



**ANÁLISE MOLECULAR DE COMUNIDADES MICROBIANAS
PRESENTES NA RIZOSFERA DE DIFERENTES CULTIVARES
DE MILHO PLANTADAS EM SOLO DE CERRADO**

Fabio Faria da Mota

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Orientadora: Profa. Lucy Seldin



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES

Agosto - 2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

da MOTA, Fabio Faria

Análise molecular de comunidades microbianas presentes na rizosfera de diferentes cultivares de milho plantadas em solo de cerrado

Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes / UFRJ, 2007.

viii, 92 fls

Tese: Doutor em Ciências (Microbiologia)

- | | | |
|----------------|-------------|-------------------------|
| 1. Bactérias | 4. Fungos | 7. DGGE |
| 2. 16 rRNA | 5. 18S rRNA | 8. <i>Paenibacillus</i> |
| 3. <i>rpoB</i> | 6. Milho | 9. Rizosferas |

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Tese

II. Título

Tese realizada no Laboratório de Genética Microbiana, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob a orientação da Dra. Lucy Seldin.

AGRADECIMENTOS:

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente...

Agradeço a Deus pela a vida e pela saúde que me deu; as pessoas especiais que colocou em meu caminho; a oportunidade de receber gratuitamente boa parte da educação fundamental, o ensino superior e todas as pós-graduações (especialização, mestrado e doutorado), enquanto muitas pessoas não têm acesso nem mesmo ao ensino fundamental no mesmo país; e por tudo mais que eu tenho recebido dele...

À minha orientadora Lucy Seldin, pela amizade, pelo excelente exemplo profissional, pela paciência e principalmente por acreditar sempre (até quando eu já não acreditava) no meu potencial, me incentivando e ajudando a vencer grandes desafios...

Aos meus pais, Sandra e José Luiz, pela vida e pelo carinho que sempre tiveram comigo. Suas palavras e gestos, exemplos de dignidade, respeito e honestidade foram fundamentais não apenas para realização desta tese, mas para cada vitória conquistada em minha vida.

À minha namorada Júlia, pelo amor e carinho; pela compreensão e atenção dedicadas a mim durante estes “alguns tempos”; pelo apoio, força e tranquilidade em todos os momentos difíceis; por estar sempre disposta a me ajudar sem medir esforços; e por tornar mais felizes todos os momentos em que estive ao meu lado.

À minha querida irmãzinha (Cristiane), pela amizade e pela pessoa admirável e batalhadora que é, sempre companheira e carinhosa em todos os momentos que passamos juntos.

Ao meu cunhado Felipe, pela amizade durante esses 10 anos que nos conhecemos e por te me dado junto com a minha irmãzinha, a minha sobrinha/afilhada mais linda do mundo!!

A minha sobrinha/afilhada maravilhosa, chamada Beatriz (Bia), que sempre me alegrou fazendo bagunça e me chamando de “Títi”, quando eu já estava estressado escrevendo a tese.

As minhas avós, tios(as) e primos(as), por formarem essa família maravilhosa, super carinhosa e muitas vezes divertida. Apesar de nem sempre poder estar junto de vocês, morro de saudades...

Aos amigos do Laboratório de Genética Microbiana: Janaína (pelo bom humor de sempre, pela paciência e por ser essa pessoa compreensiva e humana que ela é), aos amigos de longas datas Silvia, Márcia, Elisa, Renata, Vanessa, Natalie, Simone Cotta, Diogo J., Diogo Bastos, Joana, Natália, Luciano, Simone Siqueira e Juliana (pela amizade, trocas de idéias e ensinamentos ao longo destes anos).

Aos grandes amigos que passaram pelo Laboratório de Genética Microbiana, Irene, Kátia Araújo, Rafael Fogel, Deyvison, Ralph e Raquelzinha.

Aos agregados do Laboratório de Genética Microbiana (como são carinhosamente chamados) André Santos, Felipe Dias, Patrícia, entre muitos outros que tornam as nossas festinhas sempre alegres e divertidas.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Molecular (Alexandre, Raquel, Taketani, Natália, Erick, Fábio, Cláudia, Flávia, Estevão, Bárbara, Henrique, etc... São muitos..)

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Ultraestrutura de Procariotos (Juliana, Fernanda, Thaís, Iamê, Karen, Virginia, Herval, Fernando, Carolina e Ulysses).

Agradecimentos aos agradecimentos: Gostaria de agradecer o carinho dos autores Karina Antúñez, Luciana de Azeredo, Raquel Peixoto e Silvia Santos por citarem carinhosamente meu nome nos "Acknowledgments" dos seus respectivos artigos científicos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS:

Aos pesquisadores Eliane Gomes, Edílson Paiva, Ivanildo Marriel, Newton Carneiro e aos demais membros do EMBRAPA – Milho e Sorgo que cederam não só as amostras de rizosfera e solo de Cerrado, mas também realizaram os seqüenciamentos de DNA.

Aos meus colaboradores (autores e co-autores dos artigos científicos publicados durante o doutorado), Júlia Peixoto de Albuquerque, Irene von der Weid, Silvia Santos, Rafael Fogel, Renata Estebanez Vollú, Márcia Reed Rodrigues Coelho, Eliane Gomes, Edílson Paiva, Ivanildo Marriel, Newton Carneiro, Alexandre Rosado e Lucy Seldin.

À Dra. Maria Rita Scotti Muzzi e sua equipe da UFMG, pela amostra de solo de Floresta.

Aos professores Maria do Carmo, Regina Pilotto e Orlando Martins que cederam alguns dos DNAs de referência usados como controle negativo, através de seus alunos...

Ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, aos professores e funcionários, pelo suporte técnico e condições de trabalho oferecidas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo auxílio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos recebida durante esses 4 anos.

A todos que não foram citados nominalmente, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
PREFÁCIO.....	3
RESUMO.....	5
SUMMARY.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1. <i>Gramíneas de interesse comercial</i>	7
1.2. <i>Interações entre microrganismos da rizosfera e plantas</i>	8
1.3. <i>Solo de cerrado</i>	9
1.4. <i>Calagem do solo</i>	10
1.5. <i>Técnicas usadas no estudo de ecologia molecular</i>	11
1.6. <i>Comunidades de Paenibacillus presentes na rizosfera de gramíneas de interesse agrícola</i>	11
2. OBJETIVO GERAL.....	19
2.1. <i>Objetivos específicos</i>	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. <i>Análises de PCR-DGGE baseadas em genes ribossomais das comunidades bacterianas e fúngicas presentes na rizosfera de linhagens de milho (Zea mays L.) sensíveis e tolerantes ao alumínio cultivadas em solo de cerrado sob diferentes condições de estresse</i>	21
3.2. <i>Uso do gene rpoB para a identificação de espécies de Paenibacillus fixadoras de nitrogênio como alternativa ao gene que codifica o 16S rRNA</i>	25
3.3. <i>Avaliação da diversidade de espécies de Paenibacillus em amostras ambientais através de uma nova abordagem de PCR-DGGE baseada no gene rpoB</i>	30
4. RESULTADOS.....	39
4.1. <i>Análises de PCR-DGGE baseadas em genes ribossomais das comunidades bacterianas e fúngicas presentes na rizosfera de linhagens de milho (Zea mays L.) sensíveis e tolerantes ao alumínio cultivadas em solo de cerrado sob diferentes condições de estresse</i>	39
4.2. <i>Uso do gene rpoB para a identificação de espécies de Paenibacillus fixadoras de nitrogênio como alternativa ao gene que codifica o 16S rRNA</i>	50
4.3. <i>Análise da diversidade de espécies de Paenibacillus em amostras ambientais através de uma nova abordagem de PCR-DGGE baseada no gene rpoB</i>	56
5. DISCUSSÃO.....	66

5.1. Efeito da calagem do solo e das linhagens de milho sobre a estrutura das comunidades microbianas.....	66
5.2. Uso do gene <i>rpoB</i> para a identificação de espécies de <i>Paenibacillus</i> fixadoras de nitrogênio como alternativa ao gene que codifica o 16S rRNA.....	70
5.3. Análise da diversidade de espécies de <i>Paenibacillus</i> em amostras ambientais através de uma nova abordagem de PCR-DGGE baseada no gene <i>rpoB</i>	73
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIAS.....	78
ANEXOS.....	92

