within 4 groups: 55 isolated belonging to the genus *Herbaspirillum*, 50 to the genus *Burkholderia*, 56 to the genus *Azospirillum* and 7 to the genus *Sphingomonas*. The larger numbers of isolates were obtained from the rice variety IR42 (61), followed by IAC 4440 (55) and CNA 7553 (47). The part of the plant with larger number of isolates was the roots. The bacteria characterized as belonging to the genus *Herbaspirillum* and *Burkholderia* were also characterized through the use of molecular techniques such as the use of species-specific primers, restriction analysis of the region 16S amplified DNAr (ARDRA) and sequencing of the 16S ribosomal gene. The use of the specific primers allowed identifying 40 isolated as belonging to *Herbaspirillum seropedicae*. For the isolated characterized as *Burkholderia*, with the use of species-specific primers for *B. kururiensis* and *B. tropica*, 42 isolates were identified as *B. kururiensis*. The analysis of ARDRA confirmed the data with utilization of primers species-specifics for *H. seropedicae* and *B. kururiensis*. It was not observed an influence of the rice variety in the grouping of the *Herbaspirillum* spp. and *Burkholderia* spp isolates. A sequencing of the gene 16S DNAr of isolates representatives of all subgrupos formed by the ARDRA analysis and showed that they were distributed in the branches of bacteria Gram positive and negative within the alpha, beta and gamma proteobacteria.

Keywords: 16S DNAr, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, sequencing

2. INTRODUÇÃO

Um dos principais nutrientes necessários para nutrição e crescimento da planta de arroz é o nitrogênio. O principal tipo de adubo nitrogenado usado nas lavouras de arroz é a uréia, porém a eficiência de utilização dessa forma de nitrogênio é muito baixa, em consequência da ocorrência da desnitrificação, volatilização e lixiviação de amônia, que resultam, além do baixo índice de utilização, a poluição atmosférica, e toxidez nos lençóis de água.

Uma das alternativas para o uso de N que pode minimizar esses problemas seria Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) feita por bactérias diazotróficas, que se associam às plantas de arroz. O isolamento dessas bactérias por métodos de desinfestação superficial indicam que a maioria dessas bactérias coloniza o interior dos tecidos e são denominadas diazotróficas endofíticas e entre as mais encontradas e isoladas estão as dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. Baseando nessas informações esse primeiro capítulo relata o isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a diferentes variedades de arroz, procurando classificar e identificar os isolados através da taxonomia polifásica.

Neste sentido o objetivo deste capítulo foi estudar a ocorrência e caracterizar fenotipicamente e genoticamente as bactérias diazotróficas endofíticas associadas a diferentes variedades de arroz.

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 A cultura do Arroz

O arroz é um dos mais antigos alimentos produzidos pelo homem, e diversos historiadores e cientistas apontam o sudeste da Ásia como o local de origem desta cultura. Duas formas silvestres são precursoras do arroz cultivado: a espécie *Oryza rufipogon*, procedente da Ásia, originando a *O. sativa*; e a *Oryza barthii* (= *Oryza breviligulata*), derivada da África Ocidental, dando origem à *O. glaberima* (EMBRAPA-CNPAF, 2004). É o segundo cereal mais produzido mundialmente e o terceiro mais consumido (FAO, 2003). A China destaca-se como o principal produtor mundial de arroz representando 30,6% da produção, sendo que os maiores produtores mundiais são também os maiores consumidores (FAO, 2003).

O comércio mundial do arroz ainda é bastante reduzido sendo a produção na maioria dos países, destinada ao consumo interno. É o alimento mais consumido pela população brasileira, (IBGE, 2003). O setor orizícola responde por 6% do valor bruto da produção agrícola, perdendo para a cultura da soja, milho e cana-de-açúcar (IBGE, 2003). Segundo a FAO (2003), o Brasil é o décimo maior produtor mundial de arroz fora do continente asiático e sua produção está concentrada nas regiões: Centro-Oeste, Sudeste e Sul, sendo que esta última representa cerca de 50% da produção nacional (CONAB, 2003). Segundo dados registrados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento a produtividade média do arroz está estimada em 3,2 Mg/ha para o ano de 2004 (MAPA, 2004). Os estados mais produtivos, considerando-se a área plantada superior a 10 mil hectares, são: Santa Catarina (7,230 Mg/ha), Rio Grande do Sul (4,880 Mg/ha) e Mato Grosso do Sul (2,795 Mg/ha) (MAPA, 2004). Os sistemas de cultivo adotados nessas regiões variam de acordo com o clima e solo, sendo o mesmo cultivado em dois ecossistemas, várzeas e terras altas. O método de plantio mais utilizado é o arroz irrigado e o arroz de sequeiro.

O ecossistema de várzeas representa cerca de 40% da área total da cultura e contribui com 60% da produção estimada em aproximadamente 10 milhões de megagramas na safra 2003/2004 (CONAB, 2004). Nesse ecossistema predomina o sistema de cultivo com irrigação controlada, que ocupa cerca de um milhão de hectares na região subtropical (RS/SC), onde a cultura é manejada sob alto nível tecnológico e apresenta rendimento médio ao redor de 5,5 Mg/ha. O ecossistema de terras altas desempenhou um papel de grande relevância na produção de arroz sob o sistema de cultivo de sequeiro, nas décadas de 60 a 80. Em decorrência ao alto risco da exploração e da redução da área de fronteira agrícola, o sistema de sequeiro decresceu na década de 90 atingindo menos de dois milhões de hectares na safra de 98/99. Atualmente o arroz de terras altas migrou para as regiões de adequada distribuição pluviométrica em especial o Centro-Norte do MT apresentando uma produção de dois milhões de megagrama/ha (CONAB, 2004). Essa estratégia renovou o interesse da cultura e possibilitou a adoção de tecnologias recomendadas pela pesquisa como, por exemplo, o cultivo mínimo (Embrapa-CNPAF, 2001).

Dentre as práticas usadas para o desenvolvimento da cultura de arroz, está a exploração da simbiose *Anabaena-Azolla*. A avaliação através da técnica de diluição isotópica de ¹⁵N, mostrou que de 60 a 75% do N acumulado eram derivados da simbiose

em sistema de produção de arroz com disponibilidade de água (KUMARASINGHE & ESKEW, 1993). Apesar do alto potencial, o uso de *Azolla* apresenta limitações relacionadas com o manejo, porque além da necessidade de mão-de-obra intensiva, o crescimento e o teor de nitrogênio da *Azolla* são influenciados pelos fatores ambientais, como vento e oscilações na superfície da água, além de ser sujeita ao ataque de várias pragas e ser sensível a alguns herbicidas (FIORE, 1987).

A Rotação de culturas com plantas leguminosas como por exemplo, *Desmodium*, *Calopogonium*, *Siratro*, *Stylosanthes* e *Sesbania*, tem sido também utilizada como uma possível estratégia para melhorar a de produção de arroz, via a introdução do N oriundo do processo de FBN das leguminosas (PAREK et al., 1990). Porém, a cultura de arroz pode também obter contribuição de N a partir de bactérias diazotróficas associativas que colonizam as plantas de arroz, uma vez que diversas bactérias diazotróficas como *Azotobacter*, *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum*, *Azoarcus* spp. e *Burkholderia* spp. já foram isoladas dessas plantas (BALDANI, 1996).

2.1.2 Importância da fixação biológica de nitrogênio (FBN) para a cultura do arroz

Um dos principais nutrientes necessários para nutrição e crescimento da planta de arroz é o nitrogênio. Entretanto, a maioria dos solos onde o arroz é cultivado é pobre em N e dessa maneira faz-se necessária a adubação nitrogenada para suprir a demanda de N por essa cultura (CHOUDLHURY & KENNEDY, 2004). O principal tipo de adubo nitrogenado usado nas lavouras de arroz é a uréia, porém a eficiência de assimilação dessa forma de nitrogênio é muito baixa, freqüentemente entre 30 e 40% (CHOUDLHURY et al., 2002). Ocorrendo perdas por desnitrificação, volatilização de amônia e por lixiviação (De DATTA & BURESH, 1989), que resultam na poluição atmosférica, através da emissão de gases tóxicos como o óxido nitroso (REEVES et al., 2000) e quando lixiviado, causa toxidez nos lençóis de água (SHERESTHA & LADHA, 1998). Um outro problema do uso da uréia como adubo é que esta pode esgotar a matéria orgânica do solo a longo prazo (CHOUDLHURY & KENNEDY, 2004).

Uma das alternativas para o uso de N que pode minimizar esses problemas seria Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) feita por bactérias diazotróficas, que parece estar intimamente relacionada com o genótipo da planta. Alguns estudos têm sido feitos para selecionar plantas com alta contribuição de N proveniente do processo biológico (REIS et al., 2000). BODDEY et al. (1995) estimaram a contribuição da FBN, através da técnica de diluição isotópica de N^{15} , em 15 diferentes variedades de arroz e encontram diferenças significativas em relação a capacidade de se beneficiar da FBN entre as variedades. Comparando os genótipos IR 42 e IAC 4440, CAMPO (1999) observou que não havia diferença no número de bactérias diazotróficas encontradas nos dois genótipos, porém o genótipo IR 42 apresentou maior contribuição da FBN. Contudo, RODRIGUES (2003), observou diferenças no número de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de arroz cultivadas em dois tipos de solos.

2.1.3 Bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de arroz

No final da década de 80, folhas e colmos de plantas de cana-de-açúcar foram usadas para isolar bactérias diazotróficas. Essa estratégia permitiu a descoberta de novas espécies de bactérias que colonizam o interior da planta sem causar sintomas de doença (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988). Entretanto, a introdução do termo

endofítico na área da FBN foi feita somente em 1992 por DÖBEREINER, para designar todos os microrganismos diazotróficos capazes de colonizar o interior das raízes de gramíneas. Nesse habitat, as bactérias se protegem das altas concentrações de oxigênio (inibitória para a atividade da enzima nitrogenase) e possivelmente tem carbono derivado das plantas mais prontamente disponível, sendo que a competição com outros microrganismos também é menor que no solo e rizosfera.

As bactérias diazotróficas endofíticas colonizam o córtex da raiz, penetram na endoderme e colonizam os vasos condutores, podendo ser translocadas para a parte aérea da planta. Essas bactérias penetram e infestam e colonizam o apoplasto, xilema, parênquima de xilemas lignificados, bem como células mortas e podem também colonizar o aerênquima como observado em arroz (JAMES et al., 1999).

A primeira bactéria diazotrófica caracterizada como endofítica foi o *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986), seguida de *Gluconacetobacter diazotrophicus* [reclassificação de *Acetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988)] (YAMADA et al., 1997, 1998). *Herbaspirillum seropedicae* foi isolado de raízes lavadas e desinfestadas de sorgo, milho e arroz (BALDANI et al., 1986) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar no Brasil (REIS et al., 1994).

A descoberta de bactérias diazotróficas endofíticas pode explicar as contribuições da fixação biológica de N₂ observadas para as culturas com as quais elas se associam (BALDANI et al., 1997). Alguns estudos mostram a ocorrência de várias bactérias diazotróficas em plantas de arroz cultivadas sob condições de inundação. O isolamento dessas bactérias após a desinfestação superficial dos tecidos indica que as mesmas podem ser consideradas endofíticas (BARRAQUIO, et al., 1997; STOLTZFUS, et al., 1997). Porém, esse aspecto é uma evidência insuficiente para atribuir o caráter endofítico a estas bactérias, sendo necessária à caracterização do endofitismo através do uso de microscopia eletrônica (JAMES, 2000; JAMES & OLIVARES, 1998; REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998). Por outro lado, os meios de culturas não refletem a real diversidade de bactérias que poderiam ser encontradas no ambiente, porque qualquer meio de cultura é em maior ou em menor grau, seletivos para um ou outro grupo de microrganismo e ainda, algumas estirpes poderiam estar em estado não cultivável no meio ambiente e ficariam excluídas da análise (ROSADO, 2000).

As bactérias diazotróficas endofíticas em arroz aparecem em números maiores nos colmos, indicando que a parte aérea do arroz fornece um nicho sustentável (BARRAQUIO et al., 1997). Entre as bactérias diazotróficas endofíticas mais encontradas e isoladas em plantas de arroz estão as do gênero *Azoarcus*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Serratia*.

O gênero *Azoarcus* foi originalmente descrito com duas espécies de bactérias diazotróficas *Azoarcus communis* e *Azoarcus indigenus* (REINHOLD-HUREK & HUREK, 1993) e apresentava também três grupos distintos que continham bactérias diazotróficas (Grupos: C, D com isolados de raízes de "kallar grass" e E com isolados de fungos). Porém através de estudos filogenéticos utilizando SDS-PAGE para a análise de proteínas extracelulares, análise genética por "fingerprints", características morfológicas e nutricionais, descobriu-se que todas as estirpes dentro dos grupos C, D e E, representavam grupos específicos e formavam três diferentes linhagens localizadas entre os grupos dos gêneros *Azoarcus/Thaurea/Rhodocyclus* e a similaridade com outros gêneros diferentes era bem grande (em torno de 94%) (HUREK et al., 1997). Estas características sugeriram a alocação desses grupos em três gêneros novos com uma

espécie cada, denominados: *Azovibrio restrictus*, *Azospira oryzae*, *Azonexus fungiphilus* (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2000).

No processo de colonização a *Azoarcus* spp. penetra próximo às pontas das raízes, na zona de enlagação e diferenciação, podendo entrar também na zona de emergência de raízes laterais (REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998). Membros desse gênero são amplamente distribuídos em arroz inundado estando presentes em 75% das amostras de espécies de arroz selvagens, 80% das variedades cultivadas e 33% dos modernos cultivares (ENGELHARD et al., 2000). A afinidade com plantas de arroz parece variar dentro do gênero *Azoarcus*, algumas estirpes, por exemplo, as do grupo D, são freqüentemente detectadas em raízes de arroz inundado, indicando que elas estão bem adaptadas as raízes (ENGELHARD et al., 2000).

O gênero *Herbaspirillum* foi estabelecido por BALDANI et al (1986) como bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a raízes de arroz, milho e sorgo. Nessa época, o gênero consistia apenas de uma espécie *H. seropedicae*, atualmente compreende mais sete espécies, *H. rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996), *H. frisingense* (KIRCHHOF et al., 2001), *H. lusitanum* (VALVERDE et al., 2003), *H. clorophenolicum*, *H. putei*, *H. hutiense* e *H. autotrophicum* (DING & YOKOTA, 2004). Entre as oito bactérias descritas acima, as quatro primeiras são fixadoras de nitrogênio, embora tenha sido observado o gene *nifH* na estirpe tipo de *H. putei*. As espécies diazotróficas do gênero *Herbaspirillum* podem ser encontradas em raízes, colmos e folhas de várias plantas, incluindo espécies de gramíneas economicamente importantes, como o arroz e cana-de-açúcar, que podem conter altos números de bactérias.

A espécie *H. seropedicae* é a diazotrófica endofítica mais estudada, atualmente, em plantas de arroz. ELBETAGY et al. (2001), obtiveram vários isolados da espécie de arroz selvagem *Oryza officinalis*. Outros trabalhos descrevem sobre o potencial de fixação de nitrogênio e promoção de crescimento dessa espécie para a cultura do arroz, (BALDANI et al., 1996, GYANESHWAR et al., 2002) além de descrever o mecanismo de infecção e colonização dessas bactérias na planta (JAMES et al, 2002).

O *H. rubrisubalbicans* era conhecido como *Pseudomonas rubrisubalbicans* (GILLIS et al., 1991), porém foi reclassificada por BALDANI et al. (1996) tornando-se uma outra espécie dentro do gênero *Herbaspirillum*. Essa bactéria pode causar a doença chamada "estria mosqueada" em algumas variedades de cana-de-açúcar. A espécie tem sido encontrada em raízes e colmos de cana-de-açúcar, arroz e sorgo, e apresenta a capacidade de fixar nitrogênio (PIMENTEL et al., 1991). A mesma se distingue de *H. seropedicae* pela capacidade de utilizar meso-eritritol em meio semi-sólido com N mineral e não utilizar N-acetilglucosamina (DÖBEREINER et al., 1995).

Uma outra bactéria diazotrófica do gênero *Herbaspirillum* é o *H. frisingense*, que foi isolada de plantas fibrosas C4 (*Spartina pectinata*, *Miscanthus sinensis*, *Miscanthus sacchariflorus*, *Pennisetum purpureum*) (KIRCHHOF et al., 2001). A espécie apresenta características morfológicas como o tamanho e forma da célula, aparência da colônia idêntica a das duas espécies descritas acima, porém pode ser diferenciada pela capacidade de não utilizar adipato, meso-erytritol, L-rhamanose e meso-inositol (KIRCHHOF et al., 2001). A mais nova espécie de bactéria diazotrófica descrita para o gênero *Herbaspirillum* é o *H. lusitanum*, que foi isolada de nódulos de *Phaseolus vulgaris* (VALVERDE et al., 2003). Essa nova bactéria não apresenta a capacidade de utilizar maltose, meso-inositol, meso-eritritol e adipato como fonte de carbono (VALVERDE et al., 2003).

A maioria das espécies não fixadoras do gênero *Herbaspirillum* são bactérias que foram reclassificadas para este novo grupo, como o *H. clorophenolicum* antes denominada *Comamonas testosteroni* isolada do sedimento de um córrego poluído

situado próximo a uma área industrial na Korea, é capaz de degradar compostos clorofenólicos provenientes de ambientes altamente poluídos (IM et al., 2004). A espécie *H. putei*, foi isolada de uma nascente de água e baseando-se em características fenotípicas, análises quimiotaxonomias, análise da seqüência 16S DNAr e hibridização DNA:DNA essas estirpes foram caracterizadas como essa nova espécie (DONG & YOKOTA, 2004). As bactérias denominadas *Aquaspirillum autotrophicum* e *Pseudomonas hutiense*, foram reclassificadas neste mesmo trabalho como *H. autotrophicum* e *H. hutiense*, respectivamente.

O gênero *Burkholderia* é constituído por 47 espécies e somente seis apresentam a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico: *B. vietnamiensis* (GILLIS et al., 1995), *B. kururiensis* (ZHANG et al., 2000), *B. tuberum*, *B. phymatum* (VANDAMME et al., 2002), *B. unamae* (CABALERO-MELADO et al., 2004) e *B. tropica* (REIS et al., 2004). Há ainda em processo de descrição e validação o nome da espécie “*B. brasiliensis*”.

A primeira espécie de *Burkholderia* diazotrófica descrita foi isolada da rizosfera de plantas de arroz crescidas no Vietnã, e chamada de *B. vietnamiensis* (GILLIS et al., 1995). Posteriormente ela foi encontrada associada com milho e café em diferentes regiões do México (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001). Novos isolados foram obtidos de cereais como sorgo, milho e arroz (BALDANI et al., 1999), bem como de frutas (CRUZ et al., 2001) crescidas no Brasil. Outra espécie, *B. kururiensis*, representada por somente a estirpe KP23, foi originada de amostras de sedimentos coletadas numa área contendo tricloetileno no Japão (ZHANG et al., 2000). A sua capacidade fixar nitrogênio foi demonstrada por ESTRADA DE LOS SANTOS et al. (2001), porém não há informação sobre a ocorrência dessa espécie em associação com plantas. Outras duas novas espécies diazotróficas foram descritas - *B. tuberum* and *B. phymatum*, ambas formam nódulos em duas específicas leguminosas tropicais, *Aspalathus carnosa* e *Machaerium lunatum* respectivamente (VANDAMME et al., 2002).

As duas bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* descritas mais recentemente são *B. unamae* e *B. tropica*. A espécie *B. unamae* foi isolada da rizosfera de milho, café e cana-de-açúcar crescidas no México. O uso do meio semi-sólido sem nitrogênio JMV contendo manitol como fonte de carbono (BALDANI, 1996) permitiu o isolamento da espécie *B. tropica* (REIS et al., 2004) e a bactéria não oficialmente descrita “*B. brasiliensis*” de plantas de cana-de-açúcar e arroz cultivadas no Brasil.

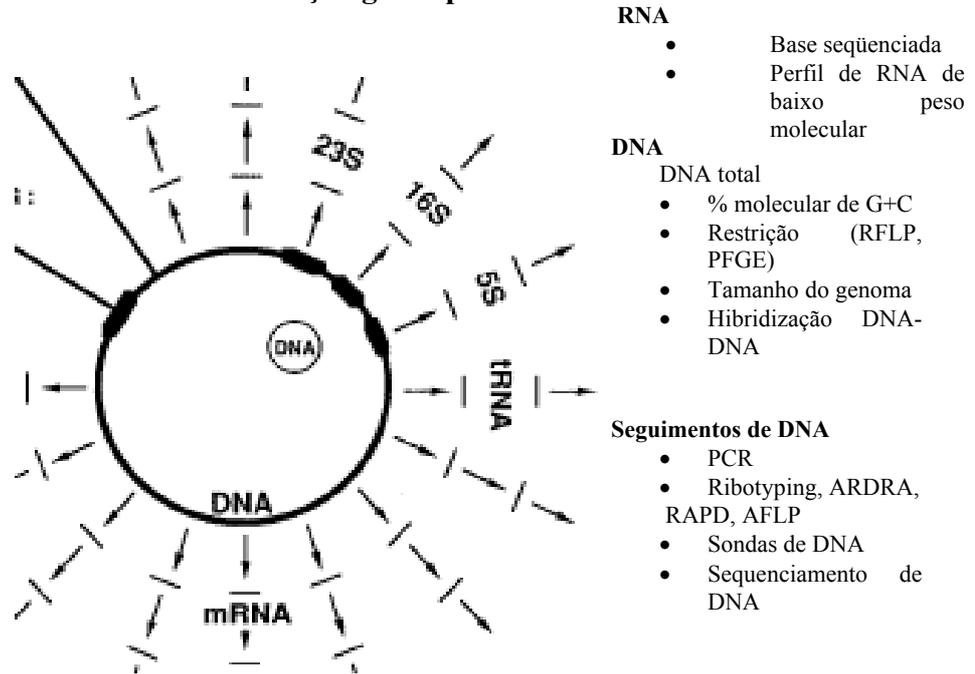
Recentemente, GYANESHWAR et al. (2001) isolaram bactérias do interior de raízes e colmos de plantas de arroz crescidas nas Filipinas e a caracterização parcial do 16S DNAr desses isolados mostrou que os mesmos poderiam pertencer a espécie *Serratia marcescens*. Essa espécie tem sido considerada como um patógeno à humanos e de insetos, entretanto, há também relatos que a espécie pode ser isolada de material de solos e plantas (GRIMONT et al., 1981).

Todos os gêneros relacionados acima mostram que uma grande variedade de bactérias diazotróficas endofíticas podem ser isoladas do interior de plantas de arroz. Dessa forma, faz-se necessário à busca por isolamento de novas bactérias que possam ajudar no conhecimento da ecologia inerente a essas bactérias, bem como explorar a capacidade das plantas de arroz em receber o N fixado via o processo de FBN.

A caracterização dessas bactérias pode ser feita através da análise polifásica onde todas as informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas são incorporadas para a identificação e determinação do isolado bacteriano (VANDAMME et al., 1996). As informações fenotípicas são derivadas de proteínas e suas funções, diferentes marcadores quimiotaxonômicos e muitas outras características que se expressam, já as informações genéticas são derivadas da análise direta dos ácidos nucléicos (DNA e

RNA) (VANDAMME et al, 1996). Essas informações podem ser analisadas através de várias técnicas conforme ilustrado na Figura 1.

Informação genotípica



Proteína

- Eletroforese de proteínas totais da célula
- Padrão enzimático

Informação fenotípica

Marcadores quimiotaxonômicos

- Análise dos lipídeos celulares
- Compostos da parede celular
- Padrão de Poliaminas
- Exopolissacarídeos

Característica expressa

- Morfologia celular e de colônia
- Fisiologia (Biolog e API)
- Enzimologia
- Sorologia (monoclonal e policlonal)

Figura 1 – Desenho esquemático das técnicas utilizadas para a análise de taxonomia polifásica. Adaptado de Vandamme et al (1996).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Experimento em Vasos

- Variedades de arroz e tipo de Solo

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizados três cultivares de arroz; IR 42, IAC 4440 e CNA 7553 (Rio Formoso). As duas primeiras variedades de arroz foram escolhidas com base na contribuição da FBN, sendo que a variedade IR 42 apresenta alta contribuição da FBN e a variedade IAC 4440 baixa (CAMPOS, 1999). A terceira variedade é comercial. O solo do tipo ARGISSOLO (Embrapa, 1999) utilizado para o desenvolvimento foi coletado (primeiros 20 cm num total de 450 Kg) no campo experimental da Embrapa Agrobiologia, numa área onde o arroz foi cultivado por 20 anos (de 1960 até a década de 80). Este solo foi peneirado e 4 amostras de 10 g cada foram analisadas quanto a composição química e número de bactérias diazotróficas. A análise química dos 20 cm superficiais do solo apresentou a seguinte composição: 3,3 cmol/dm³ de Ca⁺² + Mg⁺², 0,3 Al⁺³, 55 e 67 mg/kg, respectivamente de P e K e pH em água de 4,9. Este solo foi adubado de acordo com a análise química com CaCO₃ (4g/vaso), KCl (229 mg/vaso), super fosfato simples (600 mg/vaso), ZnSO₄.7H₂O (10 mg/vaso) N-NH₄ (400 mg/vaso).

Dois experimentos foram implantados, o primeiro em dezembro de 2001 e o segundo outubro de 2002, em vasos (4 kg solo/vaso) sob condições de alagamento. O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados em fatorial 3x4 (3 cultivares de arroz e 4 épocas de coleta – fase vegetativa, floração, enchimento de grão e maturação) com 4 repetições. A instalação dos experimentos foi realizada quinze dias após a adubação e dez dias após a germinação das sementes, foi adicionada uma lâmina de água de aproximadamente 3,0 cm e esta foi mantida até o término do experimento.

2.2.2 Contagem de bactérias dizotróficas no solo

A estimativa do número de bactérias diazotróficas no solo (*Azospirillum* spp. *A. amazonense*, *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia*), foi feita através da técnica do Número Mais Provável (NMP) e de acordo com a metodologia proposta por DÖBEREINER et al. (1995) e BALDANI (1996). Os meios de cultura utilizados para essa avaliação foram:

- Meio NFb semi-sólido e sólido (fonte de carbono – ácido málico, com pH 6,5), para a contagem e isolamento, de *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*;
- Meio LGI semi-sólido e sólido (fonte de carbono – sacarose, pH 6,0-6,2) para a contagem e isolamento, respectivamente, de *A. amazonense*;
- Meio JNFb semi-sólido (fonte de carbono - ácido málico com pH 5,8), para avaliar a ocorrência de *Herbaspirillum* spp e NFb sólido contendo três vezes a concentração do indicador para efetuar o isolamento do microrganismo;
- Meio JMV semi-sólido e sólido (fonte de carbono – manitol com pH 4,5-5,0), para a contagem e isolamento, respectivamente, de *Burkholderia* spp.

2.2.3 Desinfestação superficial da parte aérea das plantas

Foram testados três tratamentos, com o objetivo de selecionar o método mais eficiente na desinfestação superficial da parte aérea da planta:

a) álcool 70%: Nesse tratamento, foi passado algodão embebido em álcool 70% sobre a superfície das folhas e colmos.

b) cloramina T 1% : A parte aérea da amostra de arroz foi fracionada em colmo e folhas, ambos foram colocados em frascos contendo a solução de cloramina T 1% por 1 minuto, depois lavadas em água estéril logo após, as amostras foram transferidas para uma solução de tampão fosfato 0,05 M e posteriormente lavadas em água destilada estéril (DÖBEREINER et al., 1995).

c) hipoclorito de sódio 0,5%: Novamente a amostra de arroz foi fracionada em colmo e folhas e então colocadas em frascos contendo a solução de hipoclorito e depois lavadas em água estéril.

Após a desinfestação as amostras (colmo e folhas) foram pesadas e diluídas (10^{-1} a 10^{-6}) em solução salina, 0,1 mL de cada suspensão diluída foi inoculada nos meios semi-seletivos JNFb e JMV para o crescimento de bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum* e *Burkholderia*.

2.2.4 Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de diferentes variedades de arroz

- Isolamento e caracterização fenotípica

Para o primeiro experimento foi feito o isolamento de bactérias diazotróficas endofíticas em meios de culturas para *Herbaspirillum* spp., *Azospirillum* spp. e *Burkholderia* spp. Foram utilizados pedaços das raízes e da parte aérea. A parte aérea e raízes foram desinfestadas superficialmente em hipoclorito de sódio 0,5% e cloramina T 1%. No experimento 2 foram repetidos os procedimentos, porém foi dada maior ênfase ao isolamento de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Azospirillum*, devido ao número baixo de isolados obtidos no primeiro experimento para esses grupos de bactérias. A metodologia de isolamento dessas bactérias foi feita segundo a metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995).

O isolamento de bactérias diazotróficas decorreu após o crescimento positivo (formação de película em forma de véu) nos frascos inoculados com o tecido vegetal. Estes foram repicados para novos meios semi-sólidos semi-específicos (NFb, LGI, JNFb e JMV) e incubados por 3 dias a 30 °C. Decorridos os 3 dias de incubação os frascos que apresentaram película, foram riscados em placas contendo meios sólidos semi-específicos (NFb, NFb com 3X a concentração do corante – azul de bromotimol, LGI, JNFb e JMV).

As colônias crescidas após a riscagem nesses meios e incubação por 5 dias a 30°C, foram comparadas com as colônias de estirpes tipo de *A. brasilense* (Sp7), *A. lipoferum* (Sp59), *A. amazonense* (Y2), *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), *H. rubrisubalbicans* (M4), *H. frisingense* (84b), “*Burkholderia brasilensis*” (M130), *B. vietnamiensis* (TVV75), *B. kururiensis* (Kp23) e *B. tropica* (Ppe8). Colônias semelhantes às estirpes tipo foram novamente repicadas para novos meios semi-sólidos descritos acima. Colônias diferentes foram repicadas em todos os meios semi-sólidos semi-seletivos para verificar o caráter diazotrófico dessas bactérias em outro meio.

Com o aparecimento de película nesses novos meios, seguiu-se a etapa de purificação. Na purificação final das culturas de *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum* spp, foi usado o meio Batata (DÖBEREINER et al., 1995) e para *Burkholderia* spp. foi

utilizado o mesmo meio do isolamento. Nessa etapa as características morfológicas das colônias também foram comparadas com as estirpes tipo, assim, colônias idênticas às estirpes foram novamente repicadas para novos meios semi-sólidos e semi-seletivos para poder se verificar ao microscópio ótico as características celulares (motilidade, tamanho de célula) desses isolados.

Após o isolamento e purificação os isolados foram estocados sendo que para a estocagem das espécies *A. brasilense*, *A. lipoferum* e *Herbaspirillum* spp foi utilizado meio Batata enquanto que para *A. amazonense* e *Burkholderia* spp. a estocagem foi feita nos próprios meios semi-seletivos. As colônias puras das bactérias isoladas, também foram estocadas em microtubos tipo “Eppendorf” contendo 0,6 mL de água estéril.