ABREVIATURAS

16S rRNA – Molécula de RNA ribossômico 16S bacteriano

18S rRNA – Molécula de RNA ribossômico 18S fúngico

ARDRA – “Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis” (Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado)

DGGE – “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis” (eletroforese em gel de gradiente desnaturante)

DIG – Digoxigenina

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

16S rDNA – fragmento oriundo da amplificação por PCR do gene que codifica a molécula de RNA ribossômico 16S

18S rDNA – fragmento oriundo da amplificação por PCR do gene que codifica a molécula de RNA ribossômico 18S

CSPD – “disodium 3-(4-methoxyspiro-[1,2-dioxetane-3-. 2’(5’chloro)-tricyclo[3.3.1.1’]phosphate”

gyrB – gene que codifica a subunidade beta da DNA girase bacteriana

kb – Quilo base (s) (1.000 pb)

Número da estirpe ^T – Estirpe-tipo da espécie

nifH – gene que codifica a dinitrogenase redutase

pb – par (es) de base (s)

PCA – “Principal Components Analysis” (Análise de Componentes Principais)

PCR – “Polymerase Chain Reaction” (reação de polimerização em cadeia)

PGPR – “Plant Growth Promoting Rhizobacteria” (rizobactérias promotoras do crescimento de plantas)

Pi – Fósforo inorgânico

pb – pares de bases

RNA – Ácido ribonucléico

rpoB – gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase bacteriana

rrs – gene que codifica o 16S rRNA

TGGE – “Temperature Gradient Gel Electrophoresis” (eletroforese em gel de gradiente de temperatura)

T-RFLP – “Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism” (análise de polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição terminal)

UPGMA – “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”

SSCP – “Single-Strand Conformation Polymorphism” (Polimorfismo da conformação de fita simples)

PREFÁCIO

Durante o período de 2003 a 2007 em que realizei o curso de doutorado em Ciências (Microbiologia), no Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, tive a oportunidade de desenvolver diversos projetos de pesquisa no Laboratório de Genética Microbiana, sob a orientação da Profa. Lucy Seldin, na qualidade de autor (anexos I, II e III) ou co-autor dos autores Márcia Reed Rodrigues Coelho, Renata Estebanez Vollú e Júlia Peixoto de Albuquerque (anexos IV, V e VI, respectivamente).

No anexo I é avaliada a influência da calagem na estrutura destas comunidades bacterianas e fúngicas predominantes no solo de cerrado e em rizosferas de milho tolerantes e sensíveis ao alumínio, ao longo do crescimento da planta, através de iniciadores para o gene que codifica o 16S rRNA (*rrs*) e subsequente reação de PCR e DGGE.

No decorrer do anexo II são discutidos os problemas inerentes à utilização do gene *rrs* para a identificação de estirpes de diferentes espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio, que são freqüentemente encontradas na rizosfera de diversas gramíneas de interesse agrícola. O gene *rpoB* é proposto como uma alternativa ao gene *rrs* para a identificação de estirpes dessas espécies de rizobactérias. Para a validação do novo marcador molecular foram utilizados 24 isolados bacterianos provenientes de rizosferas de milho, além de estirpes de referência.

No anexo III uma nova abordagem molecular baseada em PCR-DGGE do gene *rpoB* é proposta para o estudo de comunidades de *Paenibacillus* em amostras ambientais. As comunidades de *Paenibacillus* presentes em diferentes cultivares de milho e nos solos de cerrado e floresta também foram comparadas através dessa nova abordagem independente de cultivo de microrganismos.

No anexo IV são comparadas, através da abordagem independente de cultivo de microrganismos proposta no trabalho apresentado no anexo III, as comunidades de *Paenibacillus* presentes nas rizosferas de diferentes cultivares de sorgo plantadas em solo contendo baixa ou alta quantidade de adubo nitrogenado. Independente da cultivar ou da condição do solo, foi observada uma grande predominância de seqüências identificadas como *P. graminis* em todas as amostras de sorgo estudadas.

No anexo V são utilizados diferentes métodos baseados em cultivo para estudar estirpes de *P. graminis* isoladas de raiz ou rizosfera de milho, sorgo e trigo. São

avaliadas características fenotípicas dessas estirpes, incluindo a utilização de diversos carboidratos e a produção de cristais de dextrina. Embora todas as estirpes sejam fenotipicamente idênticas, estas foram diferenciadas através de perfis genéticos obtidos após a digestão do DNA genômico com enzimas de restrição e a utilização de fragmentos dos genes *rpoB* e *gyrB* como sondas, além do seqüenciamento parcial do gene *rpoB*.

No anexo VI é estudada outra espécie de *Paenibacillus* fixadora de nitrogênio, *P. durus*, através de métodos baseados em cultivo. A espécie foi escolhida pela sua capacidade de fixar taxas relativamente altas de nitrogênio. Foram estudadas estirpes de *P. durus* isoladas de diferentes espécies de gramíneas e que variavam na sua capacidade de utilização de seis carboidratos (sorbitol, D-arabitol, dulcitol, tagatose, amido e glicogênio). O objetivo do trabalho apresentado neste anexo foi utilizar métodos moleculares baseados em PCR como ARDRA e *gyrB*-RFLP, na tentativa de observar se havia alguma relação entre as características genotípicas das estirpes, a capacidade de utilização dos seis carboidratos e as espécies de plantas das quais elas foram isoladas.

Estes diferentes projetos resultaram, até o momento, na publicação de cinco artigos científicos em revistas internacionais e um artigo submetido a uma revista internacional (apresentados em anexo). Além destes, realizei um outro projeto no mesmo laboratório como autor principal e o artigo com o título "Phytohormone production by *Paenibacillus* strains, sequencing and characterization of auxin efflux carrier gene in *Paenibacillus polymyxa*" está atualmente em fase de preparação. Além dos artigos científicos, foram publicados 10 resumos em anais de congressos científicos nacionais e internacionais e 365 seqüências de DNA foram obtidas durante a realização destes projetos e depositadas no banco de dados GenBank.

A seguir, serão apresentados apenas os resultados obtidos em projetos científicos que participei como autor principal.

RESUMO

A análise da estrutura de comunidades microbianas presentes nos mais diversos ambientes, quando efetuada por técnicas convencionais de cultivo, resulta em uma visão parcial deste habitat. Isto porque somente uma pequena porção (de 1 a 10%) da população microbiana é capaz de ser cultivada em laboratório. Sendo assim, muitos estudos sobre a estrutura de comunidades microbianas de solo e rizosferas vêm sendo realizados com base no DNA extraído diretamente desses ambientes. Nesta tese, foi avaliada a influência da calagem na estrutura de comunidades bacterianas e fúngicas predominantes no solo de cerrado e em rizosferas de milho tolerantes e sensíveis ao alumínio, através de iniciadores para o gene que codifica o 16S rRNA (*rrs*) e subsequente reação de PCR e DGGE. As comunidades bacterianas das rizosferas de milho foram mais afetadas pelo tratamento do solo (calagem) do que pelas linhagens de milho (sensíveis ou tolerantes ao alumínio). Ao contrário, a comunidade fúngica se mostrou mais estável, sendo pouco influenciada pelo solo e/ou linhagem do milho utilizada. Algumas bandas das comunidades bacterianas foram retiradas da DGGE e seqüenciadas, demonstrando uma dominância de Actinomycetales e Rhizobiales. Em outro tipo de abordagem molecular, o gene que codifica a RNA polimerase subunidade beta (*rpoB*) foi utilizado na taxonomia do grupo de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio. Para tal, foram geradas seqüências de *rpoB* de oito estirpes-tipo das diferentes espécies fixadoras de nitrogênio e foi demonstrado, através de DGGE e hibridação de DNA-DNA, que somente uma cópia deste gene é encontrada no genoma de *P. graminis*. Foi demonstrado também que a utilização do *rpoB* permite uma identificação mais acurada de espécies de *Paenibacillus* do que o gene *rrs*. Esses estudos levaram ao desenvolvimento de um sistema de PCR-DGGE específico para o estudo da diversidade de comunidades de *Paenibacillus* em amostras ambientais. Um novo iniciador (*rpoBPAEN*) foi desenhado baseado na inserção de seis nucleotídeos encontrada nas seqüências obtidas para as espécies fixadoras de nitrogênio. Através dos perfis de DGGE, foi observada uma distinção clara entre as comunidades de *Paenibacillus* provenientes do solo de floresta e de cerrado, bem como da rizosfera de diferentes cultivares de milho. Em conclusão, os resultados obtidos demonstraram o potencial da abordagem molecular para o estudo da estrutura de comunidades de *Paenibacillus* e de outras comunidades bacterianas e fúngicas predominantes em amostras ambientais.

SUMMARY

Cultivation-based techniques allow the analysis of only a minor fraction of the microbial community in different environments. Only a small portion of the microbial population (1 to 10%) is able to grow in the laboratory. Therefore, a range of studies on the microbial community structures of soil and/or rhizospheres have been performed on the basis of DNA extracted directly from these habitats. This thesis evaluated the effects of liming on the structure of bacterial and fungal communities in bulk soil and rhizospheres of aluminum (Al)-sensitive and Al-tolerant maize (*Zea mays* L.) lines cultivated in Cerrado soil by PCR -DGGE. Bacterial fingerprints revealed that the bacterial communities from rhizospheres were more affected by aluminum stress in soil than by the maize lines (Al-sensitive or Al-tolerant). Conversely, fungal communities from the rhizosphere were weakly affected either by liming or by the rhizosphere. Cloning and sequencing of 16S rRNA gene fragments obtained from dominant DGGE bands detected in the bacterial profiles of the Cerrado bulk soil revealed that Actinomycetales and Rhizobiales were among the dominant ribotypes. The usefulness of the RNA polymerase beta-subunit encoding gene (*rpoB*) was also investigated as an alternative to the 16S rRNA gene for taxonomic studies in *Paenibacillus*. Partial *rpoB* sequences were generated for the type strains of eight nitrogen-fixing *Paenibacillus* species. The presence of only one copy of *rpoB* in the genomes of *P. graminis* strains was demonstrated by DGGE and hybridization assays. A comparative analysis of the sequences of the 16S rRNA and *rpoB* genes allowed a more accurate discrimination between the different species using the *rpoB* gene. A specific PCR system based on the gene encoding the *rpoB* was also developed for amplification and DGGE fingerprinting of *Paenibacillus* communities in environmental samples. A new reverse primer (*rpoBPAEN*) was designed based on an insertion of six nucleotides in the *Paenibacillus* sequences analyzed. To assess the diversity of *Paenibacillus* species in Cerrado and Forest soils and in the rhizosphere of different maize cultivars (CMS04, CMS11, CMS22 and CMS36), a PCR-DGGE system was used. The *Paenibacillus* DGGE fingerprints showed a clear distinction between communities of *Paenibacillus* in Forest and Cerrado soils and rhizosphere samples clustered along Cerrado soil. The results presented here demonstrate the potential use of molecular approaches for studying the diversity of *Paenibacillus* populations and other bacterial and fungal communities in natural environments.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Gramíneas de interesse comercial*

Algumas gramíneas (plantas da família Poaceae) são de grande interesse comercial e vêm sendo amplamente cultivadas com esse propósito. Dentre elas, destacam-se espécies das tribos Andropogoneae, como milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*); tribo Triticeae, como o trigo (*Triticum aestivum*); tribo Paniceae, como as forrageiras (*Brachiaria* spp. e *Melinis minutiflora*); entre outras.

No Brasil, em 2005, segundo o IBGE (www.sidra.ibge.gov.br), as lavouras de milho ocuparam a segunda maior área de plantio (12,2 milhões de hectares), atrás somente da soja com 23,4 milhões de hectares plantados. Logo atrás do milho, em terceiro lugar, ficou a cana-de-açúcar com cerca de 5,8 milhões de hectares. O trigo ficou em sexto lugar com 2,3 milhões de hectares. Em relação ao valor da produção, a cultura da cana-de-açúcar ficou em segundo lugar com cerca de 13 bilhões de reais (R\$), atrás somente da soja, com 21,7 bilhões de reais, e em terceiro lugar, a cultura do milho com 9,4 bilhões de reais.

A cultura do milho (*Zea mays* L.) também é amplamente difundida em todo o mundo. Os Estados Unidos da América (EUA) são responsáveis por quase 40% da produção mundial de milho, segundo a “Food and Agriculture Organization – USA”. Em 2006, cerca de 31 milhões de hectares ($31 \times 10^{10} \text{ m}^2$) de milho foram colhidos no EUA e a produção de grãos estimada em mais de 33 bilhões de dólares americanos. Entretanto, a China, a União Européia e Brasil também são importantes produtores de milho. Atualmente, 30% da produção brasileira de milho está concentrada no cerrado, em uma área de aproximadamente 3,5 milhões de hectares (IBGE, 2006).

Dentre os custos da produção de gramíneas no Brasil, a adubação nitrogenada ainda representa um fator importante, diferente do que acontece com plantas da família das leguminosas (Fabaceae), como a soja, onde a adubação nitrogenada foi praticamente substituída pela utilização de estirpes inoculantes. O cultivo de gramíneas (plantas da família Poacea) ainda necessita de muito adubo nitrogenado, pois essas plantas não formam nódulos com rizóbios (bactérias simbiotes, que fixam grandes

quantidades de nitrogênio) como ocorre com as leguminosas. Entretanto, outras bactérias diazotróficas (fixadoras de nitrogênio atmosférico) de vida livre apresentam potencial para serem utilizadas como inoculantes de gramíneas, pois são capazes de colonizar a superfície das raízes e produzir outras substâncias, além do nitrogênio, que estimulam o crescimento da planta. Porém, pelo fato de essas bactérias não estarem protegidas em nódulos no interior das plantas, também é necessário compreender outros fatores como, por exemplo, a capacidade dessas estirpes de competir com outros microrganismos da rizosfera durante o desenvolvimento da planta.

1.2. Interações entre microrganismos da rizosfera e plantas

Vários estudos mostram que os exsudatos liberados pelas raízes podem influenciar seletivamente o crescimento de bactérias e fungos presentes no solo ao redor da raiz (rizosfera). A alteração da química do solo na rizosfera se deve à liberação de diferentes compostos durante a exsudação; estes compostos servem como fonte de nutriente para muitos microrganismos presentes neste local (Brimecombe, Leij & Lynch, 2001). Esse estímulo da atividade microbiana próxima à raiz geralmente resulta no aumento do número de microrganismos em relação ao solo não-rizosférico (“bulk soil”). Este fenômeno é descrito por alguns autores como “efeito rizosfera” (Brimecombe, Leij & Lynch, 2001).

Nas últimas décadas, interações específicas entre espécies de plantas e microrganismos presentes na rizosfera têm sido descritas por muitos autores. Estas associações podem ser benéficas ou não para as plantas. As associações benéficas podem ser divididas em dois tipos, simbióticas e não-simbióticas, dependendo da natureza da interação. As associações simbióticas são caracterizadas pela presença de bactérias como as do gênero *Rhizobium*, que são capazes de induzir a formação de nódulos, ou ainda por actinomicetos do gênero *Frankia* ou por uma série de fungos endomicorrízicos e ectomicorrízicos (Lynch, 1990). Já as associações não simbióticas entre plantas e os microrganismos são representadas pelas rizobactérias, que são bactérias de vida livre presentes na rizosfera das mais diferentes espécies de plantas (Glick, 1995). Por outro lado, bactérias capazes de colonizar o tecido interno de plantas são denominadas endofíticas (Baldani & Baldani, 2005).

Muitas vezes, as rizobactérias podem promover interações positivas com as raízes das plantas, desempenhando um papel importante no ambiente e um uso possível

na agricultura sustentável (Défago, Duffy & Keel, 1994). Para descrever estas estirpes bacterianas, Kloepper & Schroth (1978) introduziram o termo “rizobactérias promotoras do crescimento de plantas” (“Plant Growth Promoting Rhizobacteria”-PGPR), sendo esta atividade de promoção do crescimento de plantas descrita em estirpes de vários gêneros presentes no solo como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, entre outros (Kloepper, Lifshitz & Zablotowicz, 1989; Holl & Chanway, 1992; Shishido, Loeb & Chanway, 1995).

As bactérias designadas como PGPR podem afetar o crescimento da planta de diferentes formas, direta e/ou indiretamente. A via indireta de promover o crescimento da planta é dada pela prevenção do efeito deletério de um ou mais microrganismos fitopatogênicos (mecanismo de antibiose), enquanto que a promoção direta do crescimento da planta pode ocorrer através da síntese ou da disponibilização de nutrientes e outras substâncias para a planta (Glick, 1995).