2.2.5 Caracterização genotípica dos Isolados Bacterianos

a) Extração de DNA dos isolados bacterianos e das estirpes tipo

O método utilizado foi o de lise térmica (LAGUERRE et al. 1994). As bactérias foram crescidas por 48 horas em meio Dygs líquido, 50 µL da cultura crescida foi diluída em 450 µL de água ultrapura esterilizada e 100 µL dessa diluição foi fervida por 10 minutos, 10 µL dessa suspensão foi utilizada nas reações de PCR (Reação em cadeia da polimerase), descritas a seguir, cujo volume final foi de 50 µL, ajustados com adição de água ultrapura (ultraPURE™, Invitrogen Co.).

b) Uso de “primers” específicos para *Herbaspirillum seropedicae*

Na caracterização molecular da espécie *H. seropedicae* foram utilizados “primers” desenhados a partir da região 23S DNAr seguindo o protocolo sugerido por Kirchhof et al. (1997) para reação de PCR.

Reagentes:	Concentração Final:
Tampão para PCR	1 vez o volume da reação
MgCl ₂	1,5 mM
“Primer” 1440	50 µM
“Primer” HS	50 µM
dNTP	200 µM
<i>Taq</i> DNA polimerase	2,0 U

As seqüências dos “primers” são: 1440 (5'-GTTGGCTTAGAAGCAGCC-3') e HS (5'-ATGCAAAAACCGGGA-3'). O programa utilizado para PCR foi: 1 etapa inicial de desnaturação (93 °C por 3 min.) seguido por 30 ciclos intermediários (93 °C por 45 seg., 55 °C por 45 seg.; 72 °C por 1 min) e 1 etapa final de extensão (72 °C por 10 min) e resfriamento a 4 °C.

c) Uso de “primers” específicos para *B. kururiensis* e *B. tropica*

Para a caracterização molecular de isolados caracterizados como *B. kururiensis* e *B. tropica* foram desenhados “primers” específicos a partir da região 16S DNAr e posteriormente testados com as estirpes padrões de cada espécie

Os “primers” foram desenhados em colaboração com a estudante de Doutorado Joana Falcão Salles, a partir do alinhamento das seqüências do gene 16S DNAr de bactérias do gênero *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Ralstonia* depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information), o programa usado para o alinhamento das seqüências foi o Clustal_W. (THOMPSON et

al, 1994). As regiões selecionadas, foram analisadas por BLAST, para procurar seqüências de nucleotídeos homólogos no banco de dados do GenBank. Este procedimento foi repetido até a obtenção de seqüências suficientes para a construção de “primers” específicos para as espécies acima citadas. A seqüência ótima para os primers reversos específico para *B. kururiensis* (BKR 5’-TGCCATACTCCAGCGC-3’) e *B. tropica* (R1 5’-GGCCATATTAGGACCT-3’) são descritos na Tabela 1. O “primer” direto (BKTF 5’-CTGCGAAAGCCGGAT-3’) foi desenhado e testado por Salles et al. (2002). Nesse “primer”, devido a formação de “hairpin” (grampo por auto-pareamento), na segunda base na 5’ final, uma guanina foi trocada por timina, sem afetar a especificidade do “primer”.

Tabela 1 – Região de alinhamento dos “primers” espécie-específicos desenhados para *Burkholderia kururuensis* e *B. tropica* e outras espécies de bactérias

Organismo (acesso nº) ^a	Rgião de alinhamento dos “primers” desenhados	
	BKR (posição 641-656)	R1 (posição 449-464)
Estirpes do gênero	5'- GCGCTGGAGTATGGCA-3'	5'- AGGTCCTAATATGGCC- 3'
<i>Burkholderia</i>		
<i>B. tropica</i> Ppe8 ^T (AJ4200332)	T ---- T -----	T -----
<i>B. anthina</i> R-4183 ^T (AJ420880)	AG --- A -----	T - -CT ----- CA ---
“ <i>B. brasiliensis</i> ” M130 (AF491936)	-----	C - -GG - C - - - - CCC - T
<i>B. kururiensis</i> Kp23 ^T (AB024310)	-----	C - -GG - C - - - - CCC - T
<i>B. graminis</i> AUS35 ^T (U96941)	----- A -----	CCTGG ----- CCGG
<i>B. vietnamiensis</i> TVV70 ^T (U96929)	A --- A -----	T - - CT ----- CA - T -
<i>B. sordicola</i> SNU02123 ^T (AF512827)	- A -----	TC - CT ----- CA - TG
<i>B. sacchari</i> IPT101 ^T (AF263278)	T --- G -----	TT - GG ----- CCC - G
<i>B. pyrrocinia</i> LMG14191 ^T (U96930)	AG --- A -----	T --- T ----- AA ---
<i>B. solanacearum</i> R780 ^T (U28232)	CG --- A --- G - - T - - - - -	TTCGGT ----- CCTGG
Estirpes de outros gêneros		
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67 ^T (AJ238361)	CG --- A --- G - - T - -	TTTGG ----- CCTGG
<i>Azospirillum amazonense</i> Y2 ^T (X79742)	CG --- T --- TC - - G -	
<i>Ralstonia paucula</i> LMG3413 ^T (AF085226)	AG --- A --- GC - T - -	TCTGG ----- CCTGG

^a Número de acesso nº da seqüência 16S DNAr no GenBank (NCBI)

^b Resultados presentes de acordo com a o alinhamento no ClustalW. As linhas pontilhadas indicam nucleotídeos idênticos

O protocolo para amplificação das espécies de *Burkholderia* analisadas foi:

Reagentes	Concentração Final
Tampão para PCR	1 vez o volume da reação
MgCl ₂	3,75 mM
dNTP	200 µM
“Primer” BKTF	0,4 µM
“Primer” BKR ou R1	0,4 µM
Formamida	1%
<i>Taq</i> DNA polimerase	2,5U

Na termociclagem, inicialmente a temperatura foi mantida a 94 °C por 4 minutos e para aumentar a especificidade da reação, uma PCR tipo “Touchdown” foi conduzida como se segue: A temperatura de anelamento inicial foi de 62 °C com diminuição da mesma em 2 °C para 60 °C no 5º ciclo, depois em 25 ciclos adicionais até 58 °C. A temperatura de desnaturação foi de 94 °C por 1 minuto, o anelamento foi feito com as temperaturas descritas acima por 90 s, a temperatura de extensão foi de 72 °C por 2 minutos. A etapa final constituiu de extensão a 72 °C por 10 minutos, seguido de resfriamento a 10 °C.

d) Análise de Diversidade dos Isolados Bacterianos

- Amplificação do gene 16S DNAr por PCR

Para o volume de reação de amplificação 50 µL foram utilizados os “primers”:
Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGG-3') e Y3 (5'-CTAGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT-3') (YOUNG et al.,1991) com seguinte protocolo:

Reagentes	Concentração Final
Tampão para PCR	1 vez o volume da reação
MgCl ₂	2,0 mM
dNTP	200 µM
“Primer” Y1	0,12 µM
“Primer” Y3	0,12 µM
<i>Taq</i> DNA polimerase	1,0 U

Para obtenção de uma maior especificidade da reação foi utilizado 1,25 µL/reação de Tween 20 diluído em água milliQ estéril na razão 1: 4

As condições de termociclagem foram: 1 etapa inicial de desnaturação (93 °C por 2 min.) seguido por 35 ciclos intermediários (93 °C por 45 seg., 62 °C por 45 seg.; 72 °C por 2 min.) e 1 etapa final de extensão a 72 °C por 5 minutos.

- Restrição dos Fragmentos 16S amplificados (ARDRA)

Os produtos de amplificação da região 16S DNAr de cada isolado bacteriano foram clivados com as endonucleases de restrição tetraméricas, *AluI* (5'-AG[∇]CT-3'/3'-TC[∇]GA-5') e *MspI* (5'-C[∇]CG G-3'/3'-G GC[∇]C-5'), para os isolados caracterizados como pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* e *AluI* (5'-AG[∇]CT-3'/3'-TC[∇]GA-5'), *HinfI* (5'-G[∇]ANT C-3'/3'-C TNA[∇]G-5') e *RsaI* (5'-GT[∇]AC-3'/3'-CA[∇]TG-5') para os isolados bacterianos caracterizados como pertencentes ao gênero *Burkholderia*. A escolha das enzimas de restrição foi baseada no trabalho de RODRIGUES (2003), que

utilizou essas enzimas, obtendo assim sucesso na distinção de isolados bacterianos caracterizados como *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp.

As condições para uma reação de 10 µL de reação foram: 5,0 U (unidades) de enzima de interesse, 1,0 µL de tampão de reação da enzima e 8 µL de material amplificado.

e) Visualização dos fragmentos gerados por amplificação e restrição

Os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (1,2% v/v) em tampão de corrida TAE 1X, a 65V, por 1,5 h. E os produtos de restrição foram analisados em gel de agarose (2,5% v/v) por 2,5 h, utilizando-se o mesmo tampão de corrida e a mesma voltagem utilizada na análise dos fragmentos amplificados. As bandas formadas no gel foram visualizadas após coloração com brometo de etídeo e exposição em luz ultravioleta e fotografadas com filme Polaroid tipo 667.

f) Análise dos perfis de restrição

Os perfis de restrição de cada isolado bacteriano gerados foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo coeficiente de JACARD e analisados através de uma matriz de similaridade. Para características binárias, esse coeficiente define as semelhanças entre dois indivíduos como sendo expresso por $J_{xy} = a/(n-d)$, onde J_{xy} é a semelhança entre os indivíduos X e Y, “a” é o número de combinações da presença de fragmentos dos indivíduos, “n” é o número de combinações possíveis e “d” é as combinações da ausência de fragmentos. Os isolados foram agrupados pelo método das médias das distâncias UPGMA (SNEATH & SOKAL, 1973) e representados graficamente por um dendrograma (NYTSYS-pc, versão 1.8, Exceter Software, Setauket, N.Y.).

g) Sequenciamento da região 16S DNAr dos isolados bacterianos e da região flanqueada pelos “primers” 1440/HS

- Precipitação do produto de amplificação

Os produtos de amplificação foram purificados através da precipitação adicionando-se 8 µL de NaCl 5,0 M, 40 µL de polietilenoglicol (8000) 22% a 32 µL do material de DNA amplificado. A mistura foi incubada a 4 °C por uma noite, após a incubação foi centrifugada a 16000 x g (Centrifuga Ependorf 5402R) por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% e centrifugado a 4 °C por 15 minutos, seco ao ar e ressuspenso em 20 µL de água milliQ esterilizada, 2,0 µL desse material foi submetido à eletroforese em gel de agarose (0,7%) visando verificar a qualidade de material amplificado e estimar a concentração para posterior reação de sequenciamento.

- Reação de sequenciamento

Para o sequenciamento do gene 16S DNAr foram utilizados os “primers” arrolados na Tabela 2 e para o sequenciamento do produto de PCR dos isolados caracterizados com “primers” específico para *H. seropedicae* utilizou-se os “primers” 14440/HS. A reação de sequenciamento foi feita utilizando 300 ng dos produtos de PCR purificados, 5,0 µM de cada “primers” e 4,0 µL do kit “TE Dynamics Kit” (Amersham Biosciences) e água ultrapura (ultraPURETM, Invitrogen Co.) para o volume final de 10 µL. As condições para a reação de sequenciamento foram: 30 ciclos de desnaturação anelamento e extensão de 95 °C por 20 seg., 50 °C por 15 seg.; 60 °C por 1 min. respectivamente. Após a reação de sequenciamento, as amostras foram precipitadas adicionando 1,0 µL de acetado de amônio 7,5 M e 27,5 µL de etanol 70% que foram

incubadas a 4 °C por uma noite, após a incubação, centrifugadas a 520G por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 150 µL de etanol 70% e centrifugado 520G por cinco minutos a 4 °C. As amostras foram secas ao ar, e ressuspendidas em 7,5 µL de tampão de sequenciamento para Mega BACE (“loading”) e analisadas em sequenciador automático MegaBACE1000 (Amershan Biosystem).

Tabela 2 – “Primers” utilizados para amplificação e sequenciamento do gene 16S DNAr dos isolados bacterianos

“Primers”	Seqüência (5’→3’)	Referência
Y1	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	YOUNG et al., 1991
Y2	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG	YOUNG et al., 1991
Y3	CTGACCCCACTTCAGCTTGTTCAT	YOUNG et al., 1991
16S362f	CTCCTACGGGAGGCAGTGGGG	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S786f	CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S1203f	GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S1110r	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S805r	GACTACCAGGGTATCTAATCCTG	SOARES-RAMOS et al., 2003

- Programas utilizados para análise das seqüências de DNA

As comparações das seqüências geradas foi feita empregando o programa BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTn, ALTSCHUL, et al., 1997), em seguida foi feito o alinhamento das seqüências de DNA utilizando o programa Clustal_W (THOMPSON et al., 1994), após o alinhamento das seqüências foi contruída a a árvore filogenética, utilizando o algoritmo UPGMA no programa MEGA (www.megasoftware.net, KUMAR et al., 2004).

2.2.6 Amplificação da região do gene *nifH* da nitrogenase

Os isolados bacterianos que ocuparam posições diferentes das bactérias diazotróficas já descritas nos ramos da árvore filogenética gerada pela análise da 16S DNAr foram submetidos ao processo de amplificação por PCR da região do gene *nifH* (UEDA et al., 1995a) visando confirmar o caráter de diazotrófico. O seguinte protocolo foi usado:

Reagentes:	Concentração Final:
Tampão para PCR	1 vez o volume da reação
MgCl ₂	1,5 mM
“Primer” 19F	2,0 µM
“Primer” 407R	2,0 µM
dNTP	0,2 mM
<i>Taq</i> DNA polimerase (Promega)	2 unidades/ reação

Foram utilizados 10 µL de amostra de DNA para uma reação de 50 µL de DNA. As seqüências dos primers são: 19F (5’GCIWTYTAYGGIAARGGIGG3’) e 407R (5’AAICCRCCRCIACIACRTC3’) (onde I= inosina, R= A ou G ,W= A ou T e Y= C ou T). As condições de termociclagem foram: 1 etapa inicial de desnaturação (94 °C por 4 min.) seguido por 35 ciclos intermediários (94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min.; 72 °C por 1 min) e 1 etapa final de extensão (72 °C por 4 min).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Contagem de bactérias diazotróficas no solo

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que o número de bactérias diazotróficas encontrados nesse solo corresponde aos já relatados na literatura (em torno de 10^3 a 10^4 /g solo) para bactérias presentes nas amostras de solo cultivados com gramíneas crescidas na região de Seropédica, RJ (BALDANI, 1986, BALDANI, 1983, MAGALHÃES, 1983, BALDANI, 1996).

Tabela 3- N° de bactérias diazotróficas estimado pelo método do número mais provável (NMP) no solo antes do plantio, obtidos nos meios semi-sólidos NFb, LGI, JNFb e JMV

Meios de cultivo	n° de bactérias/g de solo ¹ x 10 ⁴
NFb	5,0
LGI	3,5
JNFb	0,25
JMV	0,45

¹ - (Média de três repetições).

Foram obtidas 20 isolados diazotróficos do solo, os quais foram caracterizadas morfológicamente como pertencentes às espécies *Azospirillum lipoferum* (3), *A. brasilense* (5), *A. amazonense* (7), e *Burkholderia* spp. (5). Não foram isoladas bactérias do gênero *Herbaspirillum*, dado este que corrobora com os estudos de Baldani et al. (1992) e Olivares et al (1997) que relatam que esta bactéria não sobrevive no solo sem a presença da planta hospedeira.

2.3.2 Eficiência do processo de desinfestação da parte aérea da planta

A contagem do número de bactérias diazotróficas presente nas três cultivares de arroz após a desinfestação superficial do colmo e das folhas em relação as plantas não desinfestadas (controle) está apresentada na Tabela 4. Esses testes foram realizados com o objetivo escolher o tratamento onde fosse possível isolar somente bactérias que colonizam o interior da parte aérea das plantas de arroz, por essa razão foi escolhido o tratamento 3 (desinfestação com hipoclorito de sódio) uma vez que o número de bactérias encontradas após esse tratamento foi 100 vezes menor do que o controle, e até 10 vezes menor em relação aos outros tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 - Eficiência dos métodos de desinfestação do colmo e das folhas de três cultivares de arroz, sobre a população nativa de bactérias diazotróficas, cultivadas em meios JNFb e JMV.

Meio de Cultura	Cultivares de arroz	Colmo				Folhas			
		Tipos de Desinfestação							
		1	2	3	4	1	2	3	4
		N° de células (x10 ³)/g de matéria fresca							
JNFb	IR 42	11000	0,25	1	100	1100	a.n.m.d	2,5	20
	IAC 4440	400	0,2	1	1	110	0,04	0,04	25
	CNA 7553	400	a.n.m.d	0,1	10	250	1,5	1,5	2,5
JMV	IR 42	250	0,25	1	100	2500	a.n.m.d	0,25	40
	IAC 4440	1100	0,01	0,1	1	450	0,25	0,01	25
	CNA 7553	1100	0,01	1	10	250	0,04	4	150

Legenda: 1- Plantas não desinfestadas; 2- Desinfestação com cloramina -T 1%; 3- desinfestação com hipoclorito de sódio 0,5%; 4- desinfestação com álcool 70%; a.n.m.d- abaixo do nível mínimo de detecção. (Média de três repetições)

Segundo BARRAQUIO et al. (1997), as técnicas de desinfestação superficial dos tecidos das plantas podem variar muito, devido as diferentes condições de crescimento, idade e estrutura das raízes das plantas. Em consequência, faz-se necessário o teste de vários desinfetantes para determinar, o melhor método de desinfestação superficial do tecido da planta de interesse.

A desinfestação superficial da parte da planta é importante porque o isolamento irá depender da morte daqueles organismos que vivem na superfície ou dentro de tecidos mortos (saprófitos) (McCULLY, 2001). No entanto, a desinfestação completa pode resultar na perda de endofíticos devido à penetração da solução desinfetante dentro do tecido da planta e ainda, se a mesma for incompleta, pode mascarar a verdadeira localização do microrganismo, devido à adsorção das células nas estruturas celulares das plantas (HARTMANN et al, 2000, McCULLY, 2001). Nas raízes, a desinfestação superficial é um pouco mais difícil, principalmente se há colonização de microrganismos nos tecidos corticais os quais são fortemente lignificados e suberizados, formando um complexo altamente hidrofóbico que só pode ser penetrado por forte esterilização (McCULLY, 2001).

Na desinfestação dos tecidos vegetais são utilizados vários desinfetantes, tais como hipoclorito de sódio (FISHER et al., 1992, QUADT-HALLMANN et al; 1997, AZEVEDO, 1998), etanol (FISHER et al, 1992, AZEVEDO, 1998), peróxido de hidrogênio (MISAGHI & DONNDELINGER, 1990) e cloreto de mercúrio (SRISKANDARAJAH et. al.; 1993). Também pode ser usada a combinação de dois ou mais desses desinfetantes (AZEVEDO 1998), seguido de várias lavagens com água estéril ou solução tampão. Detergentes como Tween 20, Tween 80 ou Triton X-100 também podem ser adicionados a fim de reduzir a tensão superficial, além de permitir que o desinfetante penetre em sítios além da epiderme, como tecidos corticais, por exemplo (HALLMANN et. al.; 1997).

No isolamento de bactérias diazotróficas endofíticas das raízes e colmos de cana-de-açúcar (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1998), arroz (BALDANI et al.1986), milho (MAGALHÃES et al., 1979) e diversas outras espécies de gramíneas, a

cloramina T e o álcool (70%) foram usados com eficiência no processo de desinfestação.

2.3.3 Isolamento e caracterização fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas

Nos dois experimentos foram isolados um total de 168 bactérias, sendo 7 do tipo “amarelas” e que foram identificadas como pertencentes ao gênero *Sphingomonas* conforme dados obtidos por VIDEIRA et al. (2004). As demais bactérias foram distribuídas em 3 grupos: 55 isolados pertencentes ao gênero *Herbaspirillum*, 50 ao gênero *Burkholderia* e 56 ao gênero *Azospirillum* (Figura 1). Para esse último gênero foi observado um grande número de isolados da espécie *Azospirillum amazonense* (39) (dados não apresentados).

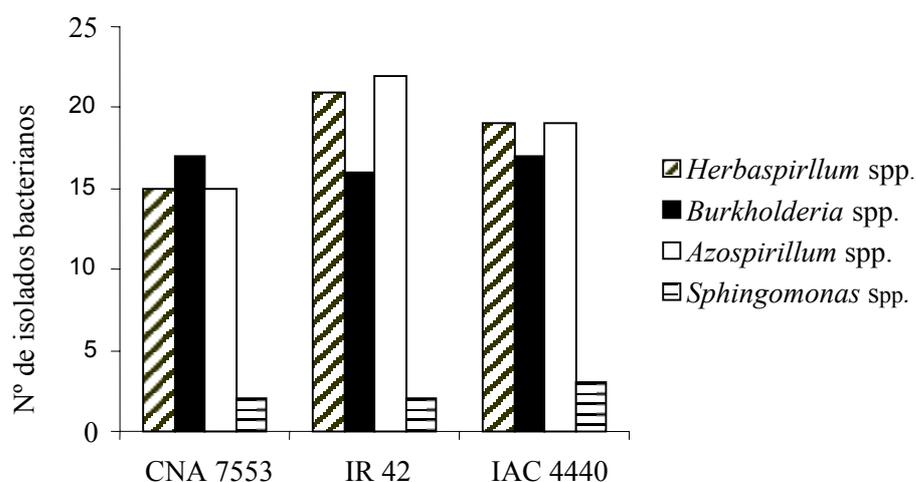


Figura 2 – Número de isolados bacterianos caracterizados morfologicamente como pertencentes a *Azospirillum* spp., *Burkholderia* spp., *Herbaspirillum* spp. e *Sphingomonas* spp. originados dos cultivares CNA 7553, IR 42 e IAC 4440 de arroz.

Foram obtidos maiores números de isolados da cultivar de arroz IR42 (61), seguido da IAC 4440 (55) e CNA 7553 (47) (Figura 2). Na cultivar IR42 foi obtido maior número de isolados caracterizados como *Azospirillum* (22), seguido de *Herbaspirillum* (16), *Burkholderia* (16) e *Sphingomonas* (2). No caso do cultivar IAC 4440 o mesmo número de isolados caracterizados como pertencentes aos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* foram obtidos (19). Por outro lado, 17 isolados bacterianos foram caracterizados como *Burkholderia* spp. e 4 como *Sphingomonas* spp. Para o cultivar CNA 7553 o número de isolados caracterizados como *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum* spp. foi o mesmo (15) para ambos os gêneros. Porém o número de isolados caracterizados como *Burkholderia* nesse cultivar foi maior (17). O maior número de isolados caracterizados como “amarelas” foi obtido da cultivar IAC 4440 (4 isolados) enquanto que da cultivar CNA7553 foi obtido somente dois isolados (Figura 2).

Esses dados contrastam com os obtidos por RODRIGUES (2003), que observou um maior número de isolados na cultivar IAC 4440 em solo proveniente do estado do Rio de Janeiro em relação a cultivar IR42 num primeiro ensaio. Porém, o número de isolados provenientes da IR42 foi maior do que na IAC 4440 no segundo ensaio, dados que confirmam aqueles apresentados na Figura 2.

Um grande número de bactérias do gênero *Azospirillum* foram isoladas dos cultivares analisados, apesar desse gênero não ser considerado endofítico por alguns

autores. As espécies *A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense* já foram isoladas de raízes, colmo, de plantas de arroz (LADHA et al., 1982; BALDANI, 1984). BALDANI (1984) cita que o arroz cultivado no solo série Itaguaí apresentou uma maior ocorrência de *Azospirillum* e que diferiu estatisticamente das espécies encontradas no solo série ecologia. De acordo com LADHA, et al. (1987), aproximadamente 85% dos isolados do gênero pertencem à espécie *A. lipoferum*, indicando a preferência de colonização da espécie por plantas de arroz. Nesse estudo, diferente do que foi relatado por LADHA, et al. (1987), foram obtidos maiores números de isolados caracterizados como pertencentes a espécie *A. amazonense* (dados não apresentados).

Os outros isolados identificados como pertencentes ao gênero *Azospirillum* não foram caracterizados morfológicamente em nível de espécie, uma vez que a identificação do *A. amazonense* é fácil e rápida porque, o mesmo utiliza a glicose como fonte de carbono e tem colônias bem peculiares nos meios LGI e Batata. Já as outras duas espécies mencionadas acima utilizam o ácido málico como fonte de carbono e são muito parecidas em placas com o meio NFb e Batata (DÖBEREINER et al., 1995), dificultando assim a identificação com base na morfologia.

Como já foi relatado, o gênero *Herbaspirillum* ocorre em números elevados em plantas de arroz, sendo *H. seropedicae* a espécie encontrada colonizando plantas de arroz (BALDANI et al., 1986, CAMPOS 1999, ELBETAGY et al., 2001). Porém, o número de isolados caracterizados como *Herbaspirillum* por RODRIGUES (2003) nas variedades IR 42 e IAC 4440 pode ser considerado baixo, 3% e 18%, para o primeiro e segundo experimentos, respectivamente. Além disso, não foram obtidos isolados da cultivar IAC 4440 no primeiro experimento. A autora argumentou que o não isolamento dessas bactérias foi em consequência do longo período de incubação no meio JNFb na fase inicial de isolamento, proporcionando assim o desenvolvimento de outras bactérias, como por exemplo o *Azospirillum* que utiliza a mesma fonte de carbono (ácido málico) (DÖBEREINER et al., 1995).

Alguns isolados (13) apresentaram características diferentes daquelas descritas para o gênero *Herbaspirillum* (BALDANI et al., 1986), como por exemplo, o tamanho da colônia, maior e com bordas esbranquiçadas, porém o formato e movimento da célula (bastonetes e circulares e vibratórios, respectivamente) foram idênticos aos das estirpes tipo Z67 (*H. seropedicae*), M4 (*H. rubrisubalbicans*) e 84b (*H. frisingense*) usadas como referência na caracterização fenotípica. Isolados com características semelhantes também foram encontrados por RODRIGUES (2003) quando analisou a população de bactérias diazotróficas originadas de plantas de arroz cultivadas em dois diferentes tipos de solos.

Um grande número de bactérias classificadas como *Burkholderia* spp. também foram isoladas das três cultivares de arroz em estudo. Esses resultados corroboram com as observações feitas por BALDANI et al. (1996), STOLTZFUZ (1997) e RODRIGUES (2003) que verificaram números elevados de isolados desse gênero em plantas de arroz.

A identificação de novos isolados bacterianos baseadas apenas em características fenotípicas e fisiológicas, nem sempre corresponde as características das estirpes tipo da espécie. Dessa maneira é necessária a utilização de técnicas mais refinadas como as de biologia molecular para a caracterização de isolados ao nível de espécie (KIRCHHOF et al., 1997).

De uma maneira geral, a raiz foi a parte da planta que originou um maior número de isolados de bactérias diazotróficas caracterizadas como *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. (44), seguida do colmo (36) e da folha (25) (Figura 3). Para o gênero *Azospirillum*, foram observados um total de 18 isolados bacterianos provenientes da

folha dos cultivares IR 42 e IAC 4440 enquanto somente 4 isolados foram obtidos da cultivar CNA 7553 (Figura 2). Segundo BALDANI (1996) no espaço intercelular está localizada a maioria das bactérias endofíticas e esse local é rico em glicoproteínas, que agem como fonte de carbono e nitrogênio para as bactérias. Talvez essa afirmação possa explicar o grande número de bactérias diazotróficas endofíticas colonizando as raízes desinfectadas de arroz, seguidas de colmo e folhas conforme observado por BALDANI (1984), BALDANI (1996), BARRAQUIO et al. (1997) e RODRIGUES (2003). Além disso, as raízes e colmos podem ter seus tecidos internos mais facilmente colonizados, devido a pontos de entradas naturais, como fendas e fissuras, na superfície da planta que permitem a entrada de bactérias endofíticas durante o seu ciclo de crescimento (JAMES, 2000).

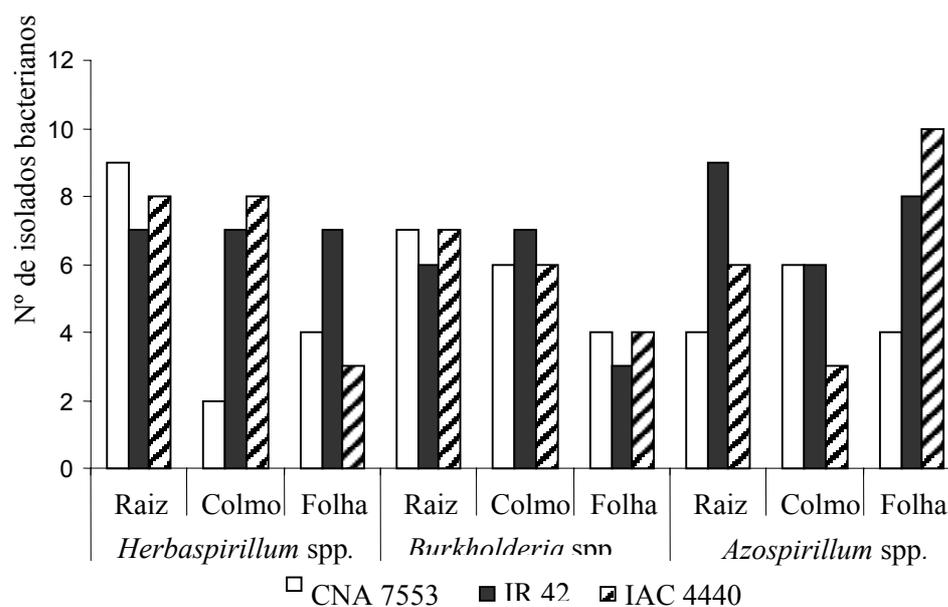


Figura 3 - Número de isolados bacterianos originados da raiz, colmo e folhas dos cultivares de arroz CNA 7553, IR 42 e IAC 4440.

2.3.4 Caracterização genotípica de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de plantas de arroz

1) Uso de “primers” específicos para *Herbaspirillum seropedicae*

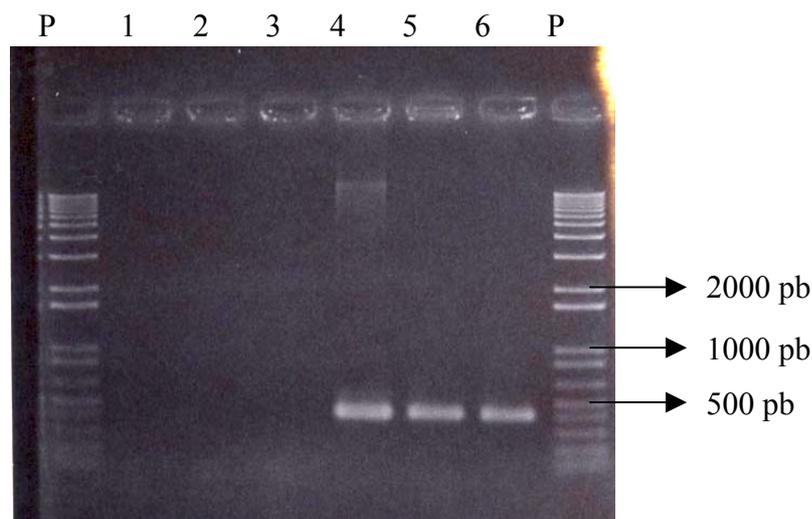
As técnicas biomoleculares podem auxiliar tanto na detecção do microrganismo no ambiente, como também ajudar nos estudos de taxonomia e de diversidade microbiana.

Na Tabela 5 estão listadas a origem dos isolados bacterianos caracterizados fenotipicamente como pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* bem como das estirpes tipo utilizadas como referência para a caracterização morfológica e molecular.

Tabela 5 - Origem dos isolados bacterianos caracterizados fenotipicamente como *Herbaspirillum* spp. e das estirpes tipo utilizadas como referência para a caracterização morfológica e molecular.