As PGPR podem atuar no desenvolvimento da planta através de um ou mais desses mecanismos, como a fixação de nitrogênio atmosférico, síntese de sideróforos e fitormônios, na solubilização de minerais, como o fósforo (Davison, 1988; Kloepper, Lifshitz & Zablotowicz, 1989; Lambert & Joos, 1989) e na produção de substâncias antimicrobianas (Rosado & Seldin, 1993; Mavingui & Heulin, 1994; Walker, Powell & Seddon, 1998).

A estrutura destas comunidades microbianas pode variar dependendo do tipo de solo, espécie da planta, condição nutricional, idade, tipos de estresses e outras condições ambientais (Marschner *et al.*, 2001; Smalla *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2003; Garbeva, van Veen & van Elsas, 2004; Costa *et al.*, 2006; Garbeva *et al.*, 2006).

1.3. Solo de cerrado

O cerrado compreende cerca de 205 milhões de hectares, aproximadamente 22% do território nacional (Dianese, Santos & Furlanetto, 1994), e é uma das regiões com grande potencial para a produção agrícola, destacando-se como importante área marginal que atualmente está sendo incorporada ao processo produtivo. Os solos de cerrado apresentam elevado grau de intemperização e baixa capacidade de troca catiônica (CTC), com sítios de troca ocupados principalmente por hidrogênio (H^+) e alumínio (Al^{3+}), possuindo, portanto, alta saturação por alumínio e baixo pH (Reichardt, 1981). Por esta razão, plantas cultivadas nesses solos estão geralmente sujeitas a

estresses múltiplos, principalmente aqueles causados por toxidez de Al, deficiência de Pi (fósforo inorgânico) e escassez de água. Os mecanismos que regulam a adaptação de plantas a essas condições de estresse são bastante complexos (Magalhães, Durães & Schaffert, 2000). Solos com problemas de Al tóxico e deficiência de Pi provavelmente representam mais de 50% de nosso território. Nas últimas décadas, foram realizados melhoramentos genéticos através do cruzamento de diferentes variedades milho, visando à obtenção de cultivares e linhagens com uma maior tolerância ao alumínio tóxico e também uma maior eficiência na aquisição / utilização de Pi.

1.4. Calagem do solo

A prática de “calagem” (adição de calcário ao solo), amplamente utilizada na agricultura, tem como objetivo a redução da solubilidade dos elementos tóxicos (alumínio e/ou manganês) que, em determinadas concentrações, pode limitar a produtividade. O neutralizante mais empregado para diminuir a presença destes elementos tóxicos é o calcário calcítico ou o dolomítico, apesar da existência de outros materiais. O calcário dolomítico, além de neutralizar o alumínio tóxico, pela precipitação na forma de $Al(OH)_3$, fornece cálcio e magnésio ao solo, em quantidades adequadas à nutrição das plantas (Vasconcellos, Santos & França, 1988).

A correção da acidez do solo é uma prática bastante utilizada, mas nem sempre é uma solução viável para eliminar os efeitos do Al tóxico. Muitas regiões apresentam subsolo com teores de alumínio tóxico, diminuindo o crescimento e o desenvolvimento do sistema radicular de plantas sensíveis a esse elemento (Magalhães, Durães & Schaffert, 2000). De forma geral, os vegetais diferem muito em relação a seu comportamento na presença de alumínio tóxico e essa variabilidade é encontrada tanto entre plantas de espécies diferentes como entre cultivares de uma mesma espécie (Aniol, 1985). Portanto, a obtenção de cultivares mais bem adaptados às condições de solo (ácido e alumínio tóxico) é a estratégia importante para complementar e principalmente minimizar a prática de calagem, sem que haja perda na eficiência da produção agrícola (Kochian, 1995; Howeler, 1991; Bona, Matuz & Purnhauser, 1991).

A toxidez causada pelo alumínio é um fator importante que limita a produtividade do milho em solos ácidos. O aparecimento dos sintomas de toxidez devido ao alumínio se faz sentir, primeiramente, no sistema radicular. As raízes de plantas com sintomas de toxidez por alumínio geralmente são curtas, grossas e possuem numerosas raízes

laterais não desenvolvidas, aumentando a suscetibilidade à seca e reduzindo o uso dos nutrientes do subsolo (Bona, Matuz & Purnhauser, 1991). Plantas crescidas em solução nutritiva, com presença de Al, claramente apresentam esses sintomas, evidenciando a toxicidade do alumínio. As plantas apresentam pequeno desenvolvimento da parte aérea, e as folhas tornam-se arroxeadas ou com tonalidade de um amarelo pálido (Vasconcellos, Santos & França, 1988).

Como o alumínio interfere na absorção e utilização de vários elementos essenciais à nutrição mineral, tais como: Ca, Mg, K, Fe, P e outros, também é comum o aparecimento das deficiências destes elementos (Vasconcellos, Santos & França, 1988).

Apesar de todos esses fatores limitantes, atualmente, 30% da produção brasileira de milho concentra-se no cerrado, em uma área de aproximadamente 3,5 milhões de hectares, que está sendo ampliada a cada safra (IBGE, 2006). Esta produtividade se deve em grande parte à utilização de cultivares comerciais mais tolerantes ao alumínio e, principalmente, à prática da calagem do solo. Entretanto, poucos estudos foram realizados sobre o impacto da utilização dessa prática na comunidade microbiana do solo e da rizosfera.

Em 1982, Baldani et al. avaliaram o efeito da calagem (adição de 12 tons/ha de CaCO_3) de um latossol vermelho-amarelo de cerrado através de métodos baseados em cultivo microbiano. Além do aumento no pH do solo de 3,5 para 6,6, foi observada também uma grande alteração no equilíbrio microbiano do solo. Entretanto, na época técnicas moleculares ainda não estavam disponíveis para o estudo da diversidade microbiana.

A análise da estrutura de comunidades microbianas presentes nos mais diversos ambientes (como o solo, rizosfera, água, etc) quando efetuada por técnicas convencionais de cultivo resulta numa visão apenas parcial deste habitat. Isto porque a maior parte dos seus componentes (microrganismos não cultiváveis) não pode ser detectada por essas técnicas tradicionais de cultivo (Kuske *et al.*, 2002).

1.5. Técnicas usadas no estudo de ecologia molecular

Muitos estudos sobre a estrutura de comunidades microbianas de solo e rizosferas vêm sendo realizados com base no DNA extraído diretamente desses ambientes (Gelsomino *et al.*, 1999; Smalla *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2003; Garbeva, van Veen & van Elsas, 2004; Salles, van Veen & van Elsas, 2004; Costa *et al.*, 2006; Garbeva *et al.*,

2006). Esta estratégia supera limitações inerentes às técnicas baseadas em cultivo, que permitem apenas analisar uma pequena fração da comunidade bacteriana (Hugenholtz, Goebel & Pace, 1998)

As abordagens independentes de cultivo de microrganismos se baseiam na amplificação por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) de genes alvo, como o *rrs* (16S e o 18S rRNA), e a subsequente análise da sua diversidade através de abordagens baseadas em perfis moleculares e/ou seqüenciamento do gene em questão.

A técnica denominada DGGE (“Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”) permite analisar produtos de PCR de acordo com suas seqüências de pares de bases, e não apenas pelo tamanho dos produtos. Esta técnica utiliza géis de poliacrilamida contendo um gradiente linear de desnaturante (uréia e formamida), nos quais moléculas de DNA com o mesmo tamanho, porém com diferentes seqüências, apresentam perfis migratórios diferentes. Essa separação se baseia em um princípio físico simples de que a mobilidade eletroforética do DNA em um gel de poliacrilamida é sensível à estrutura secundária da molécula, que pode ser: (i) helicoidal, (ii) parcialmente desnaturada ou (iii) fita simples. As moléculas parcialmente desnaturadas, compostas por partes em dupla hélice e partes em fitas simples, movimentam-se mais lentamente no gel do que moléculas em fita dupla ou simples (Muyzer *et al.*, 1998).

Quando o DNA é submetido à eletroforese em condições crescentes de desnaturação, seja essa química ou térmica, os fragmentos permanecem em dupla fita até que eles atinjam as condições necessárias para a desnaturação dos domínios da molécula chamados domínios de desnaturação. Quando um domínio desses se desnatura, processa-se uma transição na conformação da molécula, que passa de helicoidal para parcialmente desnaturada e, nessa situação, a migração da molécula no gel é praticamente interrompida (Rosado & Duarte, 2002).

Variações nas seqüências nucleotídicas desses domínios levam a uma diferença nessas condições desnaturantes e as moléculas com diferentes seqüências vão interromper sua migração em diferentes posições no gel. Sendo assim, fragmentos de mesmo tamanho, obtidos após amplificação por PCR e visualizados em gel de agarose, podem ser separados na DGGE, se possuírem seqüências nucleotídicas distintas.

Usando-se DGGE, pode-se detectar aproximadamente 50% das variações de seqüências em fragmentos de DNA com até 500 pares de bases (Myers *et al.*, 1985). Essa percentagem pode ser aumentada para quase 100% quando se acrescenta a um dos lados do fragmento de DNA um segmento rico em GC (grampo de GC). Esse

grupo de GC, quando anexado à extremidade 5' de um dos iniciadores, agindo como um domínio de alta resistência à desnaturação, impede a dissociação das duas fitas do DNA em fitas simples (Sheffield *et al.*, 1989). Normalmente, o comprimento do grupo de GC varia entre 30 e 50 nucleotídeos (Muyzer *et al.*, 1998).

Uma variação dessa técnica, conhecida como TGGE (“Temperature Gradient Gel Electrophoresis”) baseia-se na desnaturação através da utilização de um gradiente térmico e no uso de uma concentração constante de uréia e formamida ao longo de um gel de poliacrilamida (Rosado *et al.*, 1997).

Uma outra técnica, denominada de SSCP (“Single-Strand Conformation Polymorphism”), também é capaz de detectar pequenas mudanças na seqüência ou mutações pontuais (Orita *et al.*, 1989). Em condições não-desnaturantes, o DNA em fita simples possui uma estrutura secundária que é determinada pela sua seqüência nucleotídica. Mudanças na seqüência como, por exemplo, substituições simples de nucleotídeos, podem alterar essa estrutura, e desta forma, a mobilidade eletroforética no gel de poliacrilamida.

O DNA presente em um gel de DGGE, TGGE ou SSCP pode também ser transferido para membranas de náilon e hibridado com sondas específicas para detecção de determinados grupos microbianos específicos. Além disso, bandas podem ser eluídas do gel, reamplificadas e seqüenciadas, permitindo a comparação com seqüências de um banco de dados e a determinação do posicionamento filogenético dos membros presentes em uma comunidade microbiana (Heuer & Smalla, 1997; Muyzer & Smalla, 1998).

A importância do uso de técnicas moleculares para a avaliação de comunidades microbianas é que estas possibilitam uma avaliação mais abrangente da diversidade e da composição destas comunidades, já que a maior parte dos seus componentes (microrganismos cultiváveis e também os não cultiváveis) pode ser detectada (Kuske *et al.*, 2002). O avanço das técnicas que independem do cultivo de microrganismos tem possibilitado uma avaliação mais detalhada destas populações, através da utilização de métodos moleculares baseados principalmente na amplificação de seqüências de 16S rDNA e a posterior análise dos fragmentos obtidos por DGGE (Muyzer & Smalla, 1998). O número, a posição e a intensidade das bandas no gel de DGGE fornecem uma estimativa do número e abundância relativa das populações numericamente predominantes em uma amostra e permitem a comparação de comunidades microbianas diversas (Boon *et al.*, 2002).

A DGGE vem sendo empregada, recentemente, em centenas de trabalhos de análise de comunidade bacteriana total, baseados no 16S rDNA, permitindo a detecção e monitoramento de membros predominantes da comunidade, os quais são muitas vezes organismos não cultiváveis em laboratório.

A análise de PCR-DGGE baseada nos genes ribossomais *rrs* (16S rDNA e 18S rDNA) permite monitorar mudanças ou detectar diferenças na estrutura de comunidades de bactérias e fungos, respectivamente, presentes em amostras ambientais. O método de PCR-DGGE apresenta algumas vantagens em relação a outros métodos utilizados em ecologia molecular (como por exemplo a T-RFLP), já que permite a extração direta de bandas dos géis para o seqüenciamento (Nakatsu, 2007; Thies, 2007). Entretanto, a utilização de iniciadores universais, baseados nestes genes ribossomais, permite apenas uma identificação parcial, que dificilmente apontará a espécie ou até mesmo o gênero com precisão. Isto porque esses genes são altamente conservados sendo, portanto, pouco discriminativos entre os diferentes grupos taxonômicos. Além disso, muitas vezes apenas uma pequena porção destes genes é avaliada através da PCR-DGGE e isso prejudica ainda mais o poder de discriminação dos genes ribossomais.

Recentemente, outros genes, como o que codifica a subunidade beta da RNA polimerase bacteriana (*rpoB*), começaram a ser utilizados como uma alternativa ao 16S rRNA em estudos taxonômicos de diversos gêneros bacterianos, e estes se mostraram muito mais discriminativos do que o 16S rRNA (Mollet, Drancourt & Raoult, 1997; Renesto *et al.*, 2001; Drancourt & Raoult 2002). Além disso, devido à presença de diferentes cópias do 16S rRNA no genoma de uma mesma bactéria (Nübel *et al.*, 1996), já foram observados resultados ambíguos quando estas diferentes cópias do 16S rRNA foram comparadas entre si (Heyndrickx *et al.*, 1996; Shida *et al.*, 1997; von der Weid *et al.*, 2002).

O método de PCR-DGGE baseado em iniciadores universais para os genes ribossomais é de suma importância para se obter uma visão geral das populações predominantes em um determinado ambiente. Entretanto, populações de grupos taxonômicos que não sejam predominantes, mas que desempenham funções importantes para aquele ambiente (como fixadores de nitrogênio, por exemplo) podem não ser detectadas através dessa metodologia.

Embora haja muitas vantagens no uso da PCR-DGGE baseada em genes ribossomais para análises de comunidades microbianas, devem ser observadas algumas limitações dessa abordagem. Este tipo de análise permite a comparação de

comunidades microbianas complexas, como solo e rizosferas. Entretanto, o número de bandas observadas em cada perfil não pode ser interpretado exatamente como o número de populações presentes na comunidade (Nakatsu, 2007). Em alguns casos, pesquisadores já relataram que um único isolado bacteriano pode produzir múltiplas bandas na DGGE (Nübel *et al.*, 1996; Satokori *et al.*, 2001). Essas múltiplas bandas provavelmente são devido à presença de múltiplas cópias do gene ribossomal 16S no genoma bacteriano. Por exemplo, no genoma de espécies de *Paenibacillus* já foram observadas de duas a 13 bandas (Nübel *et al.*, 1996; da Silva *et al.*, 2003). Mais especificamente, em análises de comunidades de *Paenibacillus*, muitas bandas foram observadas por espécie, tornando os perfis confusos e de difícil interpretação (da Silva *et al.*, 2003). Recentemente diferentes marcadores têm sido propostos como alternativa ao 16S rDNA em estudos de taxonomia e ecologia, principalmente os que apresentam regiões conservadas e variáveis e estão presentes em cópia única em todos os genomas bacterianos já estudados.

1.6. Comunidades de *Paenibacillus* presentes na rizosfera de gramíneas de interesse agrícola

Estirpes pertencentes às espécies *P. polymyxa* (Grau & Wilson, 1962), *P. peoriae* (Montefusco, Nakamura & Labeda, 1993), *P. brasilensis* (von der Weid *et al.*, 2002), *P. graminis* (Berge *et al.*, 2002), *P. odorifer* (Berge *et al.*, 2002), *P. borealis* (Elo *et al.*, 2001), *P. durus* (Seldin, van Elsas & Penido, 1984) e *P. macerans* (Witz, Detroy & Wilson, 1967) têm sido freqüentemente isoladas da rizosfera de diferentes gramíneas de interesse comercial e são consideradas eficientes fixadoras de nitrogênio atmosférico (Berge *et al.*, 2002; da Mota *et al.*, 2002; von der Weid *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2003). Além disso, a capacidade de produzir fitormônios, de suprimir fitopatógenos através de funções antagonistas e de solubilizar fosfato orgânico também já foi descrita em algumas dessas espécies (Mavingui & Heulin, 1994; Lebuhn, Heulin & Hartmann, 1997; Pires & Seldin, 1997; von der Weid *et al.*, 2005).