Isolados bacterianos	Cultivares	Parte da Planta	
4, 18, 19, 20, 24, 27, 32, 37 (H)	IR 42	Raiz	
7, 8, 26, 34, 38, 39, 64 (H)	IR 42	Colmo	
22, 25, 33, 36, 62, 63 (H)	IR 42	Folha	
9, 10, 15, 16, 28, 29, 30, 56 (H)	IAC 4440	Raiz	
5, 6, 14, 23, 31, 52, 55, 58 (H)	IAC 4440	Colmo	
17, 53, 57 (H)	IAC 4440	Folha	
1, 2, 3, 11, 12, 13, 40, 54, 59 (H)	CNA 7553	Raiz	
35, 60 (H)	CNA 7553	Colmo	
21, 50, 51, 61 (H)	CNA 7553	Folha	
Estirpes tipo	Amostra	Cultivar	Referência:
Z 67 ^T (<i>H. seropedicae</i>)	Raiz	Arroz	BALDANI et al. (1986)
M4 ^T (<i>H. rubrisibalbicans</i>)	Folha	Cana-de-açúcar	OLIVARES (1997)
84b ^T (<i>H. frisingense</i>)	Colmo	<i>Pennisetum purpureum</i>	KIRCHHOF et al. (2001)

O perfil eletroforético do produto de amplificação por PCR da região flanqueada pelos “primers” 1440/HS pode ser visualizado na Figura 4. A utilização dos “primers” específicos para *Herbaspirillum seropedicae* permitiu distinguir 16 isolados, os quais não apresentaram produto de amplificação do tamanho esperado de 390 pb (Tabela 6). O sinal negativo da reação para esses 16 isolados bacterianos corresponde à afirmação feita por KIRCHHOF et al (1997) e HARTMANN (2000) que destacam que o conhecimento sobre as características morfológicas e fisiológicas não é suficiente para identificar uma bactéria diazotrófica ao nível de espécie. RODRIGUES (2003), fez uso desses “primers” para caracterizar 32 isolados bacterianos com características fenotípicas de *Herbaspirillum* spp. e observou que somente 20 apresentavam produto de amplificação do tamanho esperado. Entretanto, a utilização da sonda oligonucleotídica Hsero 445, também específica para a espécie *H. seropedicae*, não foi capaz de reconhecer esses mesmos 20 isolados. A autora atribui que essa diferença pode estar relacionada às regiões usadas para o desenho dos primers (16S DNAr) e da sonda (23S DNAr).



Legenda : P (Padrão 1Kb plus DNA ladder), 1- controle negativo (água), 2- M4, 3- 84b, 4- Z67, 5 e 6 - Isolados H7 e H15 Respectivamente.

Figura 4 - Perfil eletroforético do produto de amplificação da região flanqueada pelos “primers” específicos 1440/HS.

“Primers” específicos para *H. seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* foram usados para identificar e distinguir estirpes dessas espécies quando inoculadas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar (KIRCHHOF et al. 1997). Apesar de ser muito estudada, apenas dois trabalhos (RODRIGUES, 2003, KIRCHHOF et al., 1997) reportam o uso desses “primers” para caracterizar a espécie *Herbaspirillum seropedicae*. Os demais trabalhos referem-se ao uso de sondas oligonucleotídicas desenhadas a partir da região 16S DNAr (KIRCHHOF et al, 1997; KIRCHHOF et al., 2001; ELBETAGY et al., 2001).

Tabela 6 - Caracterização molecular dos isolados bacterianos através da utilização do par de “primers” 1440/HS, específico para *H. seropedicae*.

Isolados Bacterianos	Produto de amplificação por PCR com o par de “primers” 1440/HS
2H, 6H, 7H, 8H, 12H, 14H, 15H, 16H, 17H, 18H, 19H, 20H, 21H, 22H, 23H, 25H, 26H, 27H, 28H, 29H, 33H, 37H, 38H, 39H, 40H, 50H, 51H, 52H, 53H, 54H, 56H, 57H, 58H, 59H, 60H, 61H, 62H, 63H, 64H.	+
1H, 3H, 4H, 5H, 9H, 10H, 11H, 13H, 24H, 30H, 31H, 32H, 34H, 35H, 36H, 55H	-

+ = presença de produto de PCR do tamanho esperado

- = ausência do produto de PCR do tamanho esperado

2) Uso de “primers” específicos para identificação de *B. kururiensis* e *B. tropica*

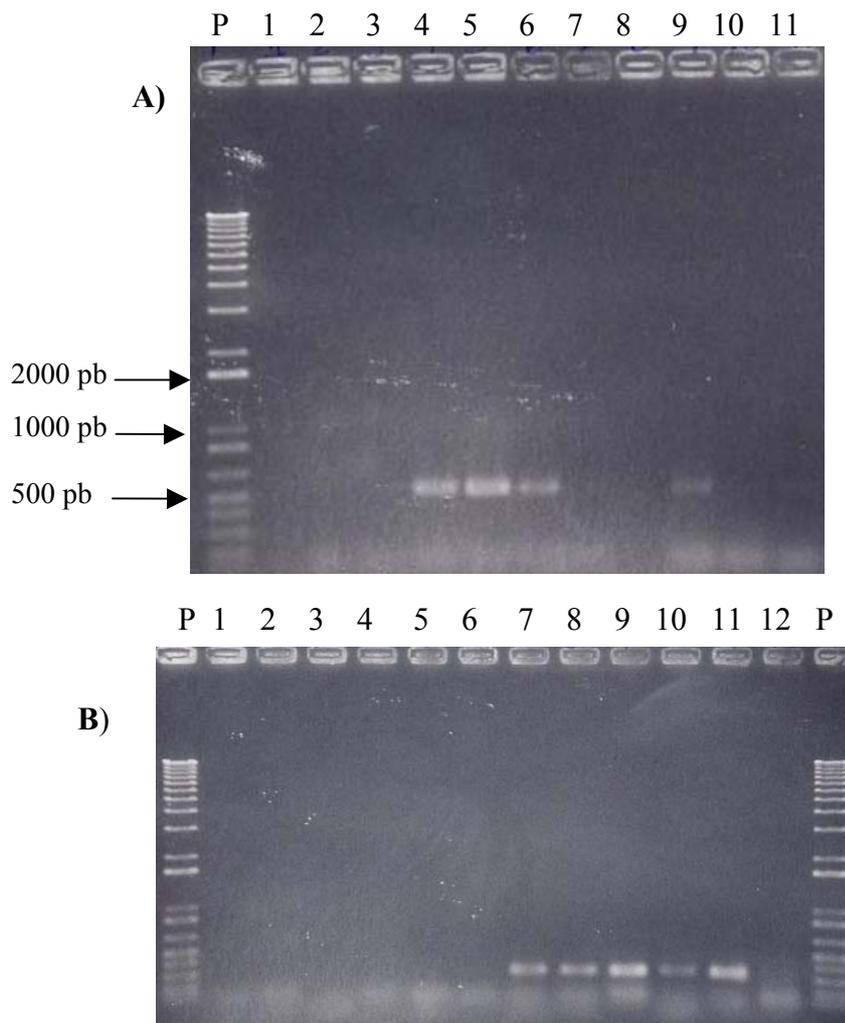
O uso dos pares de “primers” BKTF/BKR e BKTF/R1, possibilitou a amplificação do fragmento no tamanho esperado para as estirpes tipo das espécies *B. kururiensis* e *B. tropica* (500 pb e 390 pb, respectivamente) permitindo sua identificação e a discriminação entre si e, também dos isolados bacterianos objeto desse estudo. A lista dos isolados bacterianos caracterizados como *Burkholderia* spp., bem como as estirpes tipo utilizadas para caracterização morfológica e molecular pode ser observada na Tabela 7

A Figura 5 apresenta o perfil eletroforético do produto de amplificação quando os pares de primers BKTF/BKR e BKTF/R1 foram utilizados. Nesse caso não foi obtido produto de amplificação quando o par de “primers” BKTF/R1 foi utilizado. Esse resultado corresponde à descrição da espécie *B. tropica* feita por REIS et al (2004) onde essa bactéria tem possivelmente a preferência em colonizar plantas ricas em sacarose.

Tabela 7 - Origem dos isolados bacterianos caracterizados fenotipicamente como *Burkholderia* spp. e das estirpes tipo utilizadas como padrão de referência para a caracterização morfológica e molecular.

Isolados Bacterianos	Cultivares	Parte da Planta	
20, 28, 30, 31, 40 (B)	IR 42	Raiz	
2, 6, 21, 29, 35, 41, 45 (B)	IR 42	Colmo	
3, 32, 36, 42 (B)	IR 42	Folha	
5, 7, 13, 16, 17, 22, 43 (B)	IAC 4440	Raiz	
4, 8, 14, 19, 23, 44 (B)	IAC 4440	Colmo	
9, 10, 18, 24 (B)	IAC 4440	Folha	
1, 11, 12, 25, 33, 38, 48 (B)	CNA 7553	Raiz	
15, 26, 34, 37, 46, 49 (B)	CNA 7553	Colmo	
27, 39, 47, 50 (B)	CNA 7553	Folha	
Estirpes tipo	Amostra	Cultivar	Referência
Kp23 ^T (<i>B. kururiensis</i>)	solo		ZHANG et al. (2000)
M130 (“ <i>B. brasiliensis</i> ”)	raíz	Arroz	BALDANI (1996)
Ppe 8 ^T (<i>B. tropica</i>)	Colmo	Cana-de-açúcar	REIS et al. (2004)
TVV75 ^T (<i>B. vietnamiensis</i>)*	Raiz	Arroz	GILLIS et al. (1995)

* Utilizada apenas na caracterização molecular



Legenda: Em A e B -P (Padrão 1 Kb plus DNA ladder), 1- água, 2 a 5 - estirpes tipo: ATCC 2416^T, TVV75^T, Kp23, M130, Somente em A: 6- isolado bacteriano 1B, 7 - estirpe tipo Ppe8^T, 8- isolado bacteriano (4B), 9 - estirpe M209, 10 e 11 - (isolados bacterianos 39B) e 2B. B): 6- isolado bacteriano 4B, 7-estirpe tipo Ppe8^T, 8, 9, 10-estirpes isoladas de cana-de-açúcar (Ppe7, Ppe6 e Ppe5) –11- estirpe isolada de abacaxi (AB98), 12- isolado 39B.

Figura 5 - Perfil eletroforético do produto de amplificação da região flanqueada pelos “primers” específicos para *B. kururiensis* (A) e *B. tropica* (B) de diversas estirpes tipo e isolados de plantas de arroz.

A utilização de “primers” desenhados a partir da região 16S e 23S DNAr, bem como do gene *recA* é uma prática bastante comum para discriminar as espécies de *Burkholderia*. No entanto, a literatura relata somente a existência de um par de primer utilizado para discriminar *B. vietnamiensis* do complexo genomovar V de *B. cepacia* e que foi desenhado por BAUERNFEIND et al. (1999).

Um total de 50 isolados foram testados com os “primers” específicos para as espécies *B. kururiensis* (BKR) e *B. tropica* (R1). Dentre esses, 42 apresentaram produto de amplificação quando utilizado o “primer” específico para *B. kururiensis* enquanto que 9 isolados não apresentaram produto de amplificação tanto para o primer BKR quanto para o R1 (Tabela 8).

Tabela 8 - Caracterização molecular dos isolados bacterianos identificados fenotipicamente como *Burkholderia* spp.* , através da técnica de PCR e uso do par de “primers”, BKTF/BKR específicos para *B. kururiensis*.

Isolado bacteriano	Sinal da PCR com o primer BKR
1B, 3B, 5B, 7B, 9B, 10B, 11B, 12B, 13B, 14B, 15B, 16B, 17B, 18B, 19B, 20B, 21B, 22B, 23B, 24B, 25B, 26B, 27B, 28B, 29B, 30B, 31B, 32B, 33B, 34B, 37B, 38B, 40B, 42B, 43B, 44B, 45B, 46B, 47B, 49B, 50B	+
2B, 4B, 6B, 8B, 24B, 19B, 36B, 39B, 41B, 48B	-

* - Não foi obtido produto de amplificação quando usado os “primers” específicos para *B. tropica* (R1).

+ = presença do produto de PCR do tamanho esperado; - = ausência do produto de PCR do tamanho esperado.

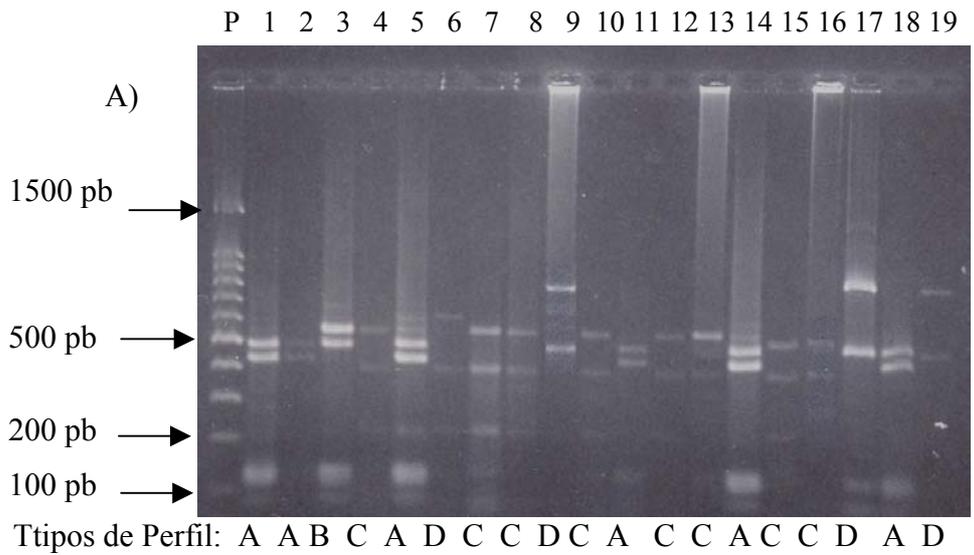
3) Análise de Diversidade genética dos Isolados Bacterianos Através da Técnica de ARDRA

a) Isolados caracterizados como pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* .

Foi obtido um produto de aproximadamente 1500 pares de bases (dados não apresentados) após a reação de amplificação pela técnica de PCR do gene 16S DNAr para os 55 isolados bacterianos caracterizados como *Herbaspirillum* e para as estirpes tipo usadas como referência. O tamanho do fragmento (~1500pb) corresponde ao relatado por YOUNG et al, (1991) que desenhou os “primers” utilizados para amplificar praticamente todo o gene.

Os perfis de restrição dos produtos de amplificação por PCR geraram 15 bandas polimórficas e 8 perfis de restrição distintos. A enzima *AluI* foi a que produziu maior número de bandas (8) e que apresentou maior poder discriminatório gerando 6 perfis distintos, enquanto que *MspI* produziu oito bandas, 5 perfis distintos (Figura 6).

A Tabela 9 apresenta os tipos de perfis eletroforéticos associados a cada um dos isolados bacterianos segundo a Figura 6.



Legenda: P - Padrão, marcador de marcador 100 bp ladder (Promega), 1 – Z67, 2- M4, 3- 84b, 4 a 19 - isolados 1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 9H, 10H, 12H, 13H, 24H, 27H, 30H, 31H, 34H, 35H, 55H, respectivamente.

Figura 6 – Perfis de restrição dos fragmentos amplificado da região 16S DNAr das estirpes tipo Z67 (*H. seropedicae*), M4 (*H. rubrisubalbicans*), 84b (*H. frisingense*) e dos isolados bacterianos caracterizados como *Herbaspirillum. MspI* (A) e *AluI* (B).

Tabela 9 -Perfil de restrição da região 16S DNAr dos isolados bacterianos caracterizados como *Herbaspirillum* spp., após a digestão com as enzimas *Msp*I e *Alu*I e tipos de agrupamento gerados pela técnica de ARDRA.

Estirpes e Isolados Bacterianos	Perfis de Restrição		
	<i>Msp</i> I	<i>Alu</i> I	Tipos de Perfis
Z67	A*	A	1
M4	A	A	2
84b	B	B	3
2H, 6H, 7H, 8H, 12H, 14H a 23H, 25H, 26H, 27H, 28H, 29H, 33H, 37H, 38H, 39H, 40H, 50H, 51H, 52H, 53H, 54H, 56 a 64H	A	A	1
35H	A	B	2
30H, 31H, 32H, 36H, 52H	C	A	4
24H	C	B	5
1H, 3H, 4H, 5H, 10H, 11H, 13H	C	C	6
9H, 34H, 55H	D	D	7

* As letras representam o tipo de perfil gerado por cada enzima segundo a **Figura 6**.

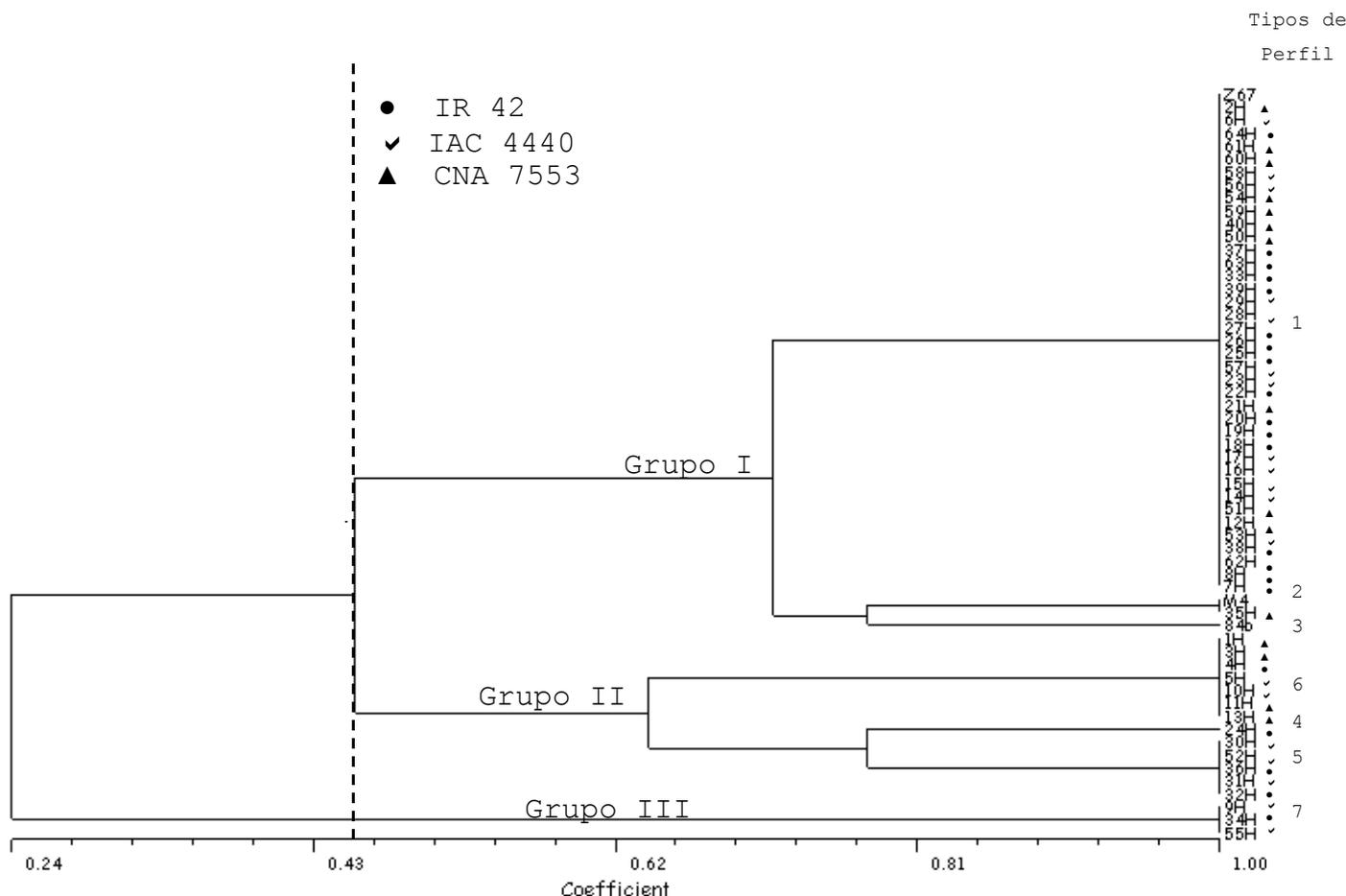


Figura 7 - Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtidos através da técnica de ARDRA de 55 isolados bacterianos caracterizados como pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* obtidos de três cultivares de arroz (CNA 7553, IR 42 e IAC 4440) e três estirpes de referência (Z67, M4 e 84b). Nível de similaridade aproximado de 22%.

A análise do dendrograma mostra que todos os isolados que amplificaram com os “primers” específicos para *H. seropedicae* foram similares (100%) a estirpe tipo da espécie (Z67) (Figura 7).

Os dados apresentados no dendrograma para o primeiro e segundo grupos corroboram com os resultados obtidos por CRUZ et al. (2001), que observaram tipos diferentes de perfis de restrição definidos pela técnica de ARDRA para as espécies *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*. A baixa diversidade intra-específica mostrada no primeiro grupo também está de acordo com resultados obtidos por RODRIGUES (2003) e BRASIL (2001), os quais usaram a técnica de ARDRA para estudar a diversidade de isolados bacterianos caracterizados como *Herbaspirillum* em plantas de arroz e capim forrageiro. REIS Jr (2002) e AZEVEDO (1998) também utilizaram a mesma técnica, nesse caso, para agrupar isolados caracterizados como *A. amazonense* obtidos de plantas de arroz, sorgo e milho e *Brachiaria* e também observaram baixa diversidade entre os isolados.

A técnica de ARDRA pode ser usada para separar isolados ao nível de gênero e espécie. BRASIL (2001), diferenciou isolados bacterianos caracterizados como *Azospirillum* de isolados bacterianos caracterizados como *Herbaspirillum*. CRUZ et al

(2001) diferenciou isolados caracterizados como *Herbaspirillum* separando-os de isolados bacterianos caracterizados como *Burkholderia* spp.

O dendrograma mostra que os isolados caracterizados e agrupados como *H. seropedicae* apresentam baixa diversidade intraespecífica. Esses dados corroboram com os dados descritos por CRUZ et al., 2001, BRASIL (2001), RODRIGUES (2003) e SOARES – RAMOS (2003) que verificaram a formação de um único grupo para a espécie de *H. seropedicae* através da técnica de ARDRA.

Estudos utilizando a técnica de ARDRA a partir da região 16S DNAr em *Gluconacetobacter diazotrophicus* (GUEDES, 2004), *A. amazonense* (AZEVEDO, 1998, REIS Jr, 2002; BRASIL 2001) mostraram a baixa diversidade intraespecífica dessas bactérias. No entanto, foi verificado que é possível verificar uma maior diversidade dentro da espécie *A. amazonense* quando é analisado o gene 23S DNAr e a região intergênica 16-23S DNAr (AZEVEDO 1998; REIS Jr., 2002). Segundo RUIZ et al. (2000), devido a alta variabilidade no tamanho e nas seqüências presentes no espaço intergênico das bactérias, esta região não é adequada na identificação de espécies devido a falta de padronização dos perfis entre as estirpes. Dessa maneira a região flanqueada pelos primers específicos para *H. seropedicae* (1440/HS) desenhados a partir da região hipervariável da 23S DNAr foi seqüenciada a fim de ser obtida maiores informações sobre a diversidade intraespecífica dos isolados bacterianos identificados como pertencentes a espécie *H. seropedicae*.

O dendrograma do perfil de restrição apresentado nesse estudo indica que os isolados agrupados no segundo e terceiro grupos podem pertencer a gêneros ou espécies diferentes das usadas para efeitos comparativos. Para testar esta hipótese, o gene 16S DNAr dos isolados bacterianos 5H, 10H, 13H, 55H, 34H, 4H, 3H, 31H, 24H, 7H e 27H, foi seqüenciada, a fim de obter resultados mais conclusivos sobre a identidade desses isolados bacterianos.

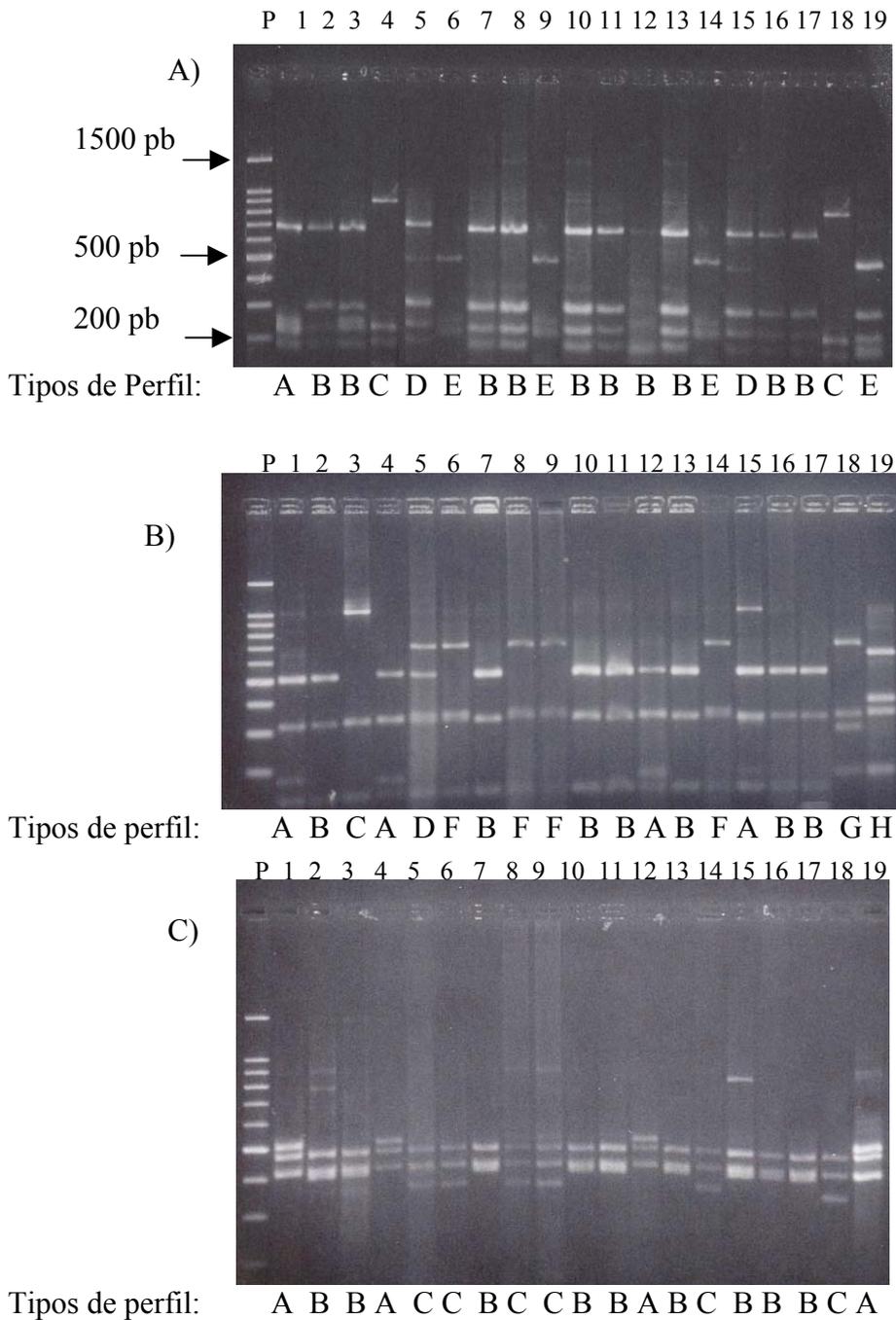
b) Isolados caracterizados como *Burkholderia* spp.

Os isolados bacterianos caracterizados como pertencentes ao gênero *Burkholderia*, assim como os isolados caracterizados como pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* apresentaram produto de amplificação da região 16S DNAr de aproximadamente 1450 pb. A restrição desse produto de PCR gerou 28 bandas polimórficas e 19 perfis distintos. As enzimas *AluI* e *HinI* apresentaram o mesmo número de bandas, dez cada uma, e *RsaI* 8 bandas. *AluI* foi a enzima com maior número e perfis polimórficos (8) e com maior poder discriminatório seguida da *HinI* (7) e *RsaI* (4). Os perfis gerados pelas enzimas podem ser visualizados na Figura 9. Na Tabela 10 encontra-se o tipo de perfil gerado para cada isolado bacteriano caracterizado como *Burkholderia* spp., bem como o tipo de grupo formado no dendrograma de similaridade.

Tabela 10 - Perfil de restrição do produto de amplificação da região 16S DNAr dos isolados bacterianos caracterizados como *Burkholderia* spp., após a digestão com as enzimas *AluI* e *HinfI* e os tipos de agrupamento gerados pela técnica de ARDRA

Estirpes e Isolados Bacterianos	Perfis de restrição			Tipos de perfis
	<i>AluI</i>	<i>HinfI</i>	<i>RsaI</i>	
M130	A*	A	A	1
Kp23	B	B	B	2
Ppe8	B	C	B	3
TVV75	C	A	A	4
40B	A	A	A	1
1B, 5B, 9B, 10B, 11B, 12B, 13B, 14B, 16B, 17B, 18B, 20B, 22B, 23B, 26B, 27B, 28B, 29B, 30B, 31B, 32B, 35B, 37B, 38B, 42B, 46B, 47B, 49B, 50B	B	B	B	2
19B	B	A	A	5
15B, 21B, 33B, 34B, 36B, 43B, 44B, 45B,	B	A	B	6
3B, 7B	B	C	A	7
25B	D	B	B	8
2B	D	D	C	9
4B, 6B, 8B, 24B, 48B	E	E	C	10
39B	C	F	C	11
41B	E	G	A	12

* As letras representam o tipo de perfil gerado por cada enzima segundo a Figura 7



Legenda: P (Padrão, marcador 100 bp ladder, Promega), 1 – M130, 2- Kp23, 3- Ppe8, 4- TVV75, 5 a 19 - isolados 2B, 4B, 5B, 1B, 6B, 10B, 11B, 19B, 23B, 24B, 25B, 33B, 38B, 39B, 41B, respectivamente.

Figura 8 – Perfis de restrição dos fragmentos amplificados da região 16S DNAr das estirpes M130 (*B. brasiliensis*), Kp23 (*B. kururiensis*), Ppe8 (*B. tropica*) TVV75 (*B. vietnamiensis*) e dos isolados bacterianos caracterizados como *Burkholderia* spp. *AluI* (A), *HinfI* (B) e *RsaI* (C).