As espécies de *Paenibacillus* fixadores de N₂ são Gram-positivas, anaeróbias facultativas e capazes de crescer sem dificuldades na ausência de oxigênio. Estirpes pertencentes a estas espécies possuem a capacidade de se diferenciar em endosporos. Estes endosporos possuem um importante papel na resistência das células a uma série de condições adversas do meio ambiente (Priest, 1993).

A espécie *P. polymyxa* é bastante homogênea quanto às suas características fenotípicas, sendo capaz de utilizar vários açúcares com produção de metabólitos ácidos. Além disso, esta espécie apresenta taxas relativamente altas de crescimento e pode ser cultivada em laboratório utilizando-se substratos simples (Priest, 1993). Estirpes de *P. polymyxa* são alvo de grande interesse por parte de diferentes laboratórios de pesquisa. Suas estirpes podem produzir uma infinidade de compostos de grande importância para a indústria, o que talvez justifique este interesse. Os produtos de maior potencial são os antibióticos peptídicos, as proteases, uma enorme gama de enzimas capazes de degradar diferentes carboidratos, tais como, α -amilases, α -D-xilanase, pululanase, glicose-isomerase e poligalacturonato-liase, entre outras (Schaeffer, 1969; Friedberg & Rhodes, 1986; Mallonee & Speckman, 1989; Alvarez et al., 2006).

Em relação à sua importância na agricultura, desde os anos 50, estirpes de *P. polymyxa* vêm sendo descritas como fixadoras de N_2 atmosférico. Esta espécie já demonstrou ter um efeito positivo no crescimento de *Pennisetum* sp. (Kundu & Gaur, 1980), de gramíneas de regiões secas (*Agropyron cristatum*) e do trevo branco (Chanway, Holl & Turkington, 1988; Holl et al., 1988). Outros mecanismos, que não a fixação do N_2 , parecem também ter importância no efeito estimulante sobre as plantas. A produção de substâncias com atividade semelhante ao ácido indol acético pode ser um destes fatores estimuladores do crescimento de *Trifolium repens* e *Lolium perene* (Chanway, Nelson & Holl, 1988). Em 1992, Mavingui e colaboradores descreveram a presença de estirpes de *P. polymyxa* capazes de fermentar o sorbitol em plantações de trigo, sugerindo que esta característica seria a responsável pela interação entre a planta e esta rizobactéria. Além disso, *P. polymyxa* possui a capacidade de agregar o solo, o que pode significar um fator importante na retenção de água e na transferência de nutrientes na rizosfera, através do aumento da porosidade (Gouzou et al., 1993).

Outras características também sugerem a importância desta espécie na agricultura, como a atividade antibacteriana e antifúngica frente à população do solo, rizosfera e rizoplano (Beatty & Jensen, 2002; Dijksterhuis et al., 1999; Mavingui & Heulin, 1994; Piuri, Schanche-Rivas & Ruzal, 1998; Rosado & Seldin, 1993; Seldin et al., 1999; Walker, Powell & Seddon, 1998). Rosado & Seldin (1993) demonstraram que uma estirpe de *P. polymyxa* isolada do cerrado produzia uma nova substância antimicrobiana capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos. Posteriormente, Seldin et al. (1999) iniciaram a caracterização genética desta substância. Outras enzimas líticas, como proteases e quitinases, poderiam também ter

um papel importante na interação patógeno e microrganismo antagônico, como demonstrado por Budi *et al.* (1999).

Outros trabalhos mostram também a interação entre *P. polymyxa* e outros microrganismos, participando de processos importantes como a decomposição de pectina e a fixação de nitrogênio (Khammas & Kaiser, 1992), ou mesmo favorecendo o crescimento de outras espécies (como *Rhizobium etli*), levando a um aumento da nodulação e, conseqüentemente, uma melhoria no desenvolvimento da planta (Petersen, Srinivasan & Chanway, 1996).

Estirpes da espécie *P. macerans*, isoladas com freqüência da rizosfera de diversas gramíneas (Priest, 1993), também poderiam ser consideradas promotoras em potencial do crescimento de plantas, uma vez que também são capazes de fixar o nitrogênio. Além disso, ainda produzem substâncias com atividade antimicrobiana (Fogarty, 1983) que poderiam inibir o desenvolvimento de possíveis fitopatógenos (fungos e/ou bactérias) prejudiciais ao crescimento vegetal. Outro exemplo da utilização desse microrganismo é o fato de que culturas mistas de *Cellulomonas gelida* e *Azospirillum* sp. ou *P. macerans* apresentaram a capacidade de decompôr a celulose da palha de trigo e utilizar a energia dos produtos resultantes para fixar o nitrogênio atmosférico (Halsall & Gibson, 1985). Entretanto, poucos trabalhos foram realizados em regiões de clima tropical e não se sabe praticamente nada sobre o papel desta espécie como rizobactéria promotora do crescimento de plantas (PGPR).

Estirpes de *P. peoriae* foram descritas como semelhantes a *P. polymyxa*, porém diferenciando dessa espécie nas provas de citrato, succinato e glicerol (Montefusco, Nakamura & Labeda, 1993). A capacidade de fixar N₂ foi observada em nosso laboratório em várias estirpes de coleção e em isolados de rizosfera de milho (von der Weid *et al.* 2003).

Um grupo de 16 estirpes formadoras de endósporos foi isolado da rizosfera de plantas e de alimentos processados e estas estirpes foram descritas como pertencentes a novas espécies denominadas *P. graminis* e *P. odorifer*. Ambas as espécies são fixadoras de nitrogênio e a presença do gene *nifH* foi demonstrada nas estirpes-tipo. As estirpes de *P. odorifer* receberam este nome pois estas produzem um aroma típico de fruta. A seqüência do 16S rDNA de ambas as espécies é muito semelhante a de *P. durus* (Berge *et al.*, 2002).

Outra espécie fixadora de nitrogênio, *P. borealis*, foi descrita a partir de estirpes isoladas de húmus de uma floresta na Finlândia e caracterizadas como degradadoras de

carboxi-metil celulose e quitina, além de solubilizadoras de fosfato orgânico (Elo *et al.*, 2001).

Vários trabalhos descreveram o isolamento de estirpes semelhantes às espécies *P. polymyxa* e *P. peoriae*, mas que não se enquadravam 100% em nenhuma das espécies (Budi *et al.*, 1999; von der Weid *et al.*, 2000). A importância maior dessas estirpes era a sua capacidade de produzir substâncias antimicrobianas contra fitopatógenos (fungos e bactérias). Em um destes trabalhos foram caracterizadas, genética e fenotipicamente, 22 estirpes com padrões bioquímicos e moleculares atípicos em relação ao padrão de *P. polymyxa*. Foi determinada a existência de pelo menos dois grupos distintos entre as estirpes analisadas (von der Weid *et al.*, 2000), entretanto, não foi possível ainda concluir a posição taxonômica de um destes grupos. No entanto, todas as estirpes foram capazes de fixar nitrogênio e produzir substância antimicrobiana (com exceção de uma única estirpe). Em relação ao outro grupo, composto por 16 destas estirpes, foi proposta a criação de uma nova espécie denominada *P. brasilensis* (von der Weid *et al.*, 2002). Como mencionado anteriormente, estirpes desta nova espécie são todas fixadoras de nitrogênio, e a estirpe 177 é capaz de produzir uma substância com um espectro de ação bastante amplo, sendo ativa contra diversos fungos e bactérias fitopatogênicas (von der Weid *et al.*, 2005)

Estirpes pertencentes à espécie *P. durus* foram isoladas de solo e da rizosfera de raízes de diferentes gramíneas (Rosado *et al.*, 1998; Seldin, van Elsas & Penido, 1984). Todos os isolados de *P. durus* foram capazes de fixar N_2 com taxas relativamente altas (20 a 240 nmol $C_2H_4/ml/h$), podendo usar N_2 como única fonte de nitrogênio. O mais interessante é a capacidade de suas estirpes de fixar N_2 na presença de altas concentrações de NO_3^- (50 mM), indicando que elas não possuem atividades de nitrato-reductase e podem, portanto, fixar N_2 em solos fertilizados com nitrato (Döbereiner & Pedrosa, 1987).