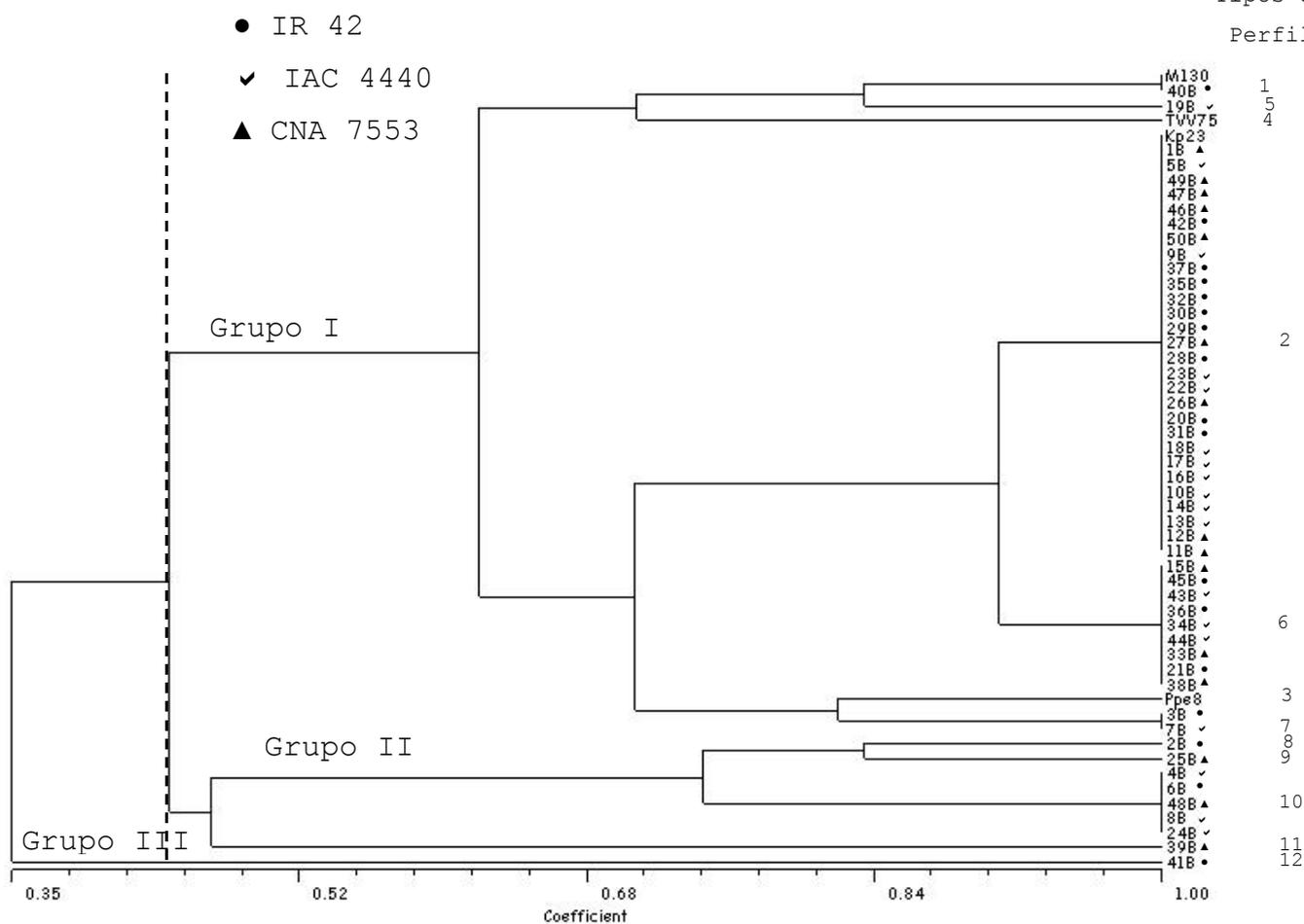


Figura 9 - Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtidos através da técnica de ARDRA de 50 isolados bacterianos caracterizados como pertencentes ao gênero *Burkholderia* e obtidos de três cultivares de arroz (CNA 7553, IR 42 e IAC 4440) e quatro estirpes tipo (M130, KP23, Ppe8 e TVV75). Nível de similaridade aproximado de 27%.

O dendrograma de similaridade, para os isolados bacterianos caracterizados como *Burkholderia* spp. apresenta três grupos distintos conforme a Figura 9. No primeiro grupo se encontram os isolados que apresentaram produto de amplificação quando utilizados “primers” BKTK/BKR específicos para *B. kururiensis*. Nesse grupo pode ser observado a formação de subgrupos, com 70% de similaridade, tal resultado corrobora com os encontrados por RODRIGUES (2003), que encontrou a formação de subgrupos dentro do grupo formado pelas estirpes M130 e Kp23. Nos segundos e terceiros grupos estão aqueles isolados que não apresentaram produto de amplificação quando utilizados esses mesmos “primers”. Esses isolados podem pertencer a gêneros e espécies diferentes. As novas espécies diazotróficas de *Burkholderia* *B. unamae* e *B. tropica* foram identificadas primeiramente através da técnica de ARDRA por CABALLERO-MELADO et al. (2004) e REIS et al. (2004). O método também foi capaz de distinguir as espécies de *Burkholderia* do complexo de *B. cepacia*, porém não discriminou todos os genótipos dentro do complexo (SEGONDS et al., 1999; FIORI et al., 2001). Esses dados mostram que a técnica de ARDRA é eficaz para a distinção e classificação das bactérias ao nível de espécie conforme demonstrado para as espécies de *Azospirillum* (FANI et al., 1995). Segundo COENYE & VANDAMME (2003) o conhecimento da diversidade dos membros do gênero indica que o nível de interações

entre essas bactérias e seus hospedeiros é muito complexa, diversa e frequentemente contraditória.

A região 16S DNAr dos isolados bacterianos 3B, 4B, 19B, 24B, 25B e 39B, os quais pertencem a diferentes grupos de similaridade foi seqüenciada para obtenção de dados mais refinados sobre a classificação desses isolados bacterianos.

4) Sequenciamento da região 16S DNAr dos isolados bacterianos

O gene 16S DNAr é o mais utilizado para estudos de comparações filogenéticas e taxonômicas em espécies de bactérias, devido a sua característica de universalidade, constância (tamanho da molécula de 1500 pb é constante para todas as bactérias) e funcionalidade que não é afetada por mudanças ambientais (WOESE, 1987) além de ser uma molécula com baixa homologia entre os reinos (WOESE & FOX, 1977). A seqüência nucleotídica desse gene apresenta regiões altamente conservada e regiões de variações o que permitia sua utilização para a análise e comparações filogenéticas (WOESE, 1987). Estes estudos permitiram a divisão dos organismos procariontes em Archeobactérias e Eubactérias.

As arqueobactérias são divididas de acordo com características fenotípicas em bactérias metanogênicas, halófitas e termófitas. O grupo das eubactérias foi dividido de acordo a posição e estrutura de duas hélices formadas no gene 16SDNAr, em alfa-proteobactéria, beta-proteobactéria, gama-proteobactéria e delta-proteobactéria (WOESE, 1987). A partir do seqüenciamento do gene 16S dos isolados bacterianos acima citados, estes puderam ser agrupados dentro do grupo das eubactérias se posicionando nos subgrupos descritos nas Figuras 10 e 12.

a) Isolados caracterizados inicialmente como *Herbaspirillum*

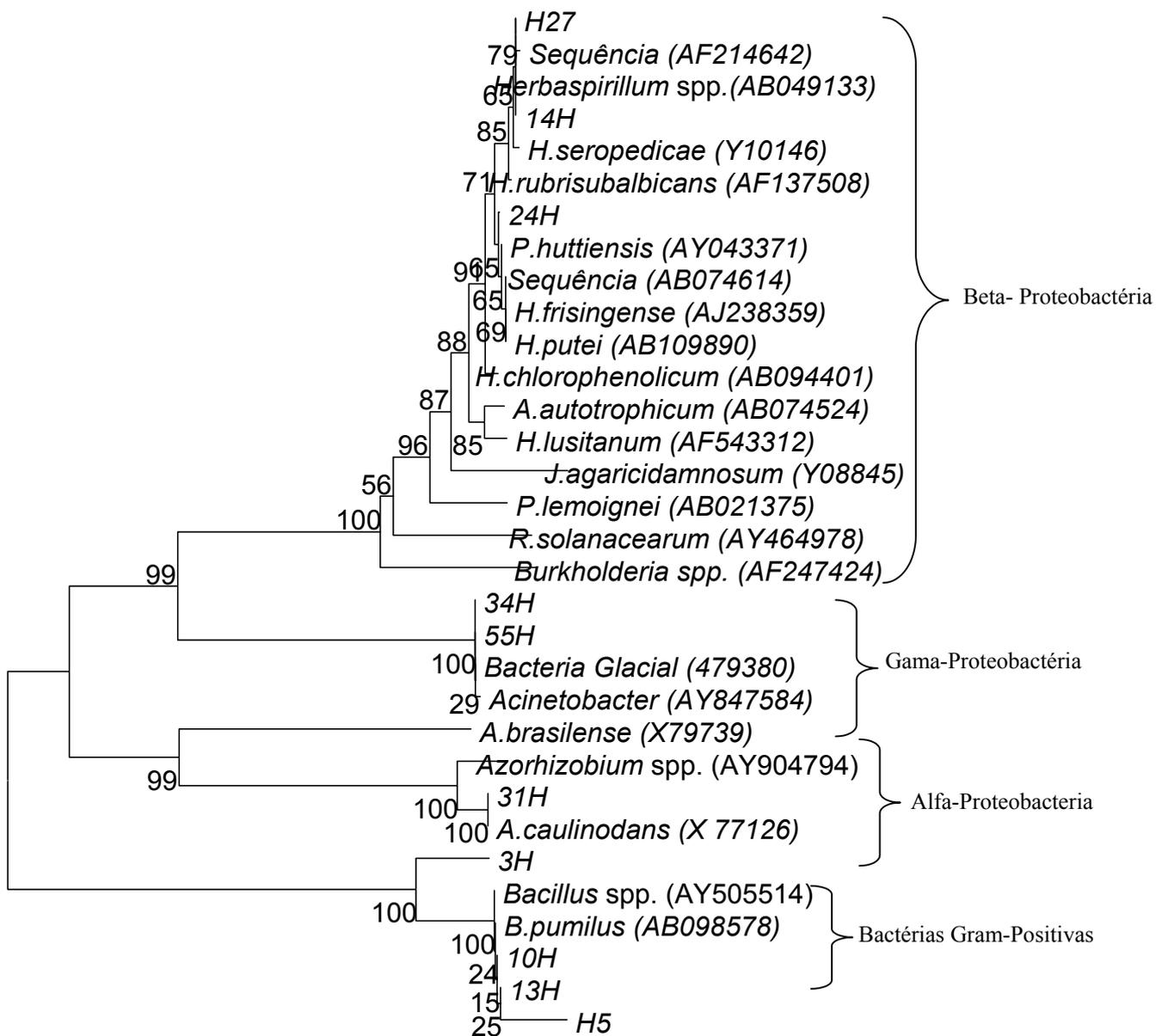
A análise filogenética utilizando a seqüência do gene 16S DNAr de 10 isolados bacterianos agrupados nos diferentes tipos na análise de ARDRA e comparados com as seqüências de diversas bactérias similares depositadas no GenBank (Figura 10) posicionou estas bactérias dentro de diferentes ramos da classe das Proteobacterias. Os isolados 14H, 24H, 27H, foram agrupados dentro do ramo das espécies de *Herbaspirillum* (Figura 10).

Os isolados 34 e 55H foram posicionados no ramo das bactérias do gênero *Acinetobacter* e com a seqüência de bactéria glaciais que ainda não foram cultivadas (Figura 10). *Acinetobacter* é um grupo de bactérias que pode ser considerada comopolita, ou seja já foi encontrada em todos ambientes, mas que apresenta uma taxonomia ainda confusa (TOWNER, 2000) e muitos indivíduos desse gênero apresentam identificação fenotípica um pouco complexa (GERNER-SMIDT et al., 1991).

Dentro do ramo das alfa-proteobactérias encontra-se o isolado 31H (Figura 10), o qual também apresentou a seqüência 16S homologa a espécie *Azohizobium caulinodulans*. No dendrograma de restrição este isolado foi agrupado no grupo III apresentando o tipo 8 de produto restrição (Figura 6), se diferenciando das espécies de *Herbaspirillum*. O *A. caulinodulans* tem sido frequentemente encontrado colonizando endofiticamente plantas de arroz (ENGLHARD et al., 2000; GILLIS et al., 1995, KIRCHHOF et al., 1997).

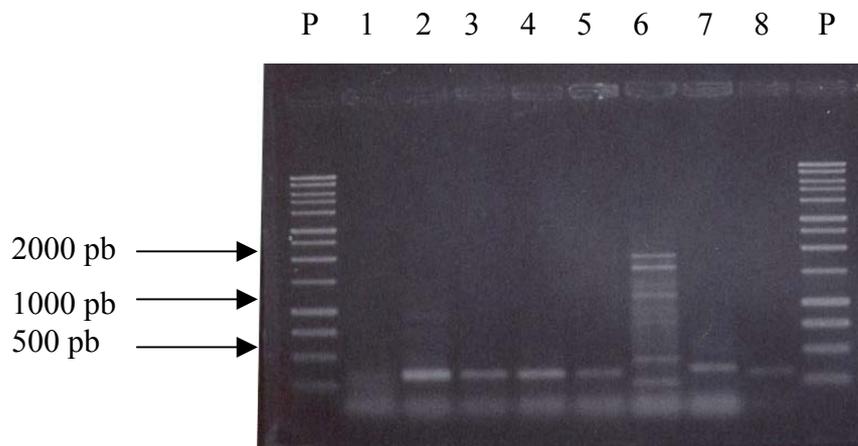
Os isolados 3H e 5H, 10H e 13H foram agrupados no mesmo ramo dos Bacilos (Figura 10) e também se diferenciaram no dendrograma de restrição (Figura 7). Muitas bactérias do gênero *Bacillus* foram encontradas colonizando a rizosfera de gramíneas e os dados mostram que algumas espécies como *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B.*

azotofixans (reclassificado como *Paenibacillus*) são capazes de fixar nitrogênio atmosférico (SELDIN et al., 1984, SPRENT, 1979). XIE et al (2003) isolou quarenta estirpes de *Bacillus* spp. e usando sondas específicas para o gene *nifH* e *nifHDKE* observaram que as mesmas apresentam os genes estruturais da enzima nitrogenase, porém não indica que possuem toda a estrutura para o funcionamento da nitrogenase. Produtos de amplificação usando “primers” específicos para o *nifH* (UEDA et al, 1995a) foram observados para os isolados 3H, 5H, 10H, 13H, 24H, 31H e 55H (Figura 10), indicando que os mesmos são potenciais candidatos a serem incluídos no grupo dos fixadores de nitrogênio. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar a hipótese levantada.



0.02

Figura 10 - Árvore filogenética pressuposta para as seqüências 16S DNAr de 11 isolados bacterianos obtidos neste estudo e microrganismos representativos das subclasses alfa e beta Proteobacteria e bactérias Gram-Positivas disponíveis no GenBank (número de acesso entre parênteses). A árvore foi construída pelo método de agrupamentos vizinhos (“neiborjoin”). A análise de bootstrap foi feita com 100 repetições.



Legenda: P- Padrão de peso molecular (1Kb Ladder – Promega), 1 – controle negativo (água), 3,4, 5, 6, 7, 8 – isolados bacterianos 3H, 5H, 10H, 13H, 24H, 31H e 55H, respectivamente.

Figura 11 – Perfil eletroforético do produto de amplificação da região flanqueada pelos primers nifHF e nifHR para os isolados bacterianos identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus* através da análise filogenética do gene 16S DNAr.

b) Isolados caracterizados inicialmente como *Burkholderia*

A região 16S DNAr de 6 isolados bacterianos caracterizados inicialmente como pertencentes ao gênero *Burkholderia* foi seqüenciada, as seqüências foram alinhadas e utilizadas para construção de uma árvore filogenética que pode ser visualizada na Figura 12. Os isolados 3B, 25B e 19B foram posicionados no mesmo ramo das espécies de *Burkholderia*. Porém o isolado 3B enquadra-se apenas dentro do gênero e não se posiciona próximo à espécie *B. kururiensis*. Este isolado o que apresentou produto de amplificação para os “primers” específicos da espécie, sugerindo que pode haver uma diversidade intraespecífica, como já pode ser observado no dendrograma da figura 6. O isolado 25B se posicionou no mesmo ramo da espécie *B. kururiensis*, confirmando os resultados obtidos na reação de PCR com “primers” específicos para *B. kururiensis*, porém diferiu do resultado encontrado para análise de ARDRA onde o mesmo isolado se enquadrou num subgrupo diferente da espécie em questão (Figura 7). O isolado 19B não apresentou produto de amplificação com o “primer” específico para *B. kururiensis* e no dendrograma originado da análise de ARDRA formou um grupo separado das espécies de *Burkholderia* (Figura 7). No entanto, este se posicionou no ramo da espécie *B. vietnamiensis* com valor 100 de “bootstrap” (Figura 12). Esse dado corrobora com as informações de GILLIS et al. (1995) e RODRIGUES (2003) que isolaram espécies de bactérias do gênero *Burkholderia* de raízes e parte aérea de plantas de arroz incluindo a espécie *B. vietnamiensis*.

Os isolados 4B e 24B agruparam-se dentro do ramo das espécies de *Herbaspirillum* (Figura 12). Os mesmos não apresentaram produto amplificação para os “primers” específicos para *B. kururiensis* e não foram agrupados no mesmo grupo da espécie na análise de ARDRA. Portanto, é possível que pertençam mesmo ao gênero *Herbaspirillum*.

Uma ramificação com valor de bootstrap igual 100 foi formada entre uma seqüência de bactéria não cultivada do grupo da gama-proteobactéria, a *Luteibactor rhizovicina* e o isolado 39B (Figura 12). Este isolado formou um grupo independente na análise de ARDRA e também não apresentou sinal de amplificação para os “primers” específicos para *B. kururiensis*. A espécie *Luteibactor rhizovicina* foi isolada da rizosfera de cevada, possui propriedades antibactericidas e antifúngicas, porém o nome da espécie ainda não foi validado. (JOHANSEN et al, seqüência AJ580499 submetido no banco NCBI, ano 2003).

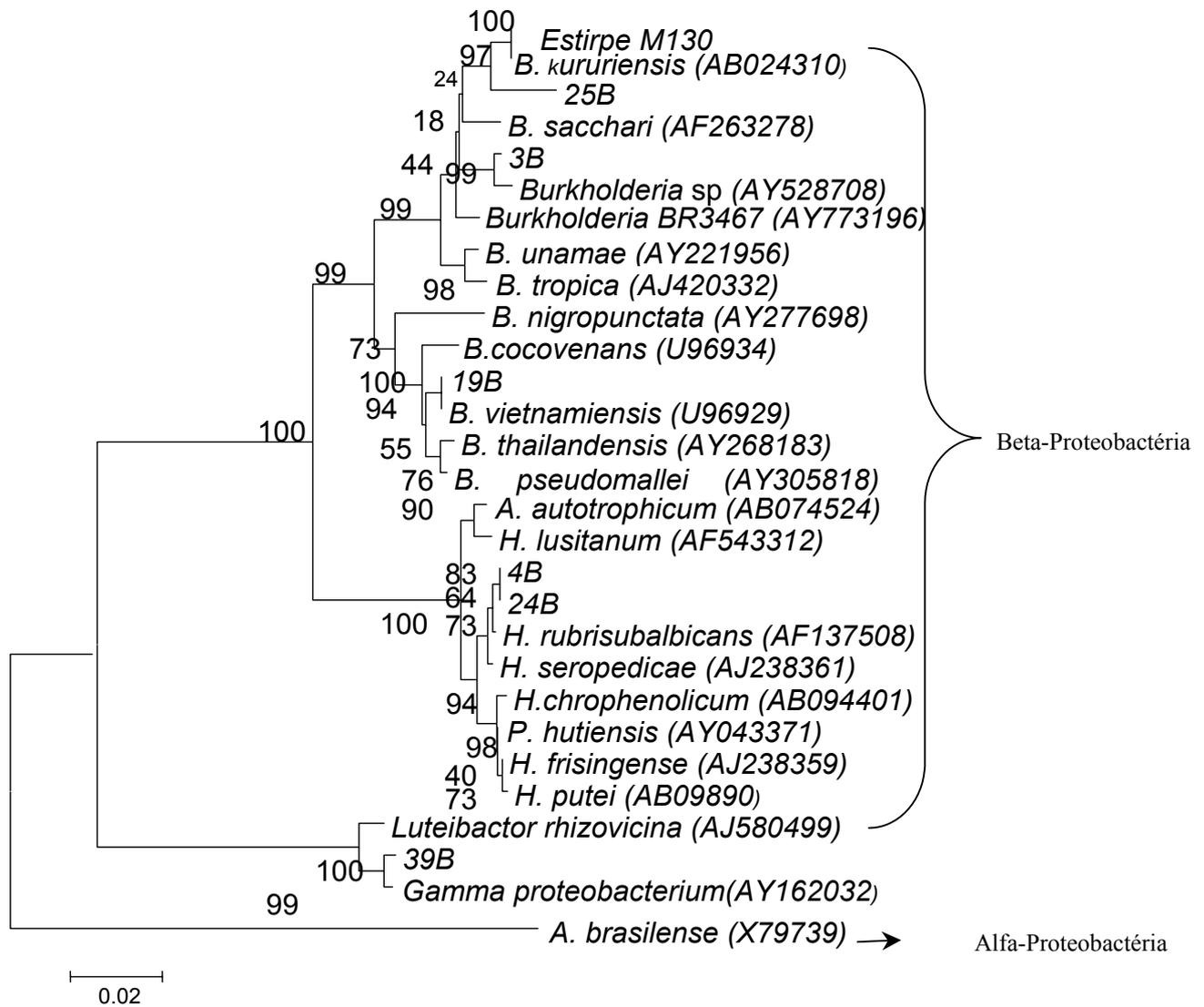


Figura 12 - Árvore filogenética pressuposta para as seqüências 16S DNAr de 9 isolados bacterianos obtidos neste estudo e microrganismos representativos das subclasses alfa e beta Proteobacteria disponíveis no GenBank (número de acesso entre parênteses). A árvore foi construída pelo método de “neiborjoin” (agrupamentos vizinhos). A análise de bootstrap foi feita com 100 repetições.

5) Sequenciamento da região 23S DNAr flanqueada pelos “primers” (1440/HS) específicos para *H. seropedicae*

A região flanqueada pelos “primers” específicos para *H. seropedicae* foi seqüenciada com o objetivo de verificar a diversidade intraespecífica de 37 isolados identificados como pertencentes a espécie.

Após o sequenciamento, os contigs foram analisados por BLASTn, porém não foi possível verificar nenhum depósito de seqüências 23S DNAr para essa espécie no banco de dados. Entretanto, foi observado uma homologia das seqüências com membros das espécies *Collimonas fungivorans* e *Ralstonia solanacearum* (Figura 13). Essas espécies pertencem ao mesmo grupo filogenético do gênero *Herbaspirillum* ou seja, são do grupo das beta proteobactérias, da família *Oxalobacteraceae* e da ordem *Burkholderiales* (www.ncbi.nlm.nih.gov). A espécie *Collimonas fungivorans* foi recentemente descrita por De BÔER et al (2004), segundo os autores a seqüência do gene 16S DNAr dessas espécies é 96 % similar ao das espécies de *Herbaspirillum*.

Apesar dos “primers” serem desenhados a partir de uma região hipervariável do gene 23S DNAr, não foi possível verificar diversidade intraespecífica após o alinhamento das seqüências obtidas (Figura 13). A única exceção foi o isolado 17H que apresentou quatro nucleotídeos diferentes (GGATGC) na posição 265 a 351 da região flanqueada pelos “primers” 1440/HS (Figura 14). As seqüências de nucleotídeos obtidas para essa região do gene serão depositadas no GenBank, ficando assim disponíveis para futuras análises de filogenias com outros microrganismos que possam ser isolados.

Sequences producing significant alignments:			Score	E
			(bits)	Value
gi 48428765 gb AY593480.1 	Collimonas fungivorans fosmid CF...		690	0.0
gi 17429991 emb AL646073.1 	Ralstonia solanacearum GMI1000 ...		615	e-173
gi 17429824 emb AL646072.1 	Ralstonia solanacearum GMI1000 ...		615	e-173
gi 17428340 emb AL646064.1 	Ralstonia solanacearum GMI1000 ...		615	e-173
gi 2828816 gb AF012419.1 AF012419	Ralstonia solanacearum st...		615	e-173
gi 2828813 gb AF012416.1 AF012416	Ralstonia solanacearum st...		615	e-173
gi 17431274 emb AL646081.1 	Ralstonia solanacearum GMI1000 ...		607	e-171
gi 2828817 gb AF012420.1 AF012420	Ralstonia solanacearum st...		599	e-168
gi 2828815 gb AF012418.1 AF012418	Ralstonia solanacearum st...		599	e-168
gi 2828814 gb AF012417.1 AF012417	Ralstonia solanacearum st...		599	e-168
gi 2828818 gb AF012421.1 AF012421	Ralstonia pickettii strai...		583	e-163
gi 5262799 emb Y18704.1 BNU18704	Burkholderia multivorans 2...		434	e-119
gi 5262802 emb Y18705.1 BVI18705	Burkholderia vietnamiensis...		410	e-111

Figura 13 – Resultado da análise utilizando por BLASTn comparando a seqüência flanqueada pelos “primers 1440/HS da estirpe tipo de *H. seropedicae* e isolados bacterianos identificados como pertencentes a essa espécie

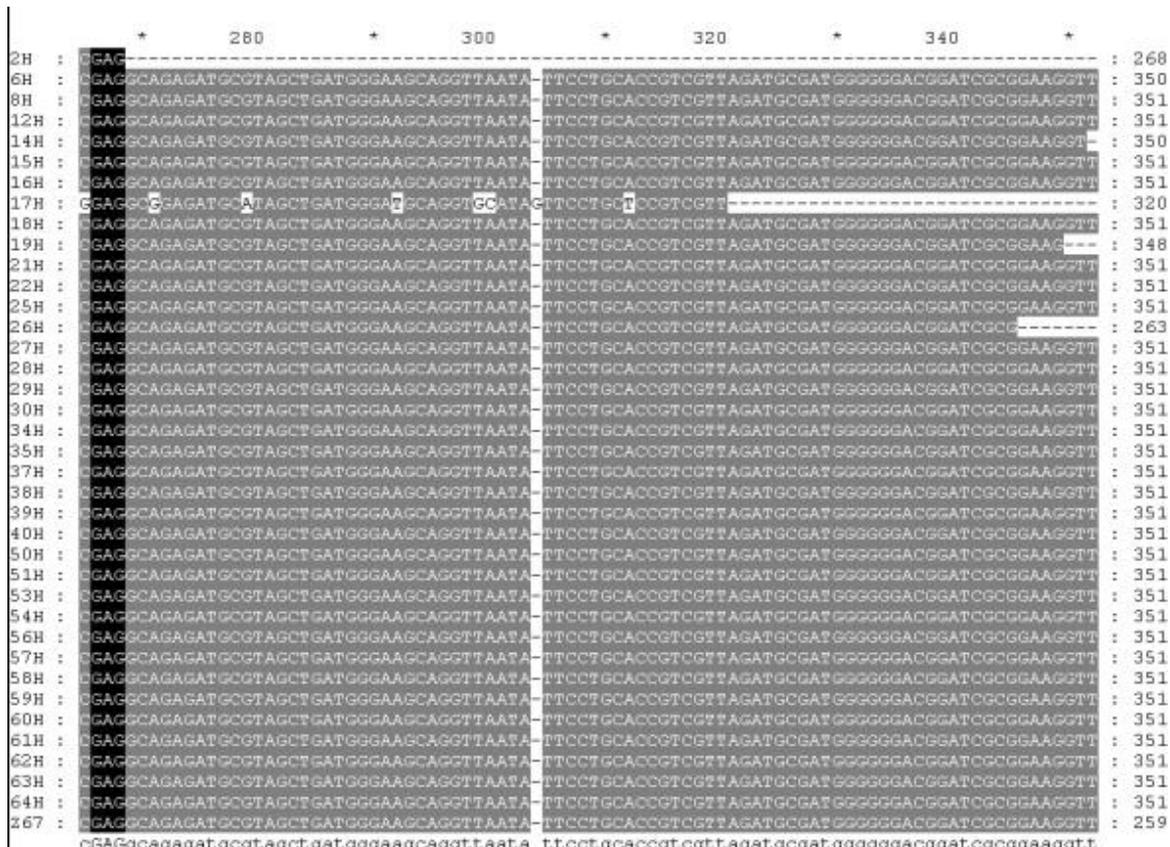


Figura 14 - Alinhamento da seqüência flanqueada pelos “primers” 1440/HS mostrando a região de 267 pb a 350 pb. Seqüência de 37 isolados bacterianos identificados como *H. seropedicae* e a estirpe de referência da espécie Z67. O Alinhamento foi feito por Clustal_W 1,8 software e editados no programa GeneDoc.

2.3.5 Análise polifásica dos isolados Bacterianos

O termo taxonomia polifásia foi empregado pela primeira vez por COLWELL (1970) que o utilizou para a delineação de taxa em todos os níveis. Nesse estudo foi utilizada a taxonomia polifásica para a classificação e identificação dos isolados bacterianos originados de plantas de arroz, uma vez que as informações fenotípicas e genotípicas desses isolados foram cruzadas gerando a Figura 11 e 12 para os isolados caracterizados como pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* spp., respectivamente.

Tabela 11 – Taxonomia polifásica dos isolados bacterianos originados das cultivares IR 42, IAC 4440 e CNA7553 e caracterizados fenotipicamente como pertencentes gênero *Herbaspirillum*.

Isolados bacterianos	Cultivar e parte da planta	Tipo de fenótipo	Informações genotípicas			
			“Primers”	ARDRA	Sequenciamento	
			1440/HS	Grupos	16S DNAr	Região da 23S DNAR
27H	IR 42 - Raiz	<i>Herbaspirillum</i> spp.	+	1	<i>Herbaspirillum</i> spp.	<i>C. fungivorans</i>
24 H	IR 42 - Raiz	<i>Herbaspirillum</i> spp.	-	5	<i>H. huttiensis</i>	NA
18, 19, 20, 37 (H)	IR 42 - Raiz	<i>Herbaspirillum</i> spp.	+	1	NA	<i>C. fungivorans</i>
4 (H)	IR 42 - Raiz	<i>Herbaspirillum</i> spp.	-	6	NA	<i>C. fungivorans</i>
32 (H)	IR 42 - Raiz	<i>Herbaspirillum</i> spp.	-	4	NA	NA
34H	IR 42 - Colmo	<i>Herbaspirillum</i> spp.	-	7	<i>Acinetobacter</i> spp.	NA
7, 8, 26, 38, 39, 64 (H)	IR 42 - Colmo	<i>Herbaspirillum</i> spp.	+	1	NA	<i>C. fungivorans</i>
22, 25, 33, 62, 63(H)	IR 42 - Folha	<i>Herbaspirillum</i> spp.	+	1	NA	<i>C. fungivorans</i>
36 (H)	IR 42 - Folha	<i>Herbaspirillum</i> spp.	-	4	NA	NA
10 (H)	IAC 4440 - Raiz	<i>Herbaspirillum</i> spp.	-	6	<i>Bacillus pumilus</i>	NA
15, 16, 28, 29, 56 (H)	IAC 4440 - Raiz	<i>Herbaspirillum</i> spp.	+	1	NA	<i>C. fungivorans</i>
30H	IAC 4440 Raiz	<i>Herbaspirillum</i> spp.	-	4	NA	NA
9H	IAC 4440 - Raiz	<i>Herbaspirillum</i> spp.	-	7	NA	NA
14 (H)	IAC 4440 - Colmo	<i>Herbaspirillum</i> spp.	+	1	<i>H. seropedicae</i>	NA
6, 23, 58H	IAC 4440 Colmo	<i>Herbaspirillum</i> spp.	+	1	NA	<i>C. fungivorans</i>
5H	IAC 4440 - Colmo	<i>Herbaspirillum</i> spp.	-	6	<i>Bacillus pumilus</i>	NA
31H	IAC 4440 - Colmo	<i>Herbaspirillum</i> spp.	-	4	<i>A. culinodans</i>	NA
52 H	IAC 4440 - Colmo	<i>Herbaspirillum</i> spp.	-	4	NA	NA
17, 53, 57 (H)	IAC 4440 - Folha	<i>Herbaspirillum</i> spp.	+	1	NA	<i>C. fungivorans</i>
2, 12, 40, 54, 59 (H)	CNA 7553 - Raiz	<i>Herbaspirillum</i> spp.	+	1	NA	<i>C. fungivorans</i>
3, 11, 13 (H)	CNA 7553 - Raiz	<i>Herbaspirillum</i> spp.	-	6	<i>Bacillus pumilus</i>	NA
1H	CNA 7553 - Raiz	<i>Herbaspirillum</i> spp.	-	6	NA	NA
35, 60H	CNA 7553 - Colmo	<i>Herbaspirillum</i> spp.	+	1	NA	<i>C. fungivorans</i>
21, 51, 61 (H)	CNA 7553 - Folha	<i>Herbaspirillum</i> spp.	+	1	NA	<i>C. fungivorans</i>

Legenda: + = presença do produto de PCR do tamanho esperado; - = ausência do produto de PCR do tamanho esperado; NA, não se aplica (Produto de PCR não seqüenciado).

Tabela 12 – Taxonomia polifásica dos isolados bacterianos originados das cultivares IR 42, IAC 4440 e CNA7553 e caracterizados fenotipicamente como pertencentes gênero *Burkholderia*.

Isolados bacterianos	Cultivar e parte da planta	Tipo de fenótipo	Informações genóticas		
			“Primers”	ARDRA	Sequenciamento
			BKTF/BKR	Grupos	16S DNAr
20, 28, 30, 31 (B)	IR 42 - Raiz	<i>Burkholderia</i> spp.	+	2	NA
40 B	IR 42 - Raiz	<i>Burkholderia</i> spp.	+	1	NA
29, 35, 37 (B)	IR 42 - Colmo	<i>Burkholderia</i> spp.	+	2	NA
2B	IR 42 - Colmo	<i>Burkholderia</i> spp.	-	10	NA
6B	IR 42 - Colmo	<i>Burkholderia</i> spp.	-	11	NA
25B	IR 42 - Colmo	<i>Burkholderia</i> spp.	+	8	<i>B. kururiensis</i>
21B	IR 42 - Colmo	<i>Burkholderia</i> spp.	+	6	NA
3B	IR 42 - Folha	<i>Burkholderia</i> spp.	+	7	<i>Burkholderia</i> spp.
32, 42B	IR 42 - Folha	<i>Burkholderia</i> spp.	+	2	NA
36B	IR 42 - Folha	<i>Burkholderia</i> spp.	-	5	NA
5, 13, 16, 17, 22 (B)	IAC 4440 - Raiz	<i>Burkholderia</i> spp.	+	2	NA
7B	IAC 4440 - Raiz	<i>Burkholderia</i> spp.	+	7	NA
43B	IAC 4440 - Raiz	<i>Burkholderia</i> spp.	+	6	NA
14, 23, 44 (B)	IAC 4440 - Colmo	<i>Burkholderia</i> spp.	+	2	NA
4B	IAC 4440 - Colmo	<i>Burkholderia</i> spp.	-	11	<i>Herbaspirillum</i> spp.
19B	IAC 4440 Colmo	<i>Burkholderia</i> spp.	+	5	<i>B. vietnamiensis</i>
9, 10, 18 (B)	IAC 4440 - Folha	<i>Burkholderia</i> spp.	+	2	NA
24B	IAC 4440 - Folha	<i>Burkholderia</i> spp.	-	11	<i>Herbaspirillum</i> spp.
1, 11, 12, 38 (B)	CNA 7553 - Raiz	<i>Burkholderia</i> spp.	+	2	NA
25B	CNA 7553 - Raiz	<i>Burkholderia</i> spp.	+	8	NA
33B	CNA 7553 - Raiz	<i>Burkholderia</i> spp.	+	6	NA
48B	CNA 7553 - Raiz	<i>Burkholderia</i> spp.	-	11	NA
15, 26, 37, 46, 49B	CNA 7553 - Colmo	<i>Burkholderia</i> spp.	+	2	NA
34B	CNA 7553 - Colmo	<i>Burkholderia</i> spp.	+	6	NA
27, 47, 50B	CNA 7553 - Folha	<i>Burkholderia</i> spp.	+	2	NA
41B	CNA 7553 - Folha	<i>Burkholderia</i> spp.	-	12	NA

Legenda: + = presença do produto de PCR do tamanho esperado; - = ausência do produto de PCR do tamanho esperado; NA, não se aplica (Produto de PCR não sequenciado)

Através da análise polifásica muitos microrganismos diazotróficos têm sido classificados e identificados, e muitas novas espécies de bactérias foram descobertas, como por exemplo, as novas espécies de *Burkholderia* e *Herbaspirillum* já comentadas na revisão de literatura. E ainda, esta nova taxonomia permite a comparação de vários isolados colocando dentro de grupos que apresentam as mesmas características fenotípicas e genotípicas.

3. CONCLUSÕES

1. Foram isolados um total de 168 bactérias as quais foram agrupadas através de características morfológicas em 4 gêneros: *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Azospirillum* e *Sphingomonas*;
2. Foram obtidos maiores números de isolados da cultivar de arroz IR42 (61), seguido da IAC 4440 (55) e CNA 7553 (47);
3. A raiz foi a parte da planta que originou um maior número de isolados caracterizadas como *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. (44), seguida do colmo (36) e da folha (25);
4. A utilização dos “primers” específicos para *Herbaspirillum seropedicae* permitiu distinguir 16 isolados, os quais não apresentaram produto de amplificação do tamanho esperado de 390 pb para a espécie;
5. O uso dos pares de “primers” BKTF/BKR e BKTF/R1, possibilitou a identificação e a discriminação das estirpes tipo das espécies *B. kururiensis* e *B. tropica*, e também dos isolados bacterianos objeto desse estudo;
6. A análise dos perfis polimórficos gerados pela técnica de ARDRA permitiu agrupar os isolados caracterizados como *Herbaspirillum* em três grandes grupos, porém apresentou pouca diversidade entre os isolados bacterianos;
7. A análise dos isolados caracterizados como pertencentes ao gênero *Burkholderia* mostrou-se mais diverso que o de *Herbaspirillum*, com a formação de vários subgrupos;
8. O sequenciamento de algumas bactérias mostraram a ocorrência de isolados distribuídos nos ramos de bactérias Gram positivo e negativo dentro das subclasses alfa, beta e gama Proteobactérias.

**CAPÍTULO 2- AJUSTE DA TÉCNICA DE PCR COM “PRIMERS” QUE
FLANQUEIAM A REGIÃO DOS GENES *NIF* HD PARA A DETECÇÃO DE
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM PLANTAS DE ARROZ**

RESUMO

Brasil, Marivaine da Silva. **Ocorrência e Diversidade Genética de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Variedades de Arroz RJ**: Seropédica: UFRRJ, 2005. 105 pp. (Tese de Doutorado em Fitotecnia).

O objetivo deste estudo foi desenhar novos “primers” que flanqueiam a região codificadora do operon *nif* HDK visando detectar, pela técnica de PCR, a presença de bactérias diazotróficas endofíticas em amostras de DNA extraídas do tecidos de plantas de arroz, assim como, avaliar a diversidade de bactérias diazotróficas sem a necessidade de isolamento das mesmas. Foram desenhados quatro novos “primers” (*nifH*, D1, D2, e *nifK*) a partir de seqüências dos genes depositados no GenBank. A reação de PCR foi otimizada com as combinações dos pares de “primers” *nifH*/D1, D1/D2 e D1/*nifK* e o DNA extraído da estirpe referência de *H. seropedicae* (Z67). Produtos do tamanho esperado foram obtidos e dessa forma foram estabelecidos os protocolos para a reação de PCR para as combinações de “primers” acima. Os “primers” *nifH*/D1 foram testados em amostras de DNA extraído das estirpes referência de *H. frisingense* (84b), *B. kururiensis* (Kp23), *B. tropica* (Ppe 8), *B. vietnamiensis* (TVV75), *A. amazonense* (Y2), *A. lipoferum* (Sp59), *G. diazotrophicus* (Pal 5) e *A. brasilense* (Sp7). Foi observado um produto do tamanho esperado (1422 pb) para as 6 estirpes testadas (Sp7, Sp59, Y2, Ppe 8, Z67 e 84b) e produtos de amplificação de tamanho menor para as estirpes TVV75 e Pal 5. A reação de PCR se mostrou bastante eficiente para as estirpes de *Herbaspirillum* testadas e para a estirpe Sp59 de *A. lipoferum*, porém as estirpes M130 e Ppe 8 apresentaram produtos inespecíficos os quais diminuíram em condições mais restritivas de reação. Não foi possível sequenciar os produtos de PCR dessas bactérias com os “primers” desenhados já que são degenerados. A utilização dessa mesma combinação de “primers” para a detecção de bactérias diazotróficas a partir do DNA extraído do colmo de arroz das variedades IR 42 e IAC 4440 possibilitou a obtenção de produtos de PCR do tamanho esperado, porém a qualidade do produto foi ruim. O produto de PCR foi clonado no vetor pGEM T- easy e a clonagem desses produtos foi confirmada por PCR com os “primers” T7 e SP6 para amplificação do fragmento. Foi observado o produto de PCR para os clones obtidos de amostras de colmo da cultivar IR 42. Para os clones obtidos das amostras da cultivar IAC 4440 foi possível amplificar dezoito potenciais clones dessas amostras foram parcialmente seqüenciados e os resultados mostraram que quatro dos clones apresentaram identidade de cerca de 95% com seqüências de bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum*. Um maior número de amostras de tecidos das planta necessita ser analisado visando determinar a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas que colonizam o arroz.

Palavras – Chave: Diversidade, Sequenciamento, Bactérias diazotólicas

ABSTRACT

Brasil, Marivaine da Silva. **Occurrence and genetic diversity of endophytic diazotrophic bacteria associated with rice varieties RJ**, Seropédica: UFRRJ, 2005. 105 pp. (Thesis of Doctorate in crop Science).

The objective of this study was to design new pairs of primers flanking the *nifH*-D region as well as to optimize the PCR reaction aiming to detect nitrogen-fixing bacteria in DNA extracted from rice plant tissues with no requirement of bacterial isolation. Four new set of primers (*nifH*, D1, D2, and *nifK*), based on the sequences deposited in the GenBank, were designed. The PCR reaction was optimized for the set of primers *nifH*/D1, D1/D2 and D1/*nifK* using DNA extracted from the reference strain *H. seropedicae* (Z67). Product of the expected size was obtained and the protocols for PCR reaction using the combination of primers above were established. The primers *nifH*/D1 were tested with DNA extracted from the reference strains of *H. frisingense* (84b), *B. kururiensis* (Kp23), *B. tropica* (Ppe 8), *B. vietnamiensis* (TVV75), *A. amazonense* (Y2), *A. lipoferum* (Sp59), *G. diazotrophicus* (Pal 5) and *A. brasilense* (Sp7). A product of the expected size (1422 pb) was observed for 6 strains (Sp7, Sp59, Y2, M130, Ppe 8, Z67 and 84b) and smaller size products amplification of for the strains TVV75 and Pal 5. The PCR reaction was very efficient for the *Herbaspirillum* strains and for the strain Sp59 of *A. lipoferum*,. However, the strains M130 and Ppe 8 showed unspecific products which decreased with more stringent conditions. However it was not possible to sequence the products of PCR of these reference strains with the *nif* primers since their are degenerated. The use of the same combination of primers to detect diazotrophic bacteria of DNA extracted from colm of the varieties rice IR 42 and IAC 4440 showed PCR products of the expected size, however the quality of the product was poor. These products were cloned and analyzed with by PCR with the primers T7/SP6, directed to the multi site restriction region of the cloning vector pGEM-T easy. PCR products were detected for clones derived from DNA samples extracted from colm of cultivar IR42. However, the quality of the products was very poor and therefore no sequencing could be performed. In contrast, the efficiency of the PCR reaction was very high for samples from the cultivar IAC4440. Eighteen clones were partially sequenced and the results showed that four of them presented around 95% of identity with sequences of diazotrophic bacteria of the genus *Herbaspirillum*. A much higher number of tissue samples need to be analyzed envisaging to determine the population of endophytic diazotrophic bacteria colonizing rice .

Keywords: Diversity, Sequencing, Diazotrophic bacteria

4. INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é uma característica inerente a algumas bactérias, as quais possuem todo o aparato genético para essa função. As proteínas envolvidas no processo de fixação biológica de nitrogênio são codificadas por um conjunto de genes denominados *nif*. Esses genes codificam um complexo de proteínas enzimáticas responsáveis pela FBN denominada nitrogenase. Os principais genes desse aparato enzimático é o *nifHDK* que codificam as subunidades estruturais da enzima nitrogenase, no entanto para que esta funcione são necessários outros conjunto de genes que codificam proteínas relacionadas com a regulação da expressão desses genes.

Os genes *nif* juntamente com os ribossomais apresentam uma história evolucionária bastante antiga e ambos tem sido utilizados para a avaliação da diversidade estrutural e funcional de bactérias fixadoras de nitrogênio. Esses genes podem melhorar o entendimento dos estudos filogenéticos para esse grupo de bactérias e ainda diferenciar os membros dessa classe de genes.

O presente capítulo apresenta o ajuste da técnica de PCR, utilizando “primers” desenhados a partir das conservadas do gene *nifHDK* a fim de verificar a diversidade de bactérias diazotróficas associadas a diferentes variedades de arroz.

O objetivo deste capítulo foi:

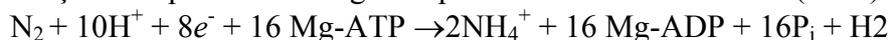
- Desenhar “primers” para a região codificadora do operon *nifHDK* visando o uso pela técnica de PCR;
- Avaliar a aplicação da técnica de PCR com os “primers” desenhados no estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas;
- Aplicar a técnica de PCR com os “primers” para os genes *nif H-D* no estudo da ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas em tecidos de plantas de arroz.

4.1 REVISÃO DE LITERATURA

4.1.1 O processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN)

A FBN é um dos processos mais importantes para manutenção da vida terrestre (ODUM, 1983), uma vez que o nitrogênio é o elemento químico mais requerido para as principais vias biossintéticas dos aminoácidos e dos nucleotídeos (LEHNINGER, 2002). A FBN é componente fundamental do ciclo de nitrogênio, fornecendo este elemento contido na atmosfera e compensando as perdas em decorrência de processos como, volatilização de amônia e da desnitrificação (DIXON & KAHN, 2004).

A forma estável e molecular diatômica (N_2 ou $N\equiv N$) do nitrogênio é a mais abundante na atmosfera. Esta conformação encarece, em termos energéticos, a fixação biológica de nitrogênio, porque uma grande quantidade de energia é necessária para quebrar a ligação tríplice, e assim tornar este elemento solúvel e biologicamente assimilável na forma de amônia (NH_3) ou amônio (NH_4^+) (SIQUEIRA & FRANCO, 1988). A amônia pode ser produzida industrialmente através da submissão da mistura de N_2 e H_2 a altas temperaturas (400 a 500 °C) e pressões (35 a 100 Mpa), onde são necessárias a queima de cerca de 1,3 Megagrama de combustível fóssil para fixar um Megagrama de nitrogênio. Os seres procariotos são os únicos organismos terrestres capazes de converter metabolicamente o nitrogênio atmosférico em formas químicas úteis para os organismos vivos (LEHNINGER, 2002). O processo pode ser sintetizado através da reação estequiométrica sugerida por SIMPSON & BURRIS (1984):



A enzima nitrogenase é o fator chave da biofixação de nitrogênio, pois catalisa a divisão do nitrogênio. Essa enzima pode também reduzir o acetileno em etileno, fornecendo assim uma maneira conveniente de se medir indiretamente a fixação de nitrogênio onde quer que ela esteja ocorrendo (SPRENT & SPRENT, 1990). Esse método aliado ao uso do marcador isotópico ^{15}N abriu novos caminhos nas técnicas de medição, as quais está revelando que a capacidade de fixar nitrogênio é bem difundida entre os microrganismos autotróficos e heterotróficos (BODDEY et al., 2004).

A capacidade de fixar nitrogênio pode ser encontrada em quase todos os grupos filogenéticos de bactérias, incluindo bactérias sulfurosas, firmibactéria, actinomicetos, cianobactérias e todas as divisões de Proteobactérias (DIXON & KAHN, 2004). Estes microrganismos podem viver livres no solo ou na água, associadas a plantas (colonizando a superfície ou o interior de folhas, caules) e aos intestinos dos animais. Podem ser anaeróbicos, aeróbicos e anaeróbicos facultativos. A Figura 15 mostra uma visão geral dos grupos de bactérias diazotróficas encontradas no ambiente.

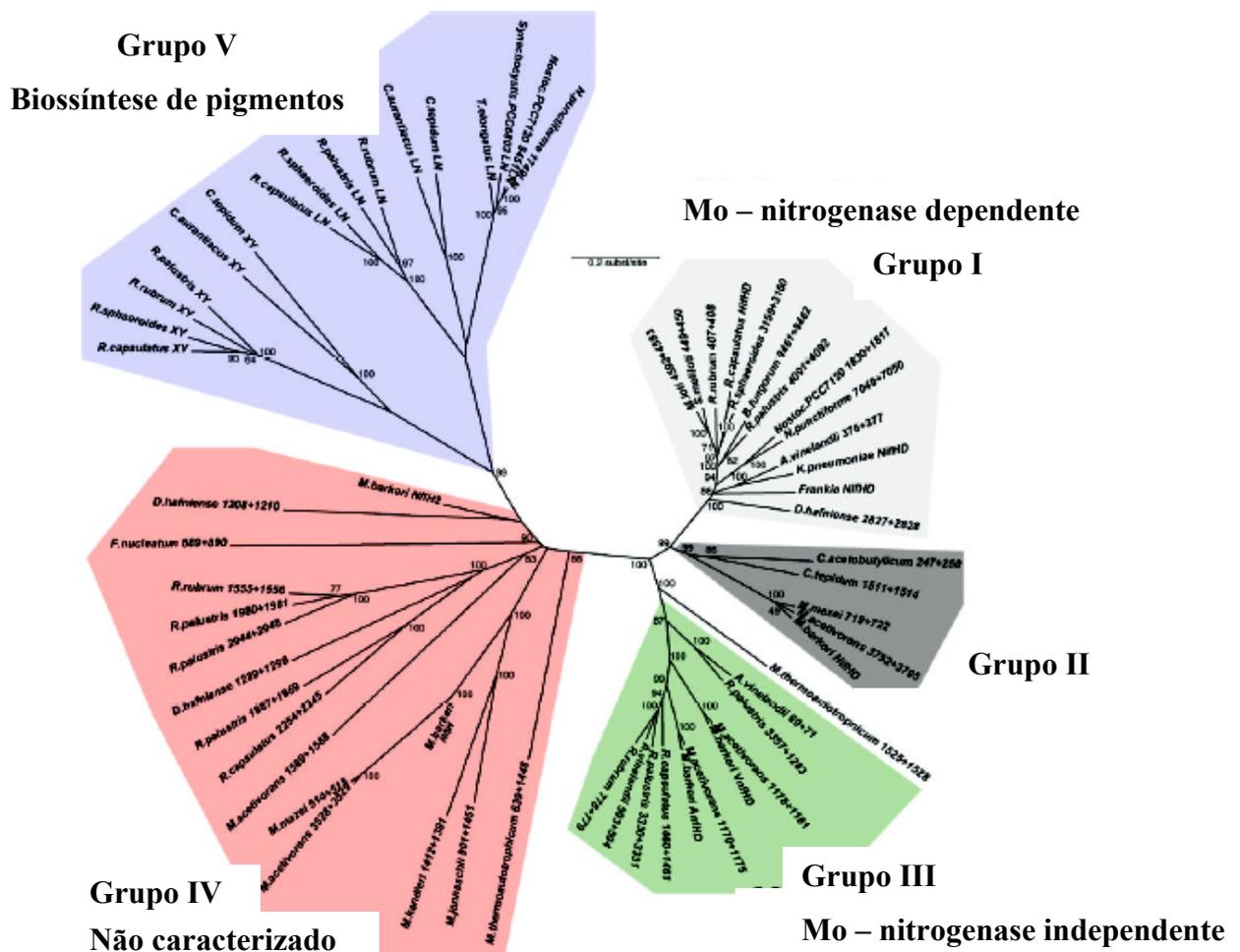


Figura 15 – Visão geral dos cinco principais grupos filogenéticos de bactérias fixadoras de nitrogênio baseado nas seqüências dos genes estruturais da enzima nitrogenase conforme descrito por RAYMOND et al. (2004).

Todos os procariontes diazotróficos possuem a enzima nitrogenase. Como a enzima é sensível ao oxigênio, cada microrganismo desenvolveu uma estratégia diferente para livrar-se do excesso de oxigênio, seja produzindo goma, aumentando a taxa de respiração, procurando sítios onde a tensão de oxigênio é baixa, ou até mesmo induzindo o hospedeiro a produzir substâncias que combinam com o oxigênio como, por exemplo, a leghemoglobina produzida em nódulos de leguminosas (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

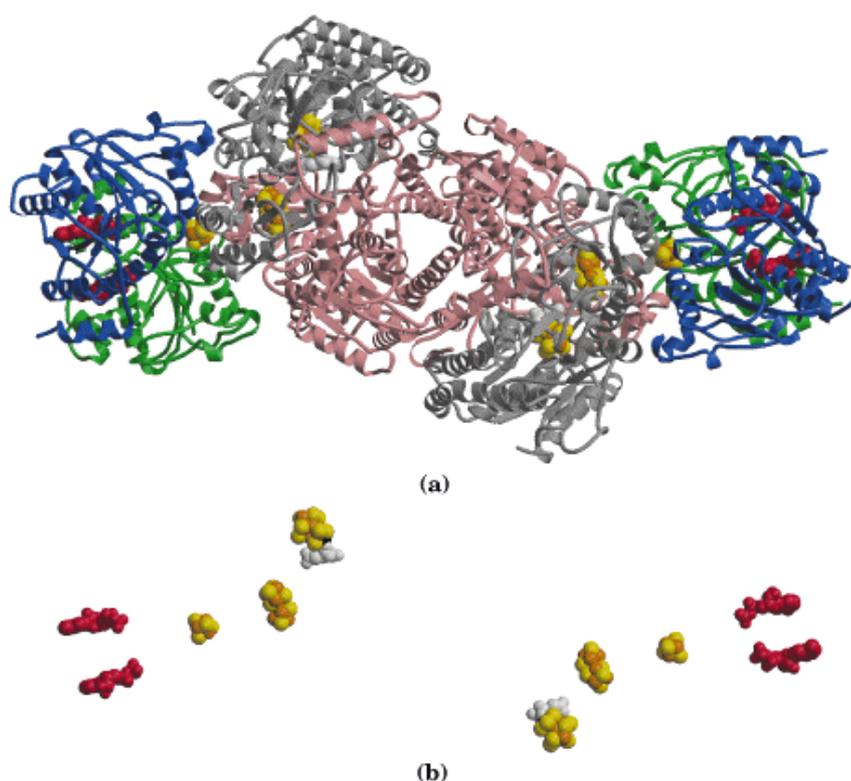
Um tipo de nitrogenase tolerante ao oxigênio foi observado em *Streptomyces thermoautotrophicus*. Este microrganismo é quimiolitotrófico termófilo e portanto a bioquímica desse tipo de sistema pode ser diferente do que normalmente é encontrado na maioria dos microrganismos diazotróficos (RIBBE et al., 1997).

4.1.2 A enzima nitrogenase

A nitrogenase compreende um complexo de proteínas preservado durante a evolução (RAYMOND et al., 2004). As duas componentes principais desse complexo são as duas metalo-proteínas, dinitrogenase redutase e a dinitrogenase que apresentam

estruturas e características mecânicas conservadas (LEHNINGER, 2002; DIXON & KAHN, 2004).

A dinitrogenase redutase ou ferro-proteína é um dímero com peso molecular de 57 a 72 kDa, com duas subunidades idênticas o agrupamento 4Fe-4S sendo a ponte que liga as duas subunidades sensível ao oxigênio (DIXON & KAHN, 2004). Este centro funciona como ATP/ADP dependente e doador de elétrons para a dinitrogenase ou MoFe-proteína, (REES & HOWARD, 2000). A subunidade maior heterotetrâmica (α_2 e β_2) do complexo enzimático é a dinitrogenase ou MoFe-proteína, a qual contém o centro catalítico. Seu agrupamento redox apresenta um total de dois molibdênios, 32 ferros e 30 enxofres por tetrâmero (REES & HOWARD, 2000). Essa proteína contém dois tipos de centro redox: O agrupamento P composto de 8Fe-7S e o grupamento M ou cofator FeMo, S9-homocitrato que é o sítio de redução do substrato (SEEFELDT et al., 2004) (Figura 16).



Legenda: a) As fitas em cinza e rosa são as subunidades MoFe-proteína e as em azul e verde são as subunidades Ferro-proteína. b) Complexos e cofatores da FeMo-proteína, o ADP está em vermelho, Mo em preto, hemocitrato em cinza claro, átomos de Fe em alaranjado e S em amarelo.

Figura 16 – Enzima e cofatores do complexo da nitrogenase (LEHNINGER, 2002).

A fixação de nitrogênio é realizada por uma forma altamente reduzida da FeMo-proteína e requer 8 elétrons (6 para a redução do N_2 , 2 para a produção de uma molécula de H_2). A redução dessa proteína é feita através da transferência de elétrons da Fe-proteína. Os oito elétrons são transferidos (1 por vez) a cada ciclo, quando a Fe-proteína que já está reduzida (esta pode ser reduzida por uma ferredoxina ou flavodoxina do sistema da célula) se liga a um dos dois sítios de ligação para a FeMo-proteína e quando a Fe-proteína se encontra oxidada se dissocia da FeMo-proteína que se encontra agora reduzida (SCHINDELIN et al., 1997). A formação desse complexo tem um papel

crucial no mecanismo enzimático, porque essa conformação é requerida para o acoplamento, hidrólise de ATP e finalmente a transferência interna de elétrons na FeMo-proteína do grupamento P para o grupamento M que se encontra ligado ao substrato (N₂) (DIXON & KAHN, 2004). O papel do ATP nesse caso é catalítico tanto a ligação do ATP quanto a sua hidrólise produzem mudanças conformacionais na proteína o que é uma entrada de energia livre que ajuda na transferência de elétrons (LEHNINGER, 2002).

Todo o microrganismo diazotrófico possui o sistema enzimático molibdênio-ferro proteína da nitrogenase, mas em condições onde há baixo conteúdo de molibdênio alguns organismos podem produzir sistemas alternativos de nitrogenase contendo vanádio-ferro ou ferro-ferro como cofatores (BISHOP et al, 1980, EVANS & BURRIS, 1992). Essas nitrogenases já foram encontradas em *Azotobacter vinelandii*, *Anabaena variabilis*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* (LOVELESS & BISHOP, 1999). Acredita-se que existe uma semelhança estrutural e funcional entre os tipos de nitrogenases, baseada no fato de que os fatores Fe-V e Fe-Fe são capazes de substituir o cofator Fe-Mo, sugerindo que estes últimos elementos não são indispensáveis para a redução do nitrogênio (LUDDEN et al., 1998).

4.1.3 Genes codificadores e reguladores da nitrogenase

As proteínas envolvidas no processo de fixação biológica de nitrogênio são codificadas por um conjunto de genes denominados *nif*. Esses genes foram descobertos após estudos da genética do processo de FBN em *Klebsiella pneumoniae*. Foi observado que os genes da fixação de nitrogênio nessa bactéria ocupam uma região de aproximadamente 25 kb, apresentando-se num total de 20 genes (*nifA*, *nifB*, *nifD*, *nifE*, *nifF*, *nifH*, *nifJ*, *nifK*, *nifL*, *nifM*, *nifN*, *nifQ*, *nifS*, *nifT*, *nifU*, *nifV*, *nifX*, *nifY*, *nifW*, *nifZ*) organizados em 8 operons (ARNOLD et al., 1988, MERRICK, 1993).

A identificação e os estudos genéticos dos genes *nif* em *Klebsiella pneumoniae* permitiram comparações com outros diazotróficos como *Azotobacter*, *Rhodobacter*, *Enterobacter*, *Bradyrhizobium* entre outras (MERRICK, 1993). Através deste estudo observou-se que dos 20 genes *nif* identificados em *K. pneumoniae*, 14 são comuns na maioria das bactérias diazotróficas sugerindo que esse grupo de gene é necessário para a biossíntese da nitrogenase. A Figura 17 mostra esquematicamente os genes estruturais da enzima nitrogenase e seus principais reguladores.

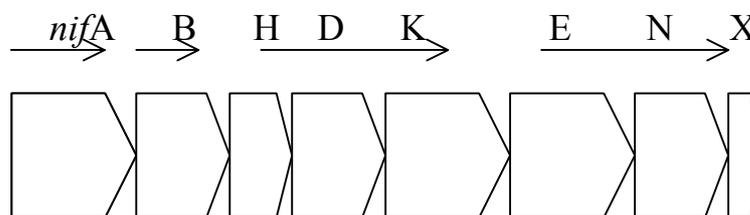


Figura 17 – Desenho esquemático do arranjo dos genes estruturais da enzima nitrogenase (*nifHDK*) e seus principais reguladores (*nifA*, *nifB*, *nifENX*).

Como foi descrito acima, os principais genes estruturais da enzima nitrogenase são HDK, porém para que a nitrogenase realmente se expresse são necessários a ação de genes reguladores, onde os principais são os *nifA*, *nifB*, *nifENX*. Entretanto, os grupos de genes *nifQ*, *nifS*, *nifT*, *nifU*, *nifV*, *nifX*, *nifY*, *nifW*, *nifZ*, também estão relacionados com a regulação da nitrogenase. O arranjo desses genes é comum para maioria das espécies de bactérias diazotróficas conhecidas (RAYMOND et al., 2004). A análise

estrutural é importante para o entendimento da fixação biológica de nitrogênio ao nível bioquímico e por revelar as relações genéticas entre os diferentes diazotróficos (POSTGATE & EADY, 1988).

A construção e regulação do complexo enzimático são altamente dispendiosas e envolve na ordem de 20 kb de DNA ou mais para codificar todas as proteínas requeridas para sua construção e funcionamento (ZEHER et al., 2003). Assim, a expressão da nitrogenase é altamente regulada ao nível que vai desde a transcrição (CHEN et al., 1998) à pós-tradução da proteína (KIM et al., 1999).

Segundo (DIXON & KAHN, 2004) a resposta regulatória, depende da interação dos diferentes elementos de regulação, que pode variar nos diferentes organismos, gerando uma plasticidade no sistema. Dessa maneira não é possível generalizar todos os sistemas regulatórios presentes nos diferentes microrganismos diazotróficos.

4.1.4 O uso de genes *nif* para a análise de diversidade de bactérias diazotróficas

A análise filogenética de bactérias através do uso dos genes ribossomais (16S e 23S DNAr) permitiu o agrupamento de diversos filotipos como por exemplo as betaproteobactérias, bem como a distribuição de genótipos individuais (ZHER et al., 2003). Através dessa ferramenta foi possível constatar que a maioria dos microrganismos cultivados não representa numericamente a abundância, e principalmente a diversidade de microrganismos no ambiente (BULL, 2000). Através de investigações que envolvam o uso dos genes ribossomais foram identificados muitos microrganismos dos mais variados habitats e com características bastante peculiares (RAPPE et al., 2002).