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar, através de métodos independentes de cultivo de microrganismos, a estrutura de comunidades bacterianas e fúngicas predominantes no solo de cerrado e rizosferas de milho. Além disso, desenvolver e validar novas ferramentas moleculares que possam ser empregadas no estudo de comunidades de *Paenibacillus* presentes na rizosfera de gramíneas de interesse agrícola e em diferentes solos brasileiros, através de abordagens independentes e dependentes de cultivo de microrganismos.

2.1. *Objetivos específicos*

- I. Avaliar, através de métodos independentes de cultivo de microrganismos, a influência da “calagem do solo” (redução da saturação de Al^{+3} de 30 para 0%), sobre as comunidades bacterianas e fúngicas presentes no solo de cerrado e na rizosfera de linhagens de milho sensíveis e tolerantes ao alumínio, em dois estágios do crescimento da planta, 30 e 90 dias após o plantio.
- II. Avaliar uma nova abordagem de PCR e seqüenciamento de parte do gene *rpoB*, como uma alternativa ao gene *rrs*, para a identificação molecular de espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio. Comparar o poder de discriminação de cada um destes genes. Comprovar a capacidade de identificação de isolados de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio obtidos da rizosfera de milho, através da abordagem baseada em *rpoB*.
- III. Desenvolver e validar um sistema de PCR-DGGE específico para *Paenibacillus* baseado no gene *rpoB*, que permita a utilização desse gene como um marcador molecular. Aplicar este novo sistema no estudo de populações deste gênero diretamente em amostras ambientais: solos de cerrado e floresta e rizosferas de quatro cultivares de milho.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Análises de PCR-DGGE baseadas em genes ribossomais das comunidades bacterianas e fúngicas presentes na rizosfera de linhagens de milho (Zea mays L.) sensíveis e tolerantes ao alumínio cultivadas em solo de cerrado sob diferentes condições de estresse*

3.1.1. *Condições experimentais, solo e linhagens de milho*

Os experimentos de campo foram realizados no campo experimental da EMBRAPA Milho e Sorgo, localizado na cidade de Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil (latitude 19° 28' S, longitude 44° 15' W e altitude de 732 m). O clima local é tipicamente de savana de acordo com a classificação de Köppen. O solo é classificado como um Latossolo vermelho distrófico, fase cerrado, com textura argilosa (6% de areia grossa, 4% areia fina, 12% silte e 78% argila). Neste solo, que é ácido, estão presentes altas concentrações de cátions de alumínio (Al^{+3}), que o tornam tóxico para muitas espécies de plantas. Por esta razão, metade da área do campo experimental foi tratada com calcário magnesiano (2,5 toneladas por hectare) para reduzir a toxidez pelo alumínio e a outra metade da área foi mantida sem a calagem. Análises físico-químicas dos solos tratado e não tratado com calcário foram realizadas antes do plantio por membros da EMBRAPA - Milho e Sorgo. Três linhagens de milho (Cateto, 237/67, L16 e L3) foram obtidas após pelo menos 8 cruzamentos endogâmicos no Programa de Melhoramento Genético da EMBRAPA - Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG). Essas três linhagens de milho foram escolhidas com base em sua tolerância ao alumínio, determinada *in vitro* por membros da EMBRAPA – Milho e Sorgo. Elas foram classificadas como altamente tolerante (L3), moderadamente tolerante (Cateto 237/67) e sensível ao alumínio (L16). A área experimental consistiu de três linhas de 5 metros de comprimento com espaços de 80 centímetros entre as linhas e 20 centímetros entre as plantas, em três réplicas. As três linhagens de milho foram plantadas randomicamente em cada linha e nas duas áreas (tratada e não tratada). Trinta e noventa dias após o plantio, cinco plantas de cada linhagem foram arrancadas e as raízes sacudidas para remover o solo frouxamente aderido. O solo fortemente aderido às raízes das cinco plantas foi coletado e considerado como a rizosfera da planta. Três amostras de solo não-rizosférico foram

coletadas também em cada condição e tempo de amostragem, 30 e 90 dias após o plantio. As amostras foram mantidas a -20°C até a extração de DNA.

3.1.2. Quantificação do crescimento da planta

O crescimento das plantas foi avaliado visualmente (30 e 90 dias após o plantio) e quantificado após 90 dias, com base na metodologia descrita pela AACC (1976) para produção de grãos e massa seca. Amostras constituídas de 5 plantas, escolhidas aleatoriamente, foram obtidas em triplicatas para cada linhagem de milho (Cateto, L3 e L16) e tratamento experimental (solo tratado e não tratado com calcário). As médias de massa seca, obtidas nas diferentes condições, foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. As letras “A” e “B” representam amostras estatisticamente diferentes.

3.1.3. Extração de DNA das amostras de solo e rizosfera

O DNA foi extraído a partir de 0,5 g das amostras de solo e rizosfera, utilizando-se o Fast DNA Spin Kit for Soil (Qbiogene, BIO 101, Systems, USA) de acordo com o manual do fabricante. As concentrações de DNA foram determinadas com o auxílio do aparelho “Gene Quant” (Amersham Pharmacia Biotech, USA). Os DNAs extraídos foram também visualizados após eletroforese em gel de agarose 0,8% para observar a integridade e a pureza do DNA. O DNA obtido foi mantido a 4°C antes de ser usado nas reações de PCR.

3.1.4. Amplificação por PCR do gene que codifica o 16S rRNA

Fragmentos do 16S rDNA bacteriano (correspondentes a região V6-V8 do gene que codifica o 16S rRNA de *E. coli*) foram obtidos com os iniciadores 968F-GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G AAC GCG AAG AAC CTT AC-3') E 1401R (5'-GCG TGT GTA CAA GAC CC-3'). As misturas reacionais continham 1 microlitro do DNA molde (aproximadamente 15ng de DNA), 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 10 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase (Promega) e 0,2 µM de cada iniciador. As condições de amplificação foram 1 x (94°C por 2 minutos), 35 x (94°C por 1 minuto, 48°C por 1,5 minutos, 72°C por 1,5

minutos) e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Foram utilizados controles negativos (sem DNA) em todas as reações de amplificação por PCR. Os produtos de PCR obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (peso/volume) em tampão Tris-Borato-EDTA (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989) a 90 volts por 1 hora a temperatura ambiente. Após o tratamento do gel com uma solução de brometo de etídio (2 µg/ml) por 15 minutos, o gel foi visualizado sob luz ultra violeta. Os produtos de PCR foram mantidos a -20°C até a análise por DGGE.

3.1.5. Amplificação por PCR do gene que codifica o 18S rRNA

Os fragmentos do 18S rDNA das comunidades fúngicas foram obtidos utilizando-se o protocolo de “semi-nested PCR” descrito por Oros-Sichler *et al.* (2006). As misturas reacionais continham 1 µl de DNA molde (aproximadamente 15 ng de DNA), 0,2 µM dos iniciadores NS1 (5'- GTA GTC ATA TGC TTG TCT C -3') e EF3 (5'-TCC TCT AAA TGA CCA AGT TTG-3'), 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 10 mM KCl, 0,2 mM dNTPs, 3,75 mM MgCl₂, 2% (peso/volume) de dimetil sulfoxido e 2 U de *Taq* DNA polimerase. As condições de amplificação foram: 1 x (5 minutos, 94°C) seguido por 25 x (30 s, 94°C; 45 s, 47°C; 3 minutos, 72°C) e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Os produtos obtidos na primeira reação de PCR foram diluídos 500 vezes em água MilliQ estéril e usados como molde para a segunda reação de amplificação com os iniciadores NS1 e FR1-GC (5'- CCC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GCC G AIC CAT TCA ATC GGT AIT -3'). A mistura reacional da segunda reação foi a mesma descrita anteriormente, com exceção dos iniciadores. Por outro lado, a temperatura de anelamento durante o ciclo de PCR da segunda reação foi elevada em 1°C e o número de ciclos reduzidos de 25 para 20. Foram utilizados controles negativos sem DNA em todas as reações de amplificação por PCR. Os produtos de PCR obtidos foram submetidos a eletroforese, corados e visualizados como descrito no item (3.1.4). Os produtos da segunda reação de PCR foram mantidos a -20°C até a análise por DGGE.