PACE et al (1986) desenvolveram um método para determinar a diversidade e a composição das espécies de bactérias utilizando os genes ribossomais que podem ser isolados diretamente de amostras ambientais. Embora tenha revolucionado a visão moderna da diversidade microbiana, a análise dos genes RNAr sozinha não permite ainda, um completo conhecimento sobre a ecologia microbiana e portanto não fornece informação definitiva sobre a biologia, fisiologia e função ecológica dos diversos microrganismos (ZHER et al., 2003).

A partir do início da década de 90 os genes *nif*HDK, que juntamente com os ribossomais também apresentam uma história evolucionária bastante antiga tem sido utilizados para a avaliação da diversidade estrutural e funcional de bactérias fixadoras de nitrogênio (RAYMOND et al., 2004). Esses estudos tem sido realizados graças ao sequenciamento e depósito desses genes, principalmente o *nif*H, em banco de dados (ZHER et al., 2003).

O gene *nif*H é um dos mais antigos genes funcionais existente e a árvore filogenética para esse gene é muito consistente com a filogenia para o gene 16S DNAr, (YOUNG, 1992) principalmente para os grupos alfa e gama proteobactérias (ZHER et al., 2003). Essa característica tem levado muitos cientistas a realizarem estudos de diversidade filogenética utilizando parte do gene *nif*H. Outros estudos tem sido realizados utilizando o *nif*D (UEDA et al, 1995 b, DEDYSH et al., 2004), porém pouco se sabe sobre a filogenia inerente ao mesmo, bem como sobre o gene *nif*K. Possivelmente, as poucas seqüências disponíveis no banco de dados têm limitado a análise e comparação filogenética (RAYMOND et al., 2004). Porém, esses genes podem fornecer um melhor entendimento nos estudos filogenéticos entre estirpes intimamente relacionadas como também, diferenciar melhor os membros da família dos genes *nif*. Os estudos de diversidade utilizando os genes *nif* tem sido feitos com amostras de DNA ou RNAm coletados no ambiente e “primers” degenerados desenhados principalmente para os genes *nif*H e *nif*D (POLY et al., 2001) e em reações

de cadeia da polimerase (PCR) ou Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase RT-PCR. Os amplicons que resultante são geralmente analisados através de outras técnicas de “fingerprinting” como o Gradiente de Desnaturação em Gel de Eletroforese (DGGE) (ROSADO et al., 1998; LOVELL et al., 2000; PICENO et al., 1999), análise do polimorfismo de restrição do fragmento terminal (T-RFLP) (OHKUMA et al., 1999, TAN et al., 2003), clonagem e sequenciamento (ZHER & MCREYNOLDS, 1989; UEDA et al., 1995a e b; ZANI et al., 2000; HAMELIN et al., 2002; HUREK et al., 2002; DEDYSH et al., 2004). Todos esses estudos contribuem para o aumento de seqüências depositadas no banco de dados e desta forma podem fornecer mais informações sobre a diversidade genética de bactérias diazotróficas presentes no ambiente.

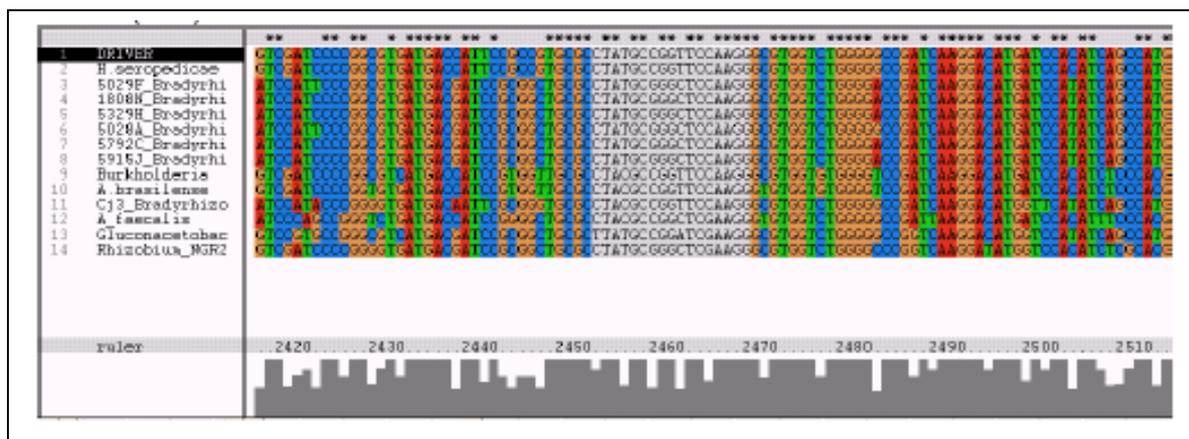
Todos os trabalhos acima citados utilizam “primers” degenerados e desenhados a partir de regiões do gene *nifH* ou *nifD* que codificam seqüências de aminoácidos altamente conservados. A introdução de degeneração na sequencia dos “primers” permite ampliar consideravelmente a detecção de seqüências de microrganismos ainda não culturáveis. Aa maioria destes “primers” listados na literatura amplificam segmentos de DNA de até 500 pb, o que pode gerar resultados inconsistentes nos estudos de diversidade filogenética (BÜRGMANN et al, 2004). Diante do exposto, torna-se importante o desenho e avaliação de novos pares de “primers” que correspondem as regiões conservadas dos genes *nifHDK*, porém capazes de gerar produtos de amplificação de maior tamanho e conseqüentemente permitindo que a diversidade genética seja melhor avaliada. .

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

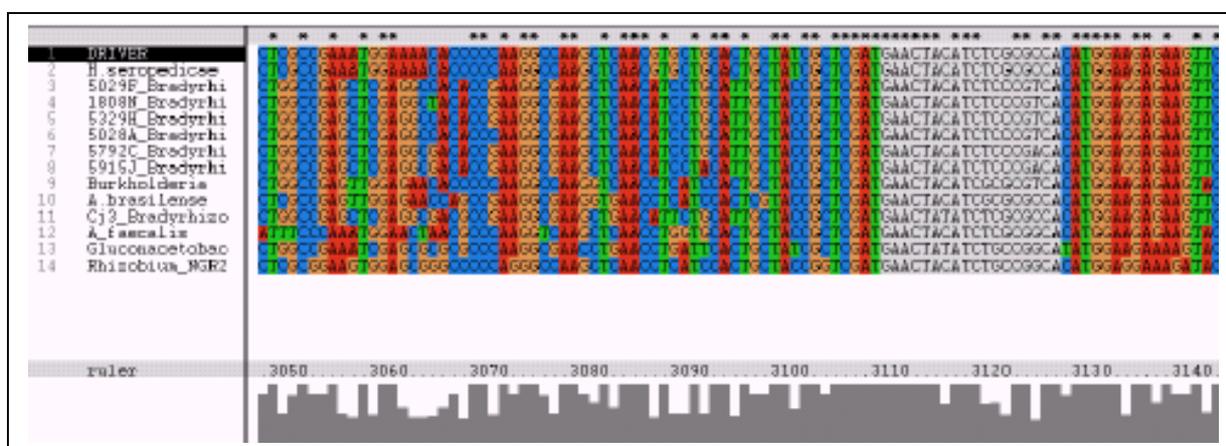
4.2.1 Desenho de “primers” que flanqueiam as regiões do *nifH-D*, *D* e *D-K*

Foram desenhados pares de “primers” para as regiões dos genes *nifHDK* a partir de seqüências do genes depositados no GenBank (National Center for Biotechnology information; www.ncbi.nlm.nih.gov). O programa usado para o alinhamento das seqüências foi o ClustalW. (THOMPSON et al., 1994) e o desenho dos primers contou com a colaboração do pesquisador Felipe Rodrigues da Silva (*Embrapa* Cenargen). Após o alinhamento, as regiões mais conservadas foram manualmente apuradas. As regiões selecionadas foram então analisadas por BLAST visando identificar seqüências de nucleotídeos homólogos as existentes no banco de dados do GenBank. Este procedimento foi repetido até se conseguir obter a melhor região para o desenho dos “primers”. Em seguida, alinhou-se essa seqüência dentro das grandes regiões e utilizando o programa “Generunner” foi feita a verificação da presença de “hairpins” (autopareamento das bases formando uma hélice em forma de grampo) e também foi verificada a temperatura de anelamento de cada par de “primer”. Considerando que os “primers” deveriam abranger também organismos com diferença na seqüência de DNA da região amplificada os “primers” foram sintetizados com bases degeneradas em determinados locais, ou seja, que podem corresponder a 2 ou 3 bases nitrogenadas. posições. As Figuras 18 e 19 mostram as regiões selecionadas para desenho de cada “primer”, local da degeneração, bem como o tamanho do fragmento que poderá ser gerado após a amplificação pela técnica de PCR.

A

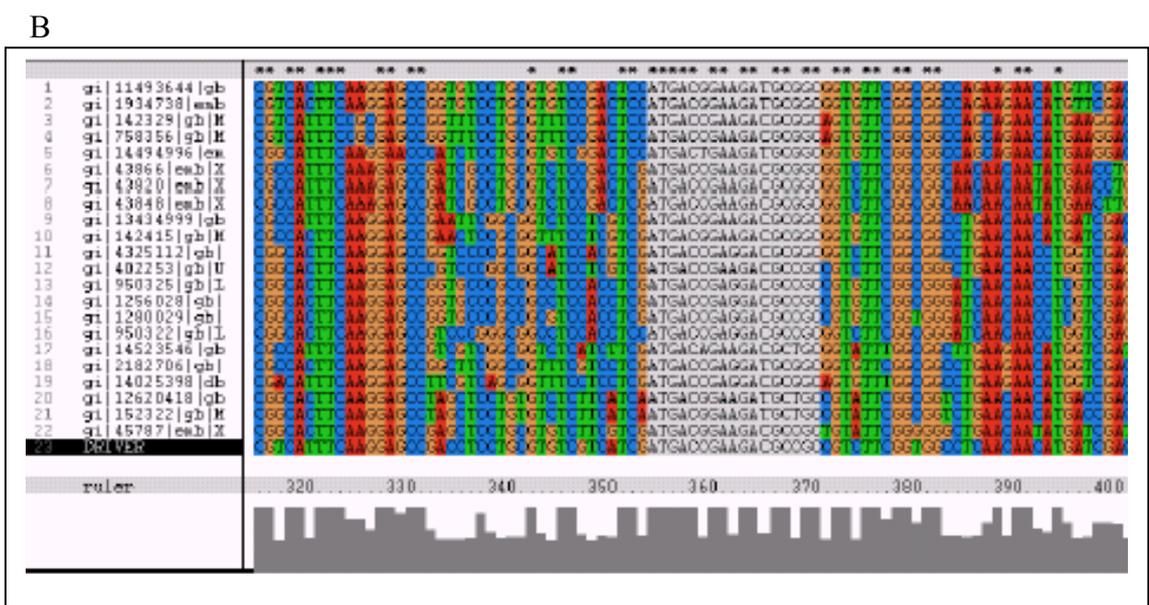
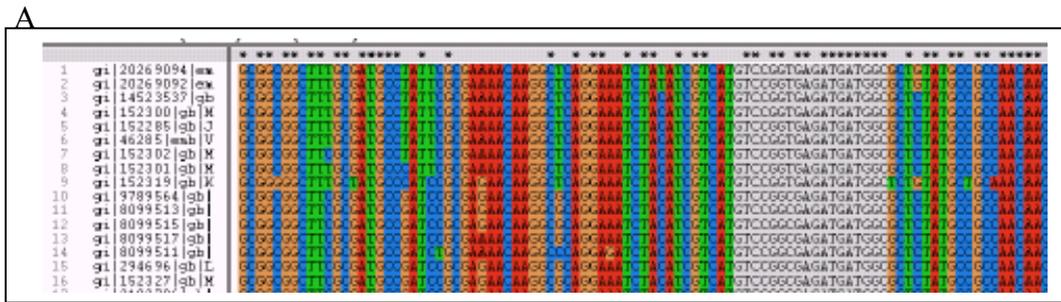


B



Legenda: A) “Primer” D1 (61,8°C, 1804-1821) 5'-CCTATGCCGGTTCCAAGG. B) Primer D2 3'-TGGCGCGAGATGTAGTTC (57,7 °C, 2476-2459). Amplificam 673 pares de bases, de 1804 a 2476 da seqüência gi|1495468| do GenBank. Degenerações: D1 5'- CCTAYGCCGGTTCCAAGG ou CCTA(T/C)GCCGGTTCCAAGG (58,6° C), D2 3'-TGGCGCGMGATGTAGTTC ou TGGCGCG(A/C)GATGTAGTTC (54,7 °C).

Figura 18– Alinhamento de diferentes seqüências da região do gene *nifD* de diversas bactérias diazotróficas e escolha da região para o desenho dos pares de “primers”:



Legenda: A) *nifH* 5'-GTCCGGCGAGATGATGGC (1020-1037 do gi|1495468|, 64,6 °C) B) *nifK* 3'-GGCGGCTCTTCGGTCAT (3542-3525 do gi|1495468|, 67 °C). Amplificam 2522 pares de base do operon, contendo as regiões intergênicas. Degenerações: *nifH* 5'-NTCNGGYGARATGATGGC ou NTCNGG(C/T)GA(G/A)ATGATGGC (40 °C), *nifK* 3'-NGCNGCRTCYTCNGTCAT ou NGCNGC(A/G)TC(T/C)TCNGTCAT.

Figura 19– Alinhamento de diferentes seqüências da região dos genes *nifH* e *nifK* de diversas bactérias diazotróficas e escolha da região para o desenho dos pares de “primers”:

A região flanqueada pelo par de “primers” *nifH*/D2 somam total de 1422 pb e a região flanqueada pelo par de “primers” D1/*nifK* soma um total de 1636 pb. A Figura 20 mostra didaticamente a região e o tamanho flanqueado por cada par de “primers”.

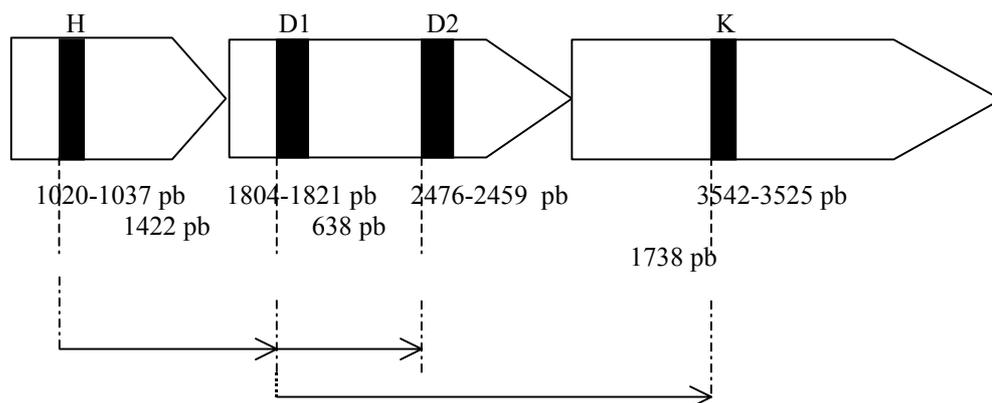


Figura 20 – Representação esquemática dos três genes *nifHDK* indicando os sítios flanqueados pelos quatro pares de “primers” *nifH*, *D1*, *D2*, e *nifK* usado no estudo e o tamanho estimado do produto de amplificação pela técnica de PCR.

4.2.2 Extração de DNA total das estirpes tipo de bactérias diazotróficas

Foi feita a extração de DNA total das seguintes bactérias diazotróficas: *Azospirillum brasilense* (Sp7^T), *A. lipoferum* (Sp59^T), *A. amazonense* (Y2^T), *Herbaspirillum seropedicae* (Z67^T), *H. frisingense* (84b^T), *Burkholderia tropica* (Ppe8^T), *B. vietnamiensis* (TVV75^T), *Burkholderia* spp. (M130). O protocolo utilizado foi adaptado de SAMBROK et al. (1989) conforme descrito abaixo:

As estirpes bacterianas foram crescidas por 16 h a 30 °C em tubos contendo 5 mL de meio dygs, após esse período, foi feita a coleta das células bacterianas por centrifugação a 520 G por 10 min a 4 °C e ressuspensas em 567 µL de tampão Tris-EDTA (T₁₀E₁). A esta suspensão foram adicionados 30 µL de solução de SDS 10% e 3,0 µL de Proteinase K (20mg/mL), em seguida incubados por 1h a 37°C. Decorrido esse período foram adicionados a solução 100 µL de NaCl 5M, e 80 µL de tampão de extração CTAB diluído em NaCl (1,4 M). A solução foi homogeneizada por inversão e incubada por 20 min a 65 °C. Em seguida a mesma foi deixada sob agitação suave durante 1h. Após esse período, à solução foram adicionados 1 volume de clorofórmio:álcool:isoamílico (24:1) e a solução foi incubada sob agitação suave durante 1h. Decorrido esse tempo a solução foi centrifugada a 16000 x g em centrífuga refrigerada por 10 min a 4 °C. Em seguida o sobrenadante foi transferido para novo tubo, onde foi feita a digestão do RNA com 5 µL de RNase 10mg/mL por 30 min a 37 °C. Após esse tempo, foram adicionados à solução 1 volume de Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico (25:24:1), esta foi centrifugada por 10 minutos a 1600 x g a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo onde foi adicionado Clorofórmio: Álcool Isoamílico (24:1) e após agitação, a solução foi centrifugado por 10 min a 16000 x g a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e o DNA foi precipitado com 0,6 volumes de isopropanol gelado, que foi centrifugado por 15 min a 1600 x g a 4 °C. O isopropanol foi retirado e o precipitado de DNA lavado com álcool 70% e submetido a centrifugação a 1600 x g por 10 min a 4 °C. O álcool foi retirado e o precipitado foi ressuspensado em 50 µL de T₁₀E₁. Todas as centrifugações foram realizadas em microcentrifuga refrigerada tipo Ependorf 5010R .

4.2.3 Extração de DNA de tecidos de plantas de arroz

As amostras de plantas utilizadas para a extração de DNA foram obtidas durante as coletas dos experimentos (ver capítulo 1) para todas as épocas amostradas. O protocolo proposto por FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998) foi utilizado para a extração de DNA de plantas de arroz conforme descrito abaixo:

150 mg de tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido, e a este foram adicionados 700 µL de tampão de extração CTAB (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20mM EDTA, 100 mM Tris e 1% β-mercapetanol). A solução foi incubada a 65 °C por 1h e após esse período os tubos ficaram em repouso para esfriar em capela de exaustão. Em seguida foram adicionados à solução 600 µL de clorofórmio álcool-isoamílico (24:1) e a mesma foi levada a centrifugação por 5 minutos a 1600 x g. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e a este foram adicionados 400 µL de isopropanol frio e em seguida incubado a -20 °C por 30 minutos. Após esse período a solução foi centrifugada a 1600 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e o precipitado foi lavado com 1 volume de etanol 70% gelado. O etanol foi retirado e precipitado foi submetido à secagem em capela de exaustão e ressuspenso em 25 µL de tampão TE (T₁₀E₁) contendo RNase (10 mg/mL), sendo a esta solução incubada a 37°C por 1h .

OBS: todas as amostras de DNA obtidas pelos três protocolos descritos acima foram armazenadas a -20 °C e também quantificadas em gel de agarose 1% através da comparação com quantidades (100 ng, 200 ng) conhecidas de DNA plasmidial. As amostras de DNA foram ainda quantificadas em espectrofotômetro com a leitura do DNA feita no comprimento de ondas de 260 nm. Todas as centrifugações foram realizadas em microcentrifuga refrigerada tipo Ependorf 5402R .

As amostras do colmo coletadas na época de florescimento dos cultivares IR 42 e IAC 4440 foram utilizadas para os estudos de ocorrência de bactérias diazotróficas via o uso da técnica de reação por PCR. As variedades foram escolhidas tendo em vista os estudos de quantificação da FBN realizado por CAMPOS (1999) que observou uma baixa contribuição da FBN na variedade IAC 4440 em contraste com a alta contribuição da FBN na variedade IR42. A escolha do colmo da planta assim como a época de coleta, foi baseada nos dados de literatura que indicam maiores populações de bactérias diazotróficas no colmo do que a raiz na época de florescimento de plantas de arroz (BALDANI, 1996; BARRAQUIO et al., 1997; RODRIGUES, 2003).

4.2.4 Otimização da reação de PCR para os pares de “primers” nifH/D2, D1/D2 e D1/nifK.

Segundo ROUX (1995), para uma ótima condição de reação de PCR são necessários a otimização de alguns parâmetros como a concentração de cloreto de magnésio, pH do tampão, condições de ciclagens e temperatura de anelamento dos “primers”.

Foi feito um experimento de reação por PCR com um gradiente de temperatura de anelamento (50 a 65 °C) para os “primers” nifH/D2, D1/D2. Foram usadas diferentes concentrações de DNA (50 e 10 ng/µL da estirpe Z67 de *H. seropedicae*) e cloreto de magnésio (2,5 mM e 3,75 mM), além da adição de substância adstringente como o tween, cuja função é diminuir a tensão entre as moléculas e a solução tampão (ROUX, 1995). Para os “primers” D1/nifK não foi utilizado o tween, e variou-se a concentração dos “primers” (0,2; 0,6; 1,2 e 1,8 µM) e as temperaturas de anelamento variaram entre 40 °C e 55 °C, estimada com base na T_m (temperatura na qual 50% dos “primers” estão anelados e 50% encontram-se dissociados do DNA molde) dos “primers” utilizados.

A temperatura inicial de anelamento foi de 50°C para os pares de “primers” nifH/D2 e D1/D2 enquanto que para o par D1/nifK foi de 40 °C. O gradiente de temperatura variou em 15 °C tendo as temperaturas de anelamento o tempo de 45 seg/ciclo. As condições de termociclagem foram: 1 etapa inicial de desnaturação (93 °C por 2 min.) seguido por 35 ciclos intermediários (93 °C por 45 seg., temperatura de anelamento por 45 seg.; 72 °C por 2 min) e 1 etapa final de extensão (72 °C por 5 min), e resfriamento a 4 °C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% em TAE 1X, a 65V após o tempo de corrida de 1,5 h. As bandas formadas no gel foram visualizadas após coloração com brometo de etídeo e exposição a luz ultravioleta e fotografadas com filme Polaroid tipo 667.

4.2.5 Clonagem do produto de amplificação por PCR com o par de “primers” nifH/D2 a partir de amostras de DNA extraídas de plantas de arroz

A clonagem do produto de PCR foi realizada de acordo com as seguintes etapas:

a) Preparo de células competentes

O método utilizado foi uma adaptação de SAMBROOK et al. (1989) e seguiu as condições descritas abaixo:

Uma colônia de bactéria da linhagem de interesse foi crescida em 5 mL de meio LB e incubada por 16 horas sob agitação de 200 rpm a 37 °C (fase estacionária). Após esse período os 5 mL da cultura foram inoculados em 500 mL de meio LB e incubados à 37 °C, sob agitação de 200 rpm, até que a cultura atingisse uma D.O._{600nm} entre 0,5 e 0,8. Assim que a cultura atingiu a D.O necessária, esta foi distribuída em 12 tubos tipo Falcon estéreis, de 50 mL cada, e acondicionados em gelo por 30 minutos. Após esse período a cultura foi submetida a duas centrifugações consecutivas a 130 G por 15 minutos a 4 °C. Após a primeira centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em um volume de 500 mL de água Mili-Q estéril e gelada na segunda centrifugação o precipitado foi ressuscitado em 250 mL de água Mili-Q estéril e gelada. Este foi levado a nova centrifugação a 3200 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 10 mL de glicerol 10% estéril e gelado. Este foi transferido para 2 tubos, e levado a centrifugação a 3200 x g por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 1 mL de glicerol 10%. Um volume de 42 µL destas células foi distribuído em microtubos para criogenia e estocadas a -70 °C até o momento de uso. Todas as centrifugações foram realizadas em microcentrifuga refrigerada tipo Ependorf 5402R .

- Verificação da competência das células

A competência das células foi verificada através da metodologia descrita abaixo: Em um microtubo foram adicionados 2 µL (10 µg) do plasmídeo comercial PUC 18 (Invitrogen) e mais 42 µL das células competentes. Em outro microtubo foram adicionados 2 µL de água estéril mais 42 µL das células competentes. Separadamente os conteúdos dos microtubos foram transferidos para duas cubetas de 0,1 cm de eletrodo da BIO-RAD, as quais foram submetidos a eletroporação no eletroporador “Eletros cell manipulator” 600 (BTX Electroporation System), com as seguintes condições de eletroporação: 1,8 kV (para cubetas de 0,1 cm), 25 µF, 200 ohms. Após o choque elétrico foram adicionados 1 mL de meio LB na cubeta o qual foi misturado e transferido para novos microtubos os quais foram incubados a 37 °C com agitação de 250 RPM por 1 hora. Após esse período foi feita diluições da cultura crescida em 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶ e 100 µL destas foram plaqueadas em meio LB com antibiótico específico,

além de X-gal e IPTG na concentração 0,5 mM e de 80 µg/mL respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas e após crescimento foi feito o cálculo da competência seguindo a seguinte equação: Fator de diluição do DNA x Fator de diluição das células x N° de colônias crescidas x Inverso da diluição. (Células com bom fator de competência devem estar na ordem de 10⁸ - 10⁹ em diante).

A marca e o genótipo das células utilizadas é:

DH10B (ElectroMAX™ DH10B™ Cells – Invitrogen Cat. N° 18290-015). Genótipo: F⁻ mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15ΔlacX74recA1endA1ara139Δ (ara,leu) 7697 galUgalKλ-rpsL (Str^R) nupG

b) Ligação do Produto de amplificação no vetor de clonagem

A ligação do produto de amplificação foi feita no vetor de clonagem pGEM®-T Easy (Promega) Figura 21. A quantidade de inserto e de vetor utilizado na reação de ligação seguiu as recomendações dos fabricantes:

As condições de reação foram as seguintes:

Reagentes	Concentrações
dATP	1 mM
Tampão	1X
Vetor	20 ng
T4 DNA Ligase	1U

O volume da reação dependeu da quantidade de inserto colocado. A solução de reação foi incubada a 4 °C por uma noite.

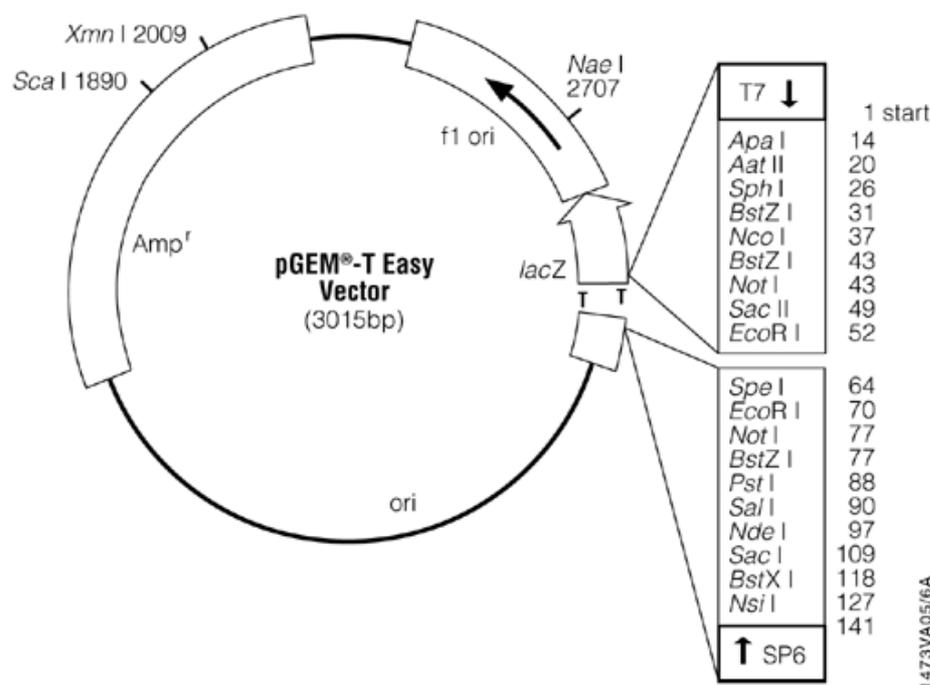


Figura 21 – Vetor utilizado para a clonagem do produto amplificação gerado pelos “primers” nifH/D2 (Figura obtida do site www.promega.com).

O produto de ligação foi submetido a diálise por 1h, utilizando-se membrana de 0,22 μm sobre água. O material dialisado foi ressuspensionado e eletroporado de acordo com a metodologia descrita para a verificação da competência da célula (Item 8.3.5 a). No entanto, após incubação foi verificado o tipo de colônia formada (azuis ou brancas). Colônias brancas foram selecionadas, uma vez que essas potencialmente contém o inserto de DNA alvo, para extração plasmidial para serem utilizados em reação de PCR utilizando “primers” internos do vetor de clonagem (Figura 21) e posterior sequenciamento.

4.2.6 Protocolo de extração de DNA plasmidial

A extração plasmidial de todas as colônias brancas obtidas foi feita seguindo o protocolo sugerido por SAMBROOK et al. (1989) e descrito a seguir.

As colônias brancas obtidas foram transferidas, com o auxílio de palitos para microplaca “deepwell” (96 poços) contendo 1mL de meio LB pH 7,0, com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. Após esse procedimento a placa foi selada com adesivo (Simport), que foi perfurado (dois furos em cada poço) com agulha estéril, para garantir a aeração. Em seguida a placa foi incubada a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 20 horas sob agitação a 200 rpm. Decorrido esse tempo a placa foi centrifugada por 6 minutos a 3200 x g a 20 $^{\circ}\text{C}$, o sobrenadante foi descartado e a cada poço da placa foram adicionados 240 μL de tampão GET (23 mL de glicose 20% p/v filtrada; 10 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0; 3,0 mL de Tris-HCl 1M, água milliQ até o volume final de 500 mL). A placa foi selada com adesivo (Simport) e o precipitado foi ressuspensionado em vortex, e submetido à centrifugação por 9 minutos, 3200 x g a 20 $^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi descartado e a cada poço da placa foram adicionados 80 μL da solução de 584 μL RNase (10 mg/mL) diluída em 9,35 mL de GET. Em seguida essa suspensão de células foi transferida para placa de 250 μL

polipropileno e esta foi incubada por 30 minutos a 37 °C e a cada poço foram adicionados 80 µL de solução de lise (500 µL de NaOH 4M; 1 mL de SDS 10%; 8,5 mL de água milliQ estéril). A placa foi selada com adesivo (Sorenson) e misturada 30 vezes por inversão e submetida à centrifugação rápida. Após a centrifugação, foram adicionados a cada poço 80 µL de acetato de sódio (3M, pH 4,6), selou-se a placa com adesivo (Sorenson) e fêz-se a mistura dos componentes vezes por inversão. A seguir a placa foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada rapidamente e levada à incubação a -20 °C por uma noite. Decorrido esse tempo e após o descongelamento da solução a placa foi submetida a uma rápida centrifugação e em seguida submetida à incubação a 85 °C por 30 minutos, sem ao adesivo. Em seguida a placa foi esfriada em gelo por 10 minutos e centrifugada por 30 minutos a 3200 x g. O sobrenadante foi transferido para uma placa tipo milipore sobreposta a uma placa de fundo V. Esta foi levada a centrifugação por 6 minutos, a 3200 x g a 20 °C. A seguir foram adicionados 100 µL de isopropanol gelado ao filtrado e selou-se a placa com adesivo (Sorenson) e foi feita a mistura dos componentes por inversão e logo após levou-se a placa a rápida centrifugação que em seguida permaneceu incubada a temperatura ambiente por no mínimo 15 minutos. Decorrido esse tempo, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 3200 x g a 20 °C, o sobrenadante foi removido e a cada poço foram adicionados 150 µL de etanol 70% gelado, em seguida a placa foi centrifugada por 10 minutos, a 3200 x g a 20 °C. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 40 µL de água milliQ estéril e estocado a -20 °C.

As amostras de DNA plasmidial foram quantificadas em gel de agarose a 1%, utilizando as concentrações de 200, 400, 800 e 1000 ng do DNA plasmidial PUC 18 (Invitrogen) como padrão para comparação. Todas as centrifugações foram realizadas em microcentrifuga refrigerada tipo Ependorf 5010R .

4.2.7 Amplificação do DNA plasmidial utilizando o par de “primers” T7/SP6

Foi feita a reação de PCR utilizando os “primers” T7 (5'-TAATCGACTCACTATAGGCGA -3') e SP6 (3'- ATTCTATAGTGTCACCTAAAT) cuja seqüências estão contidas no próprio vetor de clonagem (pGEM®T-Easy) e que flanqueiam a região do inserto do DNA (Figura 21) e mais uma região do plasmídeo de aproximadamente 1500 pb. Com isso o produto amplificado foi proveniente do DNA plasmidial que continha o inserto de DNA da região alvo (*nifHD*).

A reação de PCR utilizando os “primers” T7 e SP6 para uma reação de 50 µL seguiu o seguinte protocolo:

Reagentes	Concentração Final
Tampão para PCR	1 vez o volume da reação
MgCl ₂	2,0 mM
dNTP	200 µM
Primer T7	0,2 µM
Primer SP6	0,2 µM
<i>Taq</i> DNA polimerase	1,0 U

As condições de termociclagem foram: 1 etapa inicial de desnaturação (93 °C por 3 min.) seguido por 30 ciclos intermediários (93 °C por 1 min., 55 °C por 1 min.; 72 °C por 1 min.) e 1 etapa final a 72 °C por 3 minutos. Os fragmentos amplificados foram

separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% em TAE 1X a 65V por 2 horas e 30 minutos. As bandas formadas no gel foram visualizadas após coloração com brometo de etídeo e exposição em luz ultravioleta e fotografadas com filme Polaroid tipo 667.

4.2.8 Sequenciamento do produto de amplificação por PCR com os “primers” nifH/D2 das estirpes tipo diazotróficas e dos clones selecionados

A metodologia para o sequenciamento dos produtos de PCR citados acima foram realizados segundo a metodologia descrita no item 2.2.5. (g) do capítulo 1.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Otimização da reação de PCR utilizando os pares de “primers” nifH/D2, D1/D2 e D1/nifK

A otimização da temperatura de anelamento começa com o cálculo da T_m que é geralmente em torno de 5° C mais baixa que a temperatura usada nas condições normais da reação de PCR (ROUX et al, 1995). Segundo SILVA-PEREIRA (2003), as faixas das concentrações de reagentes para se iniciar a otimização de uma reação de PCR são: 1) *Taq DNA polimerase* - 0,5 a 5 unidades/50 µL de reação; 2) dNTP – 20 a 200 µM para cada um dos quatro dNTP; 3) cloreto de magnésio – 0,5 a 3,0 mM; 4) “primers” – 0,1 a 0,5 mM. O autor comenta também, que o Cloreto de Magnésio é um dos componentes mais críticos em uma otimização porque a sua concentração afeta o anelamento de “primers”, temperatura de desnaturação do molde de DNA, especificidade do produto amplificado, atividade e fidelidade da enzima *Taq DNA polimerase*.

O DNA extraído da estirpe tipo de *H. seropedicae* Z67 foi utilizado nos experimentos de ajuste da reação de PCR quando utilizado os “primers” nifH/D2, D1/D2 e D1/nifK. As Tabelas 13, 14 e 15 apresentam os resultados dos experimentos de otimização para os pares de “primers” nifH/D2, D1/D2 e D1/nifK, respectivamente.

Foi possível observar um produto de amplificação de 1400 pb aproximadamente para o produto de PCR quando utilizados os “primers” nifH/D2, com temperatura de anelamento de 62 °C (tratamentos C e D) (Tabela 13). Nesse caso a concentração de DNA foi o fator limitante da reação de PCR.

Tabela 13 - Otimização das condições da PCR utilizando os “primers” nifH/D2.

Tratamentos	Gradiente de temperatura em °C ($\Delta^{\circ}\text{C}=15^{\circ}\text{C}$ com aumento de $1,36^{\circ}\text{C}$)											
	50	51,36	52,7	54,8	55,44	56,8	58,16	59,52	60,88	62,24	63,6	65
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
D	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+	+	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-

Legenda: + = presença de banda ; - = ausência de banda; +/- = banda fraca

Tratamentos:

A= C/ tween, 2,50 mM de MgCl_2 , e 50 ng/µL de DNA

B= C/ tween, 3,75 mM de MgCl_2 , e 50 ng/µL de DNA

C = S/ tween, 2,50 mM de MgCl_2 , e 50 ng/µL de DNA

D = S/ tween, 3,75 mM de MgCl_2 , e 50 ng/µL de DNA

E = C/ tween, 2,50 mM de MgCl_2 , e 25 ng/µL de DNA

F = C/ tween, 3,75 mM de MgCl_2 , e 25 ng/µL de DNA

G = S/ tween, 2,50 mM de MgCl_2 , e 25 ng/µL de DNA

H = S/ tween, 3,75 mM de MgCl_2 , e 25 ng/µL de DNA

Na Tabela 14 são apresentados os resultados referentes à reação de PCR para os pares de “primers” D1/D2. Pode-se observar que houve produto de amplificação do tamanho esperado, ou seja, aproximadamente 600 pb para os tratamentos C e D. O tratamento D foi aquele que apresentou uma maior amplitude de temperatura de anelamento (entre 50 e 62 °C). As concentrações de 50 ng/μL e 3,75 mM de DNA e cloreto de magnésio (MgCl₂), respectivamente foram considerados as melhores para a obtenção do produto, sem inclusive a necessidade de adição de tween.

Tabela 14 - Otimização das das condições da PCR utilizando os “primers” D1/D2.

Tratamentos	Gradiente de temperatura em °C ($\Delta^{\circ}\text{C}=15^{\circ}\text{C}$ com aumento de 1,36°C)											
	50	51,36	52,7	54,8	55,44	56,8	58,16	59,52	60,88	62,24	63,6	65
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
D	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
H	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Legenda: + = presença de banda; - = ausência de banda;

Tratamento:

A = C/ tween, 2,5 mM de MgCl₂, e 50 ng/μL de DNA

B = C/ tween, 3,75 mM de MgCl₂, e 50 ng/μL de DNA

C = S/ tween, 2,5 mM de MgCl₂, e 50 ng/μL de DNA

D = S/ tween, 3,75 mM de MgCl₂, e 50 ng/μL de DNA

E = C/ tween, 2,5 mM de MgCl₂, e 25 ng/μL de DNA

F = C/ tween, 3,75 mM de MgCl₂, e 25 ng/μL de DNA

G = S/ tween, 2,5 mM de MgCl₂, e 25 ng/μL de DNA

H = S/ tween, 3,75 mM de MgCl₂, e 25 ng/μL de DNA

A melhor temperatura para o anelamento dos pares de “primers” D1/nifK foi ao redor de 50 °C, além da concentração de 2,5 mM de cloreto de magnésio e de 1,2 μM para os primers (tratamento E). Nesse caso as concentração do “primer” e do MgCl₂ foram os fatores limitantes da reação de PCR (Tabela 15).

Tabela 15 - Otimização das das condições da PCR utilizando os “primers” D2/nifK

Tratamentos	Gradiente de temperatura em °C ($\Delta^{\circ}\text{C}=15^{\circ}\text{C}$ com aumento de $1,36^{\circ}\text{C}$)											
	40	41,36	42,72	44,8	45,44	46,8	48,16	49,52	50,88	52,24	53,6	55
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Legenda: + = presença de banda; - = ausência de banda

Tratamentos :

A = 2,5 mM de MgCl_2 , e 0,2 μM de cada primer,

B = 3,75 mM de MgCl_2 , e 0,2 μM de cada primer

C = 2,5 mM de MgCl_2 , e 0,6 μM de cada primer

D = 3,75 mM de MgCl_2 , e 0,6 μM de cada primer

E = 2,5 mM de MgCl_2 , e 1,2 μM de cada primer

F = 3,75 mM de MgCl_2 , e 1,2 μM de cada primer

G = 2,5 mM de MgCl_2 , e 1,8 μM de cada primer

H = 3,75 mM de MgCl_2 , e 1,8 μM de cada primer

A otimização do protocolo de PCR para primers degenerados e desenhados para a região do gene *nifH* também foi feita por BURGMANN et al. (2004). Os autores variaram a concentração de cloreto de magnésio, temperatura de anelamento, número de ciclos da reação e a concentração dos pares de “primers”. Essa estratégia permitiu que os autores pudessem estabelecer protocolos de reação de PCR utilizando para esses novos “primers”, após a avaliação do produto de PCR gerado a partir do DNA extraído de 14 estirpes tipo de bactérias diazotróficas.

A otimização final das condições da reação de PCR para um volume final de para cada um dos pares de “primers” testados podem ser visualizados na Tabela 16. Foram utilizados 200 μM de dNTPs e uma unidade de enzima (1 U).

Tabela 16 – Condições finais de otimização da reação de PCR com a utilização de diferentes pares de “primers” desenhados a partir do operon *nifHDK*.

Nome do par de “primer”	Concentração de cada “primer” (μM)	Concentração de MgCl_2 (mM)	Concentração de DNA (ng/ μL)	Temperatura de anelamento ($^{\circ}\text{C}$)
nifH/D1	0,2	3,75	50	62
D1/D2	0,2	2,5	50	55 a 62
D1/nifK	0,2/0,6	3,75	50	50

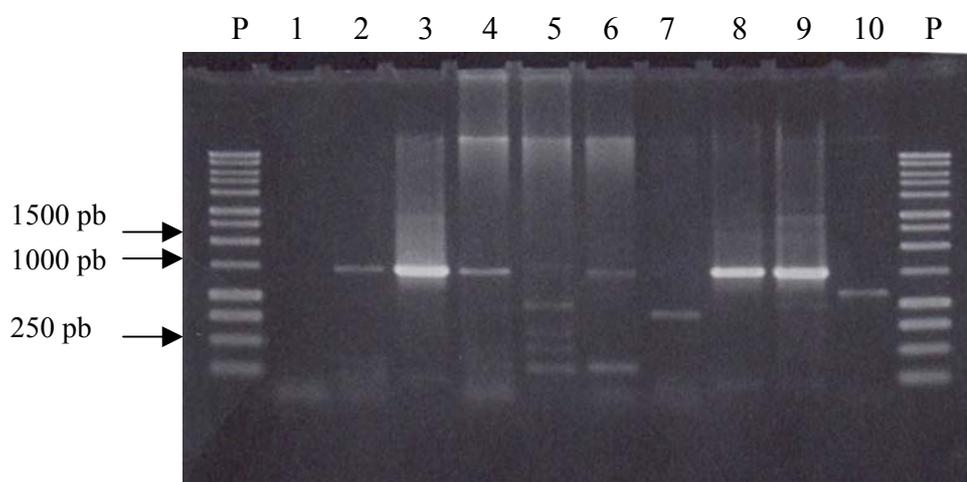
As condições de termociclagem estabelecidas foram: 1 etapa inicial de desnaturação (93 $^{\circ}\text{C}$ por 2 min.) seguido por 35 ciclos intermediários (93 $^{\circ}\text{C}$ por 45 seg., temperatura de anelamento de acordo com a Tabela 16 por 45 seg.; 72 $^{\circ}\text{C}$ por 2 min.) e etapa final a 72 $^{\circ}\text{C}$ de extensão por 5 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,2%) em TAE 1X a 65V por 2 horas e 30 minutos. As bandas formadas no gel foram visualizadas após coloração com brometo de etídeo e iluminação em luz ultravioleta e fotografadas com filme Polaroid tipo 667.

Os pares de “primers” nifH/D2 foram testados em amostras de DNA extraído das estirpes tipo das seguintes bactérias diazotróficas: *Azospirillum brasilense* (Sp7^T),

A. lipoferum (Sp59^T), *A. amazonense* (Y2^T), *Herbaspirillum seropedicae* (Z67^T), *H. frisingense* (84b^T), *Burkholderia tropica* (Ppe8^T), *B. vietnamiensis* (TVV75^T), *Burkholderia* spp. (M130). Os mesmos foram também testados em amostras de DNA extraído de plantas para avaliar a ocorrência destas bactérias em tecidos da planta.

Foi observado um produto de aproximadamente 1400 pb para as 7 estirpes testadas (Sp7, Sp59, Y2, M130, Ppe 8, Z67 e 84b) (Figura 23) e produtos de amplificação de tamanho menor para as estirpes TVV75 e Pal 5 (em torno de 1200 pb e 800 pb respectivamente). No entanto, para as estirpes Sp7, Y2, M130 e Ppe8 a eficiência da reação de amplificação foi menor do que para as estirpes Z67, Sp59 e 84b (Figura 22). Segundo POLLY et al (2001), a eficiência da reação de PCR é reduzida quando se utilizam “primers” degenerados e é preciso lembrar que os primers desenhados apresentam um perfeito pareamento com a seqüência do gene *nif* para *H. seropedicae* estirpe Z67.

Por outro lado, foi observado produtos inespecíficos para as estirpes M130 e Ppe8 (Figura 22). Como o objetivo de otimizar a reação de PCR para as estirpes M130 e Ppe8 foram alteradas as concentrações de DNA e a temperatura de anelamento para 100 ng/μl e 64 °C, respectivamente. Desse modo, produtos de amplificação do tamanho esperado de aproximadamente 1400 pb foram obtidos (dados não apresentados). A inespecificidade apresentada corroboram com os descritos por BURGMANN (2004), que observaram produto de amplificação inespecífico na reação de PCR como novos “primers” degenerados que flanqueiam o gene *nifH*. Os autores comentam que a otimização da reação ocorreu através do aumento das condições de estringência por exemplo, o uso de tween, DMSO, aumento na concentração de cloreto de magnésio e temperatura de anelamento.



Legenda: P - Padrão de peso molecular (1 Kb ladder – Promega) 1– controle negativo (água), 2 – estirpe Sp7, 3 – estirpe Sp59, 4 – estirpe Y2, 5 – estirpe M130 , 6 – estirpe Ppe8, 7 - estirpe TVV75, 8 - estirpe Z67, 9 – estirpe 84b, 10 - estirpe Pal 5.

Figura 22 – Perfil de amplificação da região flanqueada pelos primers *nifH/D2* do DNA extraído de culturas puras das estirpes tipo de bactérias diazotróficas.

Produto de amplificação com aproximadamente 1400 pb também foi obtido na reação de PCR com os “primers” *nifH/D1* a partir de amostras do DNA extraído de colmos e raízes de plantas de arroz (Figura 23). A maioria das amostras apresentou um sinal fraco enquanto que outras amostras apresentam produtos inespecíficos. A

eficiência da reação de PCR a partir de DNA extraído de amostras ambientais é bem menor do que com o DNA extraído de culturas puras de bactérias diazotróficas (BURGMANN et al., 2004). Uma hipótese para essa diferença é que a seqüência alvo para o anelamento dos “primers” em amostras de plantas encontra-se em menor quantidade e menos acessível. Segundo BURGMANN et al (2004) a inespecificidade encontrada nas reações de PCR a partir de DNA de amostras ambientais pode ser devido a co-amplificação de seqüências não alvo. O material de DNA obtido de tecidos de planta contém DNA de diversos microrganismos não fixadores de nitrogênio além do DNA da própria planta, e também de inibidores de reação de PCR como compostos fenólicos o qual a planta pode apresentar.

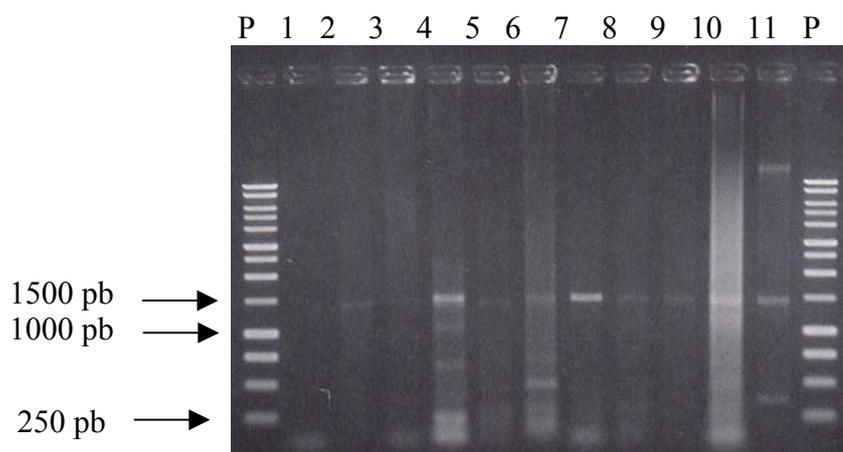
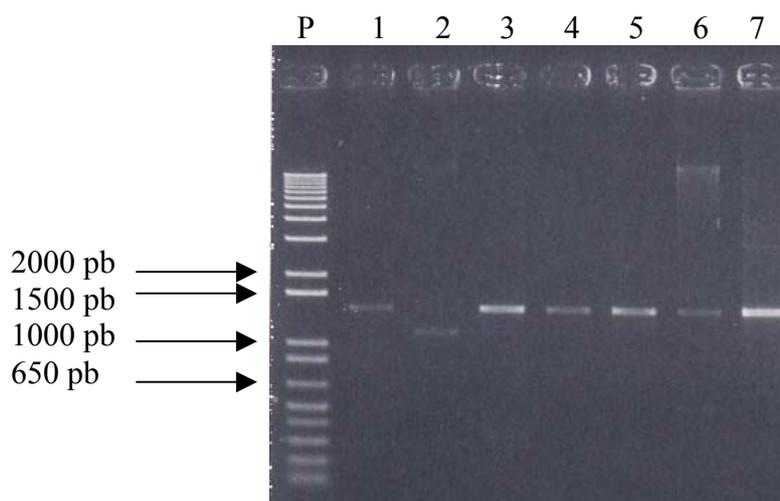


Figura 23 – Perfil de amplificação da região flanqueada pelos primers nifH/D2 do DNA extraído de colmos e raízes de plantas de arroz.

4.3.2 Sequenciamento da região flanqueada pelos “primers” nifH/D1 a partir do produto de PCR das estirpes de referência de bactérias diazotróficas.

O produto de PCR flanqueado pelos pares de “primers” nifH/D1 a partir do DNA de 7 estirpes de referência de bactérias diazotróficas (Y2, Pal5, Sp59, Sp7, 84b, Kp 23 e M130 (Figura 24) foi seqüenciado a fim de se obter seqüências dessa região para que pudessem ser comparadas com outras seqüências disponíveis no banco de dados, bem como utiliza-las para estudo de diversidade. No entanto, o sequenciamento desses produtos utilizando os primers degenerados não foi eficiente, e dessa maneira as seqüências dessas estirpes não puderam ser analisadas.



Legenda: 1 a 7 – estirpes Y2, Pal5, Sp59, Sp7, 84b, Kp 23 e M130 respectivamente. E o padrão de peso molecular utilizado foi o 1Kb ladder (Promega).

Figura 24 - Produto de PCR flanqueado pelos pares de “primers” *nifH/D1* a partir do DNA de 7 estirpes de referência de bactérias diazotróficas, submetidas ao processo direto de sequenciamento utilizando os “primers degenerados *nifH/D1*.”

4.3.3 Clonagem do produto de PCR flanqueados pelos pares de “primers” *nifH/D1* obtidos a partir de amostras de DNA extraídas do colmo de plantas de arroz

Amostras do colmo das cultivares IR 42 e IAC 4440, na época de florescimento, foram submetidas a reação de amplificação de PCR com os “primers” *nifH/D1*. Os produtos de amplificação obtidos foram submetidos ao processo de clonagem conforme descrito anteriormente. Foram obtidas 96 colônias brancas para cada cultivar de arroz e que possivelmente contém o inserto alvo. O DNA plasmidial dessas colônias foi extraído e utilizado a uma nova reação de PCR com os “primers” internos T7 e SP6 do vetor de clonagem (pGEM – T Easy, (Figura 25). Essa reação de PCR foi realizada com o objetivo de detectar os clones ou seja, indivíduos que continham o fragmento alvo inserido no vetor. Esta estratégia tem sido usada pela maioria dos trabalhos de clonagem do produto de PCR flanqueado por primers da região do gene *nifH* e D (UEDA et al., 1995a e b; LOVELL et al., 2000; BROWN et al, 2003; BURGMANN et al. 2004).

Foram obtidos produtos de amplificação com tamanho aproximado de 1600 pb, para 34 amostras de DNA plasmidial e que foram originados da clonagem do produto de PCR com os “primers” *nifH/D1* a partir do DNA do colmo da cultivar IR 42 (Figura 26). O fragmento obtido está de acordo com o tamanho esperado uma vez que os “primers” se alinham na sequência do vetor de clonagem e amplificam todo o fragmento alvo inserido. O baixo rendimento obtido pela reação de PCR (Figura 26) inviabilizou o uso dessas amostras nas reações de sequenciamento visando identificar os microrganismos diazotróficos que estavam colonizando o tecido da planta de arroz.

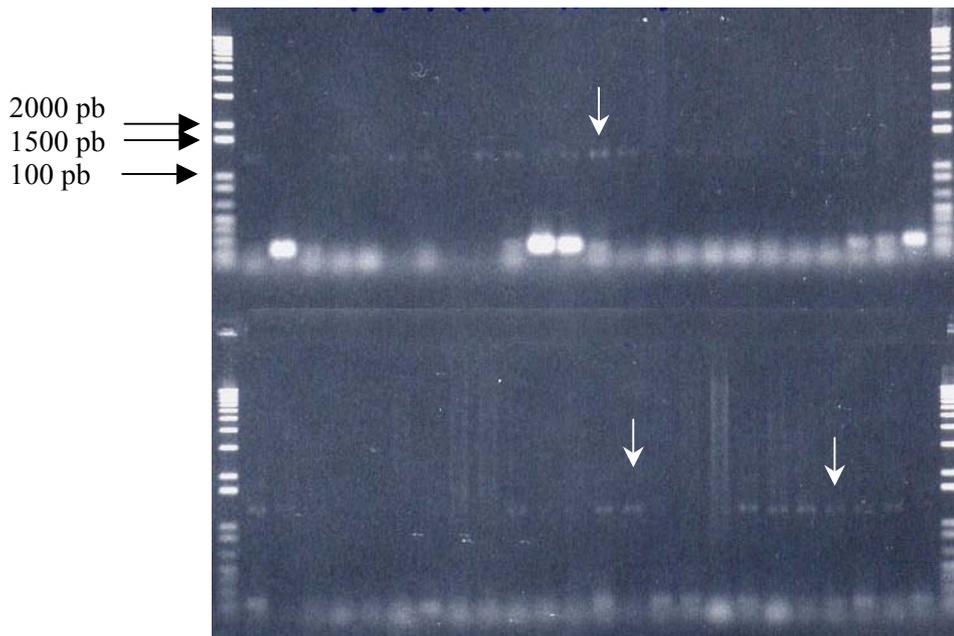


Figura 25 – Perfil de amplificação da reação de PCR com os pares de “primers” T7/SP6 de 34 clones obtidos da clonagem do produto de PCR com os primers nifH/D1 do DNA extraído do colmo da cultivar IR 42. As setas brancas indicam o produto de PCR. O Padrão de peso molecular utilizado foi o 1 Kb ladder plus (Invitrogen).

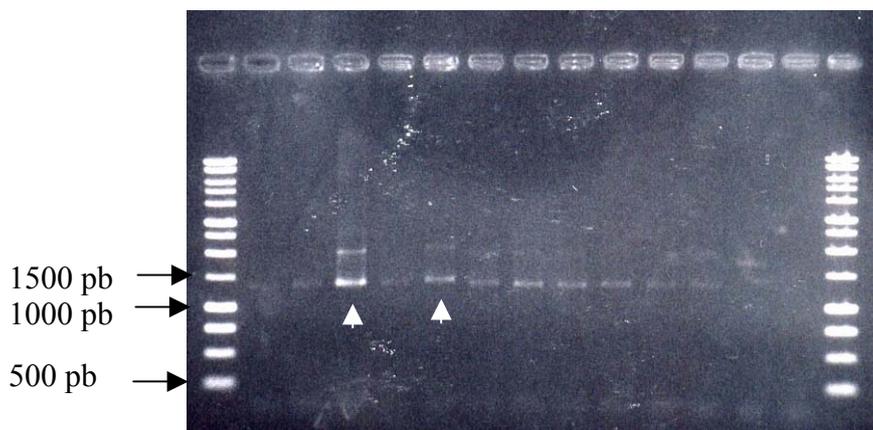


Figura 26 – Perfil de amplificação dos produtos de PCR com primers T7/SP6 com novos DNA plasmídias extraídos dos clones obtidos da clonagem do produto de PCR com os primers nifH/D1 do DNA extraído do colmo da cultivar IR 42. As setas brancas indicam o produto de amplificação. O padrão de peso molecular utilizado foi o 1Kb ladder (Promega).

Apenas 4 amostras originados da clonagem do produto de PCR com os “primers” nifH/D1, obtidos do DNA do colmo da cultivar IAC 4440, apresentaram produto de PCR do tamanho esperado após a reação de PCR com os “primers” T7 e SP6 (Figura 27). Por outro lado, foi observado diversos produtos de amplificação de tamanho menor e que variaram entre 300 a 700 pb (Figura 27).

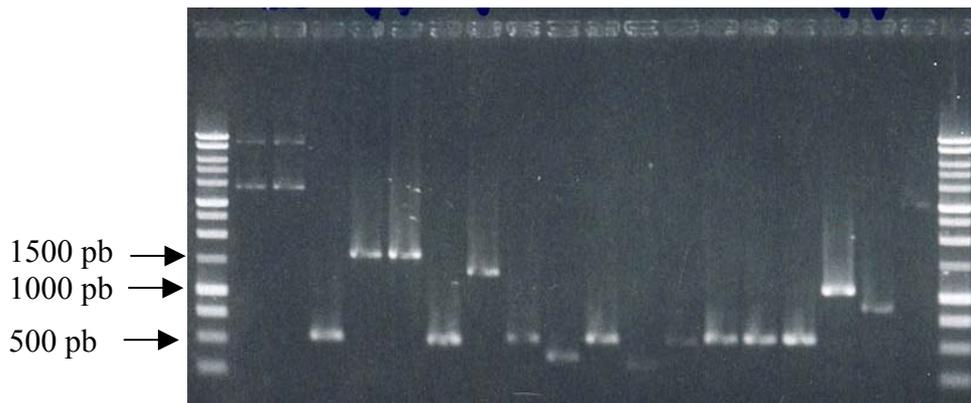
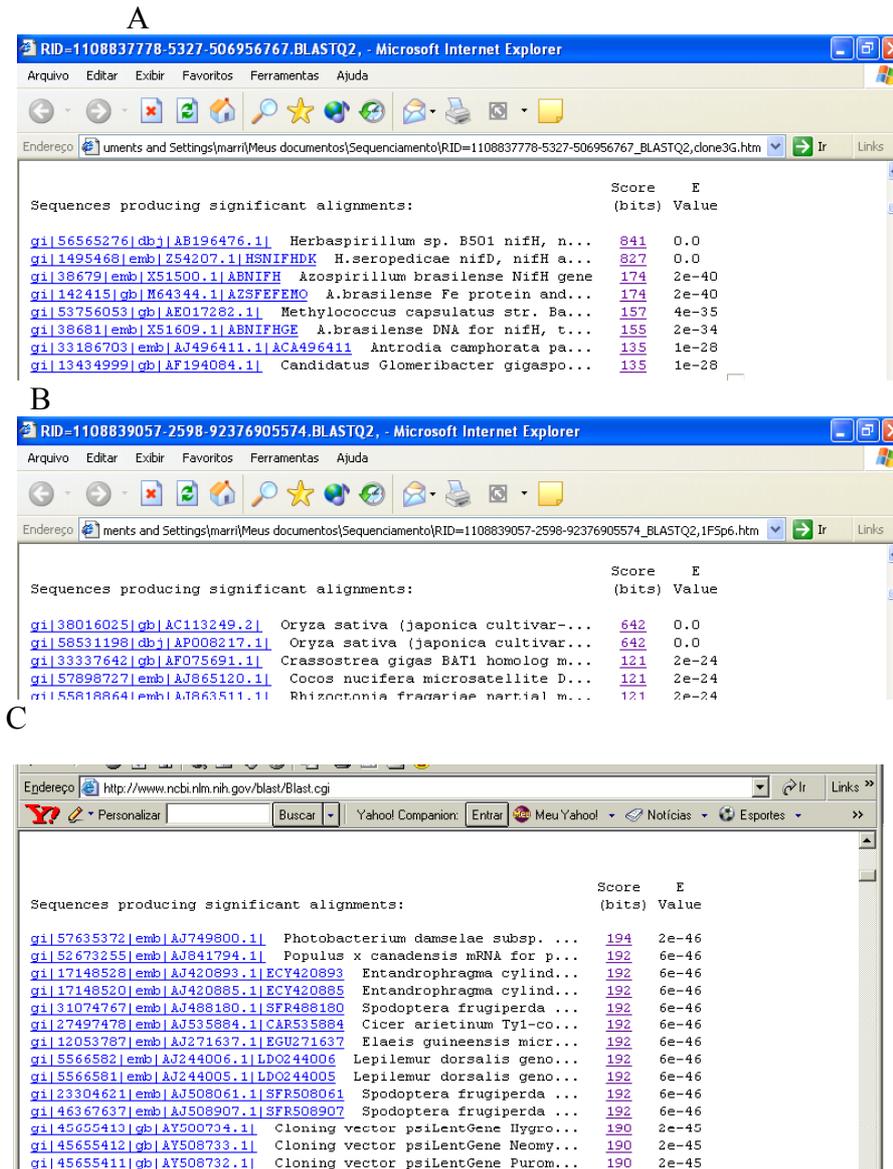


Figura 27 - Perfil de amplificação dos produtos de PCR com primers T7/SP6 com DNA plasmídias extraídos dos clones obtidos da clonagem do produto de PCR com os primers *nifH*/D1 do DNA extraído do colmo da cultivar IAC 4440. O padrão de peso molecular utilizado foi o 1Kb ladder (Promega).

4.3.4 Sequenciamento dos clones obtidos

Foram seqüenciadas 18 amostras (Figura 28), cujas seqüências apresentaram em torno de 600 nucleotídeos para ambos as direções da fita do DNA. As seqüências foram analisadas no programa BLASTn, e as quatro amostras que com um fragmento de aproximadamente 1600 pb (Figura 27) apresentaram as seqüências parciais idênticas em de 95% com seqüência do gene *nifH* e *nifD* de *Herbaspirillum* spp (Figura 28 A).



Legenda: Resultado da comparação por BLASTn da seqüência obtidas após o sequenciamento da região flanqueada pelos “primers” T7 (5’-3’). A) possível clone com 1600 pb de produto de PCR B) possível clone com 700 pb de produto de PCR. C) possível clone com produto de PCR de 300 pb.