3.1.6. Eletroforeses em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

As eletroforeses em gel de gradiente desnaturante foram realizadas utilizando o “Bio-Rad DCode Universal Mutation Detection System” (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Os produtos de PCR (10-15 µl) foram aplicados diretamente sobre géis de

poliacrilamida (6% peso/volume) preparados em tampão TAE 1X (20mM Tris-acetato [pH 7,4], 10mM acetato de sódio, 0,5 mM EDTA disódico) contendo um gradiente desnaturante de uréia e formamida variando de 45-65% para análises do 16S rDNA e 25-40% para análises do 18S rDNA. Os géis foram submetidos à eletroforese por 15 h a 60°C e 100 volts para fragmentos do 16S rDNA e 16 h a 60°C e 150 volts para fragmentos de 18S rDNA. Após a eletroforese, os géis foram corados por 30 minutos com SYBR Green I (Molecular Probes, USA) e fotografados sob luz ultravioleta, usando o equipamento STORM (Amersham Pharmacia Biotech, USA).

3.1.7. Comparação dos perfis de DGGE por Análise de Grupos Hierárquicos e Análise de Componentes Principais

Para cada gel de DGGE, foram construídas matrizes, indicando a presença ou ausência (1 ou 0, respectivamente) de bandas nos perfis das comunidades bacterianas ou fúngicas. Essas matrizes foram posteriormente submetidas a duas análises estatísticas multivariadas: (1) Análise de grupos hierárquicos (AGH) e (2) Análise de componentes principais (PCA). A análise de grupos hierárquicos foi realizada usando o coeficiente de similaridade de DICE e o método de agrupamento UPGMA (“unweighted pair group method with arithmetic mean”) com o software NTSYS (versão 2.02, Exeter Software, Setauket, USA). Para validar os grupos obtidos com a análise de grupos hierárquicos (AGH), os dados das matrizes foram também submetidos à análise de componentes principais (PCA) através do software STATISTICA 6.0.

3.1.8. Clonagem e seqüenciamento de bandas de DGGE

Algumas bandas foram retiradas dos géis de DGGE e purificadas de acordo com o manual do kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen #28704). Após a purificação, os fragmentos de DNA foram clonados usando o vetor pGEM-T Easy, de acordo com as instruções do fabricante (Promega, USA). As transformações de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* da linhagem JM109 foram realizadas em cubetas apropriadas de 0,1 cm, conforme a recomendação do fabricante Biorad (1,8 kvolts, 25 µFD, 200 ohms). As colônias brancas obtidas (que contém inserto) tiveram seus DNAs extraídos conforme as recomendações do fabricante do kit “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” Os insertos foram seqüenciados com os iniciadores M13f (5’-

TAAAACGACGGCCAG-3') e M13r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') de acordo com o protocolo para seqüenciamento de DNA fornecido pelo fabricante do kit "ABI Big Dye Terminator Cycle Sequencing" um seqüenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystem, Foster city, CA, USA). As seqüências obtidas sofram identificadas com os softwares Seqmatch, disponível no sítio do banco de dados RDPII (<http://rdp.cme.msu.edu/>) e o software BLAST-N disponível no sítio do "National Center for Biotechnology Information" (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) com o banco de dados não redundante do GenBank.

3.2. Uso do gene *rpoB* para a identificação de espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio como alternativa ao gene que codifica o 16S rRNA

3.2.1. Estirpes bacterianas e condições de cultivo

Estirpes de referência de diferentes espécies de *Paenibacillus* usadas neste estudo e suas origens estão listadas na Tabela 1. Outras 24 estirpes de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio, previamente isoladas da rizosfera de milho plantado no Brasil (von der Weid *et al.*, 2000; da Mota *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2003) também foram usadas neste estudo. Todas as estirpes foram estocadas aerobicamente a temperatura ambiente em tubos de penicilina contendo meio GB (glucose 1%, peptona de carne 1%, extrato de carne 0,2%, extrato de levedura 0,1%, NaCl 0,5%, pH 7,2) suplementado com 1% de CaCO₃ (peso / volume) e solidificado pela adição de 1,2% ágar (como descrito por Seldin, van Elsas & Penido, 1984). O meio TSB (Trypticase Soy Broth) foi usado para propagar as culturas bacterianas. A temperatura de incubação utilizada foi 32°C.

Tabela 1. Estirpes de referência de espécies de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio usadas neste estudo e os respectivos valores de divergência entre as seqüências dos genes *rpoB* e *rrs* (16S rDNA). (Tabela adaptada do ANEXO 2, da Mota *et al.*, 2004)

Espécie / estirpe	Números de acesso		<i>rpoB</i>							
	16S – <i>rpoB</i>	Origem/Referência	1*	2	3	4	5	6	7	8
1. <i>P. polymyxa</i> LMD 24.16 ^T	D16276 – AY493864	Universidade de Delft, Holanda		0,056	0,051	0,197	0,196	0,184	0,187	0,198
2. <i>P. brasilensis</i> PB172 ^T	AF273740 – AY493868	(von der Weid <i>et al.</i> , 2002)	0,009		0,027	0,197	0,194	0,188	0,190	0,204
3. <i>P. peoriae</i> HSCC 353 ^T	D78476 – AY493865	Dr. O. Shida, (Shida <i>et al.</i> , 1997)	0,017	0,021		0,202	0,199	0,184	0,198	0,214
4. <i>P. macerans</i> LFB 126 ^T	X60624 – AY493863	Universidade de Delft, Holanda	0,053	0,054	0,060		0,160	0,210	0,194	0,221
5. <i>P. durus</i> (= <i>P. azotofixans</i>) P3L5 ^T	X60608 – AY493867	(Seldin, van Elsas & Penido, 1984)	0,059	0,065	0,065	0,053		0,167	0,148	0,172
6. <i>P. borealis</i> KK19 ^T	AJ011323 – AY493866	Dr. S. Elo, (Elo <i>et al.</i> , 2001)	0,062	0,068	0,066	0,058	0,041		0,086	0,115
7. <i>P. graminis</i> RSA 19 ^T	AJ223987 – AY493861	Dr. O. Berge, (Berge <i>et al.</i> , 2002)	0,072	0,078	0,084	0,062	0,059	0,048		0,112
8. <i>P. odorifer</i> TOD 45 ^T	AJ223990 – AY493862	Dr. O. Berge, (Berge <i>et al.</i> , 2002)	0,061	0,063	0,068	0,059	0,045	0,027	0,045	

16S rDNA

* Os números da parte superior correspondem às espécies listadas na esquerda; ^T estirpe-tipo.

3.2.2. *Preparação dos DNAs genômicos*

O DNA genômico de todas as estirpes de *Paenibacillus* foi extraído usando o kit de isolamento de DNA da Puregene, de acordo com as instruções do fabricante (Gentra System, Minneapolis, MI, USA). As concentrações de DNA foram determinadas por espectrofotometria, com o aparelho “Gene Quant” (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Para os experimentos de hibridação de DNA, o DNA genômico da estirpe tipo da espécie *Paenibacillus graminis* (RSA19^T) foi digerido com 15U da enzima *Hind*III por 20 horas a 37°C, como sugerido pelo fabricante da enzima (Promega, Madison, WI, USA). O produto da digestão de DNA foi então submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% (peso/volume) em tampão Tris-Borato-EDTA (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989) a 20 volts por 16 horas a temperatura ambiente, corados e visualizados como descrito no item 3.1.4.

3.2.3. *Amplificação por PCR de um fragmento do gene rpoB*

Para a amplificação de fragmentos do gene *rpoB* das estirpes de *Paenibacillus*, foi utilizado um par de iniciadores (*rpoB*1698f e *rpoB*2041r) como descrito por Dahllöf, Baillie & Kjelleberg (2000). Para a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), um grampo de GC foi adicionado à porção 5' fosfato do iniciador *rpoB*1698f. As condições de amplificação foram 1x (5 minutos, 95°C), 6 x (30 s, 94°C; 1,5 minutos, 40°C; 1,5 minutos, 72°C), 19x (30s, 94°C; 1,5 minutos 50°C; 1,5 minutos 72°C), com uma extensão final de a 72°C por 10 minutos. A mistura reacional para cada amostra foi realizada no volume final de 50 µl e continha 1 µl de DNA molde (50-100 ng), 10 mM Tris-HCl, pH8,3, 10 mM KCl, 25 pmol de cada iniciador, 2,5 mM de cada deoxinucleotideo trifofatado (dNTP