Figura 28 – Comparação por BLASTn da seqüência de 3 possíveis clones obtidos da variedade IAC 4440.

A identificação dos quatro clones está de acordo com os dados de literatura e com os resultados obtidos no capítulo 1, onde já foi demonstrada que bactérias do gênero *Herbaspirillum* colonizam endofiticamente e em números elevada a variedade de arroz estudada. Porém, deve-se salientar que foram obtidos poucos clones para se fazer qualquer inferência sobre a abundância de determinados grupos de bactérias fixadoras de nitrogênio nestas variedades. Além disso, somente uma parte da região flanqueada pelos “primers” T7 e SP6 foi sequenciada, o que dificulta o alinhamento por BLASTn dessa região com seqüências disponíveis no banco de dados. Análises da relação dessas seqüências com as estirpes de referência utilizadas nesse estudo também não foram feitas, devido a dificuldade de sequenciamento utilizando-se os “primers” degenerados. É preciso lembrar que somente cerca de 10% do total de bactérias que colonizam as

plantas de arroz são fixadoras de nitrogênio (STOLTZFUS et al., 1997). Portanto, a complexidade do DNA disponível para o alinhamento do primer é relativamente alta dificultando assim o pareamento específico dos mesmos na região dos genes *nifH-D*. Por outro lado, os dados de literatura que já exploraram a ocorrência de bactérias fixadoras nestas duas variedades de arroz, mostraram que além espécies de *Azospirillum* conhecidas, *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia kururiensis* também foram isolados *B. vietnamiensis* e *Sphingomonas* spp (RODRIGUES, 2003).

Diante dos fatores abordados acima, algumas análises deverão ser feitas para uma análise mais completa e detalhada dos resultados. Por exemplo, a otimização do protocolo de transformação do produto de PCR, para que produtos inespecíficos como os obtidos para os “clones” de tamanho menor sejam minimizados ou eliminados. Da mesma forma, o desenho de novos “primers” que flanqueiam a região interna do fragmento amplificado para que toda a região de 1400 pb dos genes *nifH-D* seja totalmente seqüenciada permitindo dessa maneira inferir sobre a filogenia das bactérias diazotróficas presentes nos tecidos das variedades de arroz.

5. CONCLUSÕES

- 1) Foi possível observar um produtos de amplificação com o DNA extraído da estirpe Z67 de *Herbaspirillum* utilizando “primers” degenerados para regiões do operon *nifHDK*;
- 2) As condições da reação de PCR foram otimizadas estabelecendo-se: temperatura de anelamento de 62 , 50-62 e 50 °C, 50 ng/μL de DNA, 3,75, 2,5 mM e 3,75mM de MgCl₂ utilizando os pares de “primers” *nifH/D1*, *D1/D2*, *D1/nifK*, sendo a concentração dos mesmos de 0,2, 0,2 e 0,2/0,6 μM de cada respectivamente;
- 3) Produtos de aproximadamente 1400 pb foram obtidos com o uso do par de “primers” *nifH/D1* para 7 estirpes diazotróficas testadas (Sp7, Sp59, Y2, M130, Ppe 8 e 84b) e para as amostras do DNA extraído de colmos e raízes de plantas de arroz;
- 4) Produtos de amplificação de tamanho menor (em torno de 1200 pb e 800 pb) foram observados para as estirpes TVV75 e Pal 5.;
- 5) Não foi possível o sequenciamento do fragmento do gene *nifH-D* das estirpes de referência utilizando os primers degenerados *nifH/D1*;
- 6) A seqüência parcial dos 4 clones obtidos da cultivar IAC4440 apresentaram 95% de identidade com seqüências do gene *nif* de *Herbaspirillum* depositadas no banco de dados do NCBI.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. v.25, p. 3389-402, 1997.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA. 488 p., 1998.

AZEVEDO, M.S. **Influência do solo e da planta hospedeira sobre a diversidade gênica de isolados de *Azospirillum amazonense* associados às raízes de arroz milho e sorgo**. 1998. 110 p. Tese (Mestrado em Agronomia, na área de concentração em Ciência do Solo) – UFRRJ, Seropédica, RJ.

BALDANI, J. I. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz**. 1984. 127 f. Tese (Mestrado em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo) – UFRRJ, Itaguái, RJ.

BALDANI, J.I.; AZEVEDO, M.S.; REIS, V.M.; TEIXEIRA, K.R.; OLIVARES, F.L. GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, Universidade Federal de Lavras, Dpto de Ciências do Solo, Lavras, MG, p.621-666, 1999.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Internatonal Journal Systematic Bacteriology**. v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J.I.; POT, T.B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSR, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; a mild plant patogen, as *Herbaspirillum rubrisibalbicans* comb. nov. And classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal Systematic Bacteriology**. v. 46, p. 802-810, 1996.

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

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. & DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**. v.13, p.65 - 73, 1992.

BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemidtry**. v.12, 433-439, 1980.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**. v.29, p. 924-929, 1983.

BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. Seropédica, UFRRJ, 1996, 234 p. Tese de Doutorado. BARRAQUIO W.L.; REVILLA, L.; LADHA, J.K Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**. v. 194, p.15-24, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; De – BASHAN, L.E. *Azospirillum* – plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal Microbiology**. v. 50, p. 521-577, 2004.

BAUERNFEIND, A.; SCHEINER, I.; JUNGWIRTH, R.; ROLLER, C. Discrimination of *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia vietnamiensis* from *Burkholderia cepacia* Genomovars I, III, and IV by PCR. **Journal Clinical Microbiology**. v. 37, p. 1335-1339, 1999.

BISHOP, P.E., PREMAKUMAR, R, DEAN, D.R, JACOBSEN, M.R, CHISNELL, I.R, RIZZO, T.M., AND KOPCZYNSKI, I. Nitrogen fixation by *Azotobacter vinelandii* strains having deletions in structural genes for nitrogenase. **Science**: 92-94, 1985.

BODDEY, R.M.; de OLIVEIRA, O.C.; URQUIARGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, Y.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**. v. 174, p. 195-209, 1995.

BRASIL, M. S. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal da Nhecolândia - MS**. 2001. 105 p. Tese (Mestrado em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo) .UFRRJ, Seropédica, RJ.

BROWN, M.M.; FRIEZ, M.J.; LOVELL, C.R. Expression of *nifH* genes by diazotrophic bacteria in the rhizosphere of short form *Spartina alterniflora*. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 43, p. 411-417, 2003.

BULL, A T.; WARD, A C. GOODFELLOW, M. Search and Discovery Strategies for Biotechnology:the Paradigm Shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64, p. 573-606, 2000.

BURGMANN, H.; WIDMER, F.; SINGLER, W.V.; ZEYER, J. New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. **American Society for Microbiology**. v. 70, p. 240-247, 2004.

CABALLERO-MELLADO, I; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDES, G.; ESTRADA-DE-LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic Evolutionary of Microbiology**. v. 54, p. 1165-1172, 2004.

CAMPOS, D. V. B. **Identificação de genótipos de arroz irrigado com potencial para fixação biológica de nitrogênio**. 1999. 94 p. Tese (Mestrado em Agronomia, área de

concentração em Ciência do Solo) – UFRRJ, Seropédica, RJ.

CAVALCANTE, V.A; DÖBEREINER, I A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**. v.108, p. 23-31,1988.

CHEN, Y.B.; DOMINIC, B.; MELLON, M.T.; ZHER, J.P. Circadian rhythm of nitrogenase gene expression in the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. Strain IMS 101. **Journal of Bacteriology**. v. 180, p. 3598-3605, 1998.

CHOUDHURY, A.T.M.A.; KENNEDY, I.R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustentable rice production. **Biology and Fertility of Soils**. 34:219-227, 2004.

CHOUDHURY, AT.M.A; ZAMAN, S.K.; BHUIYAN, N.I. Sesbania: a potential nitrogen source for sustainable rice production. In: KENNEDY, I. R. , CHOUDHURY, AT.M.A (eds). **Biofertilizers in action**. Rural Industries Research and Development Corporation. Camberra, pp 94-101,2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Indicadores agropecuários. (<http://conab.gov.br>. acessado em Julho, 2003).

COWELL, R.R. Poliphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**. v. 104, p. 410-433, 1970.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, I 1.; DÚBEREINER, I; PEDROSA, F. O. 16s ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isoJated ITom banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 2375-2379, 2001.

De BOER, W.; LEVEAU, J.H.J.; KOWALCHUCK, G.; GUNNEWIEK, P.J.A.K.; ABELN, E. C.A.; FIGGE, M.J.; SJOLLEMA, K.; JANSE, J.D.; van VEEN, J.A. *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 857-864, 2004.

De DATTA S. K; BURESH R. I. Integrated nitrogen management in irrigated rice. **Advances in Soil Science**. v. 10, p. 143-169, 1989.

DEDYSH, S.N.; RICKE, P.; LIESACK, W. *nifH* and *nifD* phylogenies: an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. **Microbiology**. v. 150, p. 1301-1313, 2004.

DING, L.; YOKOTA, A Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. novo and *Herbaspirillum putei* sp. novo for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb.

novo and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **International Journal Systematic Evolutionary of Microbiology**. v. 54, p. 2223-2230, 2004.

DIXON, R. and KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature**. v. 2, p. 621-631, 2004.

DÖBEREINER J. History and new perspectives of diazotrophs in association with nonleguminous plants. **Symbiosis**. v. 13, p. 1-13, 1992.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação do Solos**. Brasília: Brasília Produção de Informação, Rio de Janeiro, Embrapa Solos, 1999. 412p.

EMBRAPA –ARROZ E FEIJÃO (CNPAF). **Cultivares de Arroz** (<http://www.cnpaf.embrapa.br>, acessado em dezembro, 2004).

EMBRAPA –ARROZ E FEIJÃO. **Cultivares de Arroz** (<http://www.cnpaf.embrapa.br>, acessado em julho, 2001).

ENGELHARD, M.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. **Environmental Microbiology**. v. 2, p. 1311-141, 2000.

ELBELTAGY, A; NISMOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H; YE, B.; RAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 5285-5293, 2001.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R; CABALLEROMELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 2790-2798, 2001.

EVANS, H.J. BURRIS, R.H. Highlights in Biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: **Biological nitrogen fixation**, STACEY, G. et al. (eds). Chapman and Hall, New York, p. 1-42, 1992.

FAO. Faostat. (<http://apps.fao.org> acessado em fevereiro, 2003).

FANI, R; BANDI, C.; BAZZICALUPO, M.; DAMIANI, G.; DI CELLO, B.; FANCELLI, S.; GALLORI, S.; GERACE, E.; GRIFONI, A; LIO, P. & MORI, E. Phylogenetic studies of the Genus *Azospirillum*. In: FENDRIK, I; DEL GALLO, M.; V ANDERLEYDEN, J. & ZAMAROCZY, M., eds. ***Azospirillum* VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology**. Berlin, Springer - Verlag, 1995, p.245-249.

FIORE, M.F.; GUTBROD, K.G. Use of *Azolla* in Brasil. In: IRRI ed. International Rice Research Institute. **Azolla Utilization**, Los Banos, Laguna, Philippines. p. 123-130, 1987.

FIORE, A; LAEVENS, S.; BEVIVINO, A; DALMASTRI, c.; TABACCHIONI, SIL VIA; V ANDAMME,; CHIARINI, L. Burkholderia cepacia complex: distribution of gemovars among isolates from the maize rhizosphere in Italy. **Environmental Microbiology**. v. 3, p. 137-143, 2001.

FISHER, P.J., PETRINI, O., LAPPIN SCOTT, H.M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**. v.122, p.299-305, 1992.

GERNER-SMIDT, P.; TJERNBERG, 1; URSING, 1. Reliability of phenotypic tests for identification of Acinetobacter species **Journal of Clinical Microbiology**. v. 29, p. 277-282, 1991.

GILLIS, M.; DÓBEREINER, 1.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between (*Pseudomonas rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *autrophicum*. In: **Nitrogen fixation** (M, Polsinelli, R; Materassi and M. Vicenzi, Eds), pp. 292-294, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1991.

GILLIS, M.; VAN, T. V. BARDIN, R; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to a new emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. novo for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 45, p. 274-289, 1995.

GRIMONT, P.A.; GRIMONT, F. STARR, M.P. *Serratia* species isolated from plants. **Currents of Microbiology**. v. 5, p. 537-540, 1981.

GUEDES, V.H. **Caracterização filogenética de estirpes de bactérias diazotróficas pertencentes à espécie *G. Diazotrophicus***. Monografia, 33 p., 2004.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; MATHAN, N.; REDDY, P.M.; REINHOLDHUREK, B.; LADRA, J.K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**. v. 183, p. 2634-2645, 2001.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; REDDY, P.M LADRA, J.K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**. v.154, p. 131-145, 2002.

GRAYSTON, S.I.; WANG, S.; CAMPBELL, C.D. & EDWARDS, A.C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology. & Biochemistry**. v. 30, p. 369-378, 1998.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analyses program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. v.41, p. 95-98, 1999.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, I.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p. 895-914, 1997.

HAMELIN, J.; FROMIN, N.; TARNAWSKI, S.; TEYSSIER-CUVELLE, S.; ARAGNO, M. nifH gene diversity in the bacterial community associated with the rhizosphere of *Molinia coerulea*, an oligonitrophilic perennial grass. **Environmental Microbiology**. v. 4, p. 477-481, 2002.

HARTMANN, A.; STOFFELS, M.; ECKERT, R.; KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M. Analysis of the presence and diversity of diazotrophic endophytes. From: **Prokaryotic Nitrogen Fixation: A model System for Analysis of a Biological Process**. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, 2000.

HUREK, T.; EGENER, T.; REINHOLD-HUREK, B. Divergence in nitrogenases of *Azoarcus* spp., Proteobacteria of the beta subclass. **Journal of Bacteriology**. v. 179, p. 4172-4178, 1997.

HUREK, T.; HANDLEY, L.L.; REINHOLD-HUREK, B.; PICHÉ, YVES. Grass endophytes contribute fix⁰⁰ nitrogen to the plant in an unculturable state. **The American Phytopathological Society**. v.15, p. 233-242, 2002.

IM, WAN-TAEK.; B, HEE-SUNG.; YOKOTA, A.; LEE, S.T. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. novo a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **International Journal of Systematic. Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 851-855, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Banco de dados agregados. (<http://sidra.ibge.gov.br>. Acessado em julho, 2003).

IRRI (INTERNACIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE). World rice statistics. (<http://www.irri.org/science/ricestatic>. acessado em julho, 2003).

JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W.L.; REDDY, P.M.; IANNETTA, P.P.M.; OLIVARES, F.L.; LADHA, J.K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. Z67. **Molecular Plant-Microbiol Interaction**. v.15, p. 894-906, 2002.

JAMES, E.K. Nitrogen Fixation in Endophytic and Associative symbiosis. **Field Crops Research**. v. 3854, p. 1-13, 2000.

JAMES, E.K. GYANESHWAR, P.; BARRAQUIO, W.L.; MATHAN, N.; LADHA, J.K. Endophytic diazotrophs associated with rice. In: de BRUIJN, F.I.; LADHA, J.K. (Eds), **Proceedings the third meeting of the rice BNF working group**. Internacional Rice Research institute, Manila, pp.119-123, 1999.

JAMES, E.K; OLIV ARES, F.L. Infection and colonization of sugarcane and other gramineaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Science**. v 17, p. 77-119, 1998.

KIM, K.; ZHANG, Y.P.; ROBERTS, G.P. Correlation of activity regulation and substrate recognition of the ADP-rybosiltransferase that regulates nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Bacteriology**. v. 181, p. 1698-1702, 1999.

KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; AMMUS, B. & HARTMANN, A . Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology & Biochemistry**. v. 29, p. 853-862, 1997.

KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 44, p. 12-19, 1998.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J.I.; REIS, Y.M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4- fibre plants. **International Journal of Systematic. and Evolutionary. Microbiology**. v 51, p. 157-168, 2001.

KUMARASINGHE K S and ESKEW D L Comparison of direct and indirect ¹⁵N methods for evaluation of N uptake by rice from *Azolla*. In: KUMARASINGHE, K S.; ESKEW, D. L. **Isotopic Studies of Azolla and Nitrogen Fertilization of Rice**. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp.16-21, 1993.

KUNDUN, D.K; LADHA, J.K Enhancing soil nitrogen use and biological nitrogen fixation in wetland rice. **Experientia Agricola**. v. 31, p. 261-277, 1995.

KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**. v. 5, p.150-163, 2004.

LADHA., J, K; BARRAQUIO, W.L.; WATANABE, I. Immunological techniques to identify *Azospirillum* associated with rice. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 28, p. :478-485, 1982.

LADHA, J. K.; So, R.B.; WATANABE, I. Composition of *Azospirillum* species associated with wetland rice plant grown in diferents soils. **Plant and Soil**. v 102, p. 127-129, 1987.

LAGUERRE, G.M.; ALLARD, F.R.; AMARGER, N. Rapid identification of *rhizobia* by restriction fragment length polymorfism analyses of PC-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 60, p. 56-63, 1994.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. 38° ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LOVELL, C.R; PICENO, Y.M.; QUATTRO, J.M.; BAGWELL, C.E. Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina altemiflora*. **American Society for Microbiology**. v. 66, p. 3814-3822, 2000.

LOVELESS, T.M.; BISHOP, P.E. Identification of genes unique to Mo-independent nitrogenase systems in diverse diazotrophs. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 45, p. 312-317, 1999.

LUDDEN, P.W.; SHAH, V.K.; ROBERTS, G.P.; RÜTTIMAN-JOHNSON, C. Biosynthesis of the iron-molybdenum and iron-vanadium cofactors. In: **Biological Nitrogen Fixation the 21st Century**. ELMERICH, C.; KONDAROSI, A.; NEWTON, W.E. (Eds.). Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands. p. 33-38, 1998.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Estimativas de safra**. (<http://www.agricultura.gov.br>, acessado em dezembro, 2004).

MAGALHÃES, F.M., BALDANI, J.I., SOUTO, S.M., KUYKENDALL, J.R AND DOBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Academia Brasileira de Ciência**. v.55, p. 417-430, 1983.

McCULL Y, M. E. Niches for endophytes in crop plants: a plant biologist's view. **Australian Journal Plant Physiology**. v. 28, p. 983-990, 2001.

MERRICK, M.J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E. (Eds.). **New Horizons in nitrogen fixation**. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands. p. 43-54, 1993.

MISAGHI, I.J., DONNDELINGER, C.R Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**. v. 80, p. 808-811, 1990.

OLIVARES, F.L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. Híbrido) por bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997. pp.344. Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo – UFRRJ, Itaguaí, RJ. Tese de doutorado.

OHKUMA, M., NODA, S.; KUDO, T. Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, p. 4926-4934, 1999.

PACE NR, STAHL DA, LANE DJ, OLSEN GJ. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**. v. 9, p. 1-55, 1986.

PAREK, RP.; LADHA, J.K.; WATANABE, I. Estimating N₂-fixation by *Sesbania rostrata* e *S. Cannabina* (Syn. *S. aculeata*) in lowland rice soil by the ¹⁵N dilution method. **Biology and Fertility of Soils**. v. 10, p. 77-88, 1990.

PICENO, Y.M., NOBLE, P.A., AND LOVELL, C.R. Spatial and temporal assessment of diazotroph assemblage composition in vegetated salt marsh sediments using denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Microbiol Ecology**. v. 38: p. 157-167, 1999.

PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.L.; PITARD, RM.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F. & DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas*

rubrisubalbicans and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil*. v. 137, p. 61-65, 1991.

POLY, F., RANJARD, L., NAZARET, S., GOURBIERE, F., AND MONROZIER, L. Comparison of nifH gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 2255-2262, 2001.

POSTGATE, JR, EADY, RR The evolution of biological nitrogen fixation. In: **Nitrogen Fixation: Hundred Years After**. BOTHE, H., DE BRUIJN, F.J, NEWTON, W.E.(eds). Stuttgart: GustavFischer. p. 31-40, 1988.

ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 434 p., 1983.

QUADT -HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 43, p. 895-914, 1997.

RAPPE, M.S., CONNOR, S.A., VERGIN, K.L., AND GIOV ANNONI, S.J. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. **Nature**. v. 418, p. 630-633, 2002.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J.L.; STAPLES, C.R.; BLANKENSHIP, R. The Natural History of Nitrogen Fixation. **Molecular Biological Evolution**. v. 21, p. 541-554, 2004.

REES, D. C.; HOWARD, J. B. Nitrogenase: standing at the crossroads. *Currents Opinon in Chemistry and. Biology*. v.4, p. 559-566, 2000.

REEVES, T.G.; WADDINGTON, S.R; ORTIZ-MONASTERIO, I. BÀNZIGER, M., CASSADY, K. Removing nutritional limits to maize and wheat production: A developing country perspective. In: KENNEDY, I.R CHOUDHURY, ATMA. (eds) **Biofertilizers in action. Rural Industries**. Researche and development Corporation. Camberra. pp. 11-36, 2002.

REINHOLD-HUREK, B. and HUREK T.: Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus* sensu lato and description of three new genera and new species, *Azovibrio restrictus* gen. nov., sp. nov., *Azospira oryzae* gen. nov., sp. novo and *Azonexus fungiphilus* gen. nov., sp. nov. **Interantional Jouranal Systematic Evolucionary Microbiology**. v. 50, p 649-659, 2000.

REINHOLD-HUREK, R; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**. v. 6, p. 139-144, 1998.

REINHOLD-HUREK, B; HUREK, T; GILLIS, M. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca*, (L) Kunt), and description of two species: *Azoarcus indigenus* sp. novo and *Azoarcus communis* so. nov. **Intemational Systematic Bacteriology**. v. 43, p. 574-584, 1993.

REINHOLD-HUREK, B; HUREK, T.; NIEMANN, E.G.; FRENDRIK, I. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different roots zones of kallar grass. **Journal of Bacteriology**. v. 175, p. 7056-7065 1986.

REIS, Y.M., ESTRADA-de LOS SANTOS, P., TENORIO-SALGADO, S., VOGEL, J., STOFFELS, M., GUYON, S., MA VINGUI, P., BALDANI, V.L.D., SCHMID, M., BALDANI, J.I., CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. Interantional **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 2155-2162, 2004.

REIS, Y.M., OLIVARES, F.L. E DOBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophs* and confirmatios of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.10, p. 401-405, 1994.

REIS, V.M.; REIS IR, F.R; SALLES, J.F.; SCHLOTTER, M. Characterization of different polyclonal antisera to quantify *Herbaspirillum* spp. in elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Symbiosis**. v.29, p. 139-150, 2000 a.

REIS, Y.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. & DOBEREINER, J. Biological Dinitrogen Fixation in Gramineae and Palm trees. **Critical Reviews in Plant Science**. v. 19, p. 227-247, 2000 b.

REIS Jr., F. B. **Ecologia e diversidade de bactérias do gênero *Azospirillum* em associação com pastagens de *Brachiaria* spp.** 2002. 98 p. Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo) - UFRRJ, Seropédica, RJ.

RIBBE, M., GADKARI, D., AND MEYER, O. N₂ fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced by a molybdenum-CO dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p. 26627-26633, 1997.

RODRIGUES, L.DA SILVA Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado. Tese de Doutorado, 96 p., 2003. Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo) - UFRRJ, Seropédica, RJ.

ROSADO, AS.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VANELSAS, I.D. Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-Amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, p. 2770-2779, 1998.

ROSADO, A.S. Diversidade e Ecologia de microrganismos do solo. In: **Fertbio 2000**, CD Room do Congresso, 2000.

ROUX, K.H.; Optimization and troubleshooting in PCR Department of Biological Science, Florida State University, Tallahassee, Florida. p.32306-33050, 1995.

RUIZ, A; POBLET, M.; MAS, A; GUILLAMÓN, I M. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR- amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. v. 50, p. 1981-1987, 2000.

SALLES, IF.; SOUZA, F.A; VANELSAS, ID. Molecular method to asses the diversity of Burkholderia species in environmental samples. **Applied and Enviromental Microbiology**. v. 68, p.1595-1603, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**. A laboratory manual. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainville, N.Y, 1989.

SEEFELDT, L. c., DANCE, I. G. & DEAN, D. R Substrate interactions with nitrogenase: Fe versus Mo. **Biochemistry**. v. 43, p. 1401-1409, 2004.

SELDIN, L, VAN ELSAS I.D, PENIDO E.G.C.R *Bacillus azotofixans* sp. novo a nitrogen species from Brazilian soil and grass roots. **International Jouranal Systematic Bacteriology**. v. 34, p. 451-456, 1984.

SCHINDELIN, H.; KISKER, C.; SCHLESSMAN, J.L., HOWARD, J.B.; REES, D.C. Structure of ADP \times AlF $_4^-$ stabilized nitrogenase complex and its implication for signal transduction. **Nature**. v. 387, p. 370-376, 1997.

SILVA-PEREIRA, I. Amplificação de DNA por PCR. In: AZEVEDO, M.O.; FELIPE, M.S.S.; BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q.; De-SOUZA, M.T. **Técnicas básicas em biologia Molecular**. 212 p., 2003.

SIMPSON, F.R; BURRIS, RH. A nitrogen pressure of 50 atmosphere does prevent evolution of hydrogen nitrogenase. **Science**. v. 224, p. 1095-1097, 1984.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotechnologia do solo: fundamnetos e perspectivas**. Série Agronomia Ministério da Educação, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE. p. 236, 1988.

SPRENT, J.I.; SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms; pure and applied aspects. London: Chapman and Hall. 256p. SIMON, H.M.; HOMER, M.I.; ROBERTS, G.P. Pertubation of ni/f expression in *Klebsiella pneumoniae* has limited effect on nitrogen limited. **Journal of Bacteriology**. v. 178, p. 2975-2977, 1990.

SPRENT J.I. **The biology of nitrogen-thing organisms**. McGraw-Hill, London, pp 103-105, 1979.

SHRESTHA R.K., LADHA J.K. Nitrate in groundwater and integration of nitrogen catch crop in rice-sweet pepper cropping system. **Soil Science Society of American Journal**. v. 62, p. :1610-1619, 1998.

SHRESTHA , RK.; LADHA, J.K. The estimation of rice genotypic variation in N $_2$ fixation using 15 N stabilized soil. In: **7th Intematinal Symposium on Nitrogen Fixatiom with Non-legumes**. Abstracts. October 16-21. NIBGE, Faisalabas. Pakistan. p. 192, 1996.

SNEATH, P. H. A, SOKAL, R R. **Numerical taxonomy**. W. F. Freeman and Company, San Francisco. 1973. p. 230-234.

SOARES-RAMOS, J.R.L.; RAMOS, H.J.O; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S. Comparative molecular analyses of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. **Genetics Molecular Biology**. v. 26, p. 537-543, 2003.

STOLTZFUS, J.R; SO, R; MALARVITHI, P.P.; LADHA, J.K.; BRUJIN, F.L. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil**. v 194, p 25-36, 1997.

STOLTZFUS, J.R.; So, R.; MALARVITHI, P.P.; LADHA, J.K.; BRUJIN, F.J. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. **Plant and Soil**. v 194, p 25-36, 1997.

TAN, Z.; HUREK, T.; REINHOLD- HUREK, B. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on nifH gene pools in roots of rice. **Applied Environmental Microbiology**. v. 5, p. 1009-1015, 2003.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v.22. p. 4673–4680, 1994.

TOWNER, C. The genus *Acinetobacter*. In: <http://rizzo.springer.com>: 63 36/dynaweb/verlagpr...rPrint - BookT ext View;/uf=O;ts=chapters;cs=brwprint (1 of 17) [12/20/2001 1:45:13 PM].

UEDA, T.; SUGA, Y; NOBUTAKA, Y; MATSUGUCHI, T. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of a *nifH* genes sequences. **American Society for Microbiology**. v. 177, p. 1414-1417, 1995 a.

UEDA, T.; SUGA, Y; MATSUGUCHI, T. Genetic diversity of N₂-fixing bacteria associated with rice roots by molecular evolutionary analysis of a *nifD* library. **Canadian Journal Microbiology**. v. 41, p. 235-240, 1995 b.

VALVERDE, A, VELÁZQUEZ, E., GUTIÉRREZ, c., CERVANTES, E., VENTOSA, A.; IGUAL, J.M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**. v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**. v. 60, p. 407-438, 1996.

VANDAMME, P., GORIS J., CHEN W. M., De VOS P. & Willems A (). *Burkholderia tuberum* sp. novo and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic Applied Microbiology**. v. 25, p. 507-512, 2002.

VIDEIRA, S.S.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Identity and genetic variability of isolates of nitrogen-fixing bacteria associated rice (*Oriza sativa*). In: 22nd Latin-american Conference on Rhizobiology and 1st Brazilian Conference on Biological Nitrogen Fixation. **Book Abstracts**. p. 69, 2004.

WOESE, C.R Bacterial evolution. **Micribiology Reviews**. v. 5, p. 221271, 1987.

WOESE, c.R.; FOX, G.E. Phylogenetic struture of thr procaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings ofthe National Academy of Sciences**. v. 74, p. 5088-5090, 1977.

WU, P.; ZHANG, F.; LADRA, J.K; McCOUCH, S.R.; HUANG, N. Molecular-marker facilitated investigation on the ability to stimulate N₂ fixation in the rhizosphere by irrigated rice plants. **Theorics Applied in Genetics**. v. 91, p. 1177-1183, 1995.

XIE G, STEINBERGER Y. Dynamics of nitrogen-efficient guild and its relationship to nitrogen and carbon patten in desert loessial and sandy soil ecosystems. **Arid Land Research Manage**. v. 16, p. 69-81, 2002.

YAMADA, Y; HOSHINO, K; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria basead on the partial sequences of 16S ribossomal RNA: the elevation of de subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. **Bioscience Biotechnhology and Biochemistry**. v. 61, p. 1244-1251, 1997.

YAMADA, Y; HOSHINO, K; ISHIKAWA, T. *Gluconacetobacter* nom. corng. (*Gluconacetobacter* [sic]. In: Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB, List no. 64. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 48, p. 327-328, 1998.

YOUNG, I. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Philogeny of phototrophic Rhizobium strain BT Ai 1 by plymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA segment. **Journal of Bacteriology**. v. 173, p. 2271-2277, 1991.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen fixing organisms. In: **Biological Nitrogen Fixation**. STACEY, G.; EVANS, H.J. BURRIS, R.H. (Eds.). New York: Chapman & Hall. p. 43-86, 1992.

YOU, C and ZHOU, F . Non-nodular endorhizosphere nitrogen fixation in wetland rice. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 35, p. 403-408, 1989.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria basead on the partial sequences of 16S ribossomal RNA: the elevation of de subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. **Bioscience, Biotechnhology and Biochemistry**. v. 61, p. 1244-1251, 1997.

ZANI, S.; MELLON, M.T.; COLLIER, J.L.; ZEHR, J.P. Expression of nijH genes in natural microbial assemblages in lake George, New York, detected by reverse transcriptase pcr. **American Society for Microbiology**. v. 66, p. 3119-3124, 2000.

ZHANG, H; HANADA, S.; SHIGEMATSU, T.; SHIBUYA, K; KAMAGATA, Y; KANAGAWA, T.; KURANE, R. *Burkholderia kururiensis* sp.nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 50, p. 743-749, 2000.

ZEHR, J.P. and McREYNOLDS, L.A. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. **American Society for Microbiology**. v. 55, p. 2522-2526, 1989.

ZEHR, J.P., JENKINS, B. D., SHORT, S.M; STEWARD, G.F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**. v. 5, p. 539-554, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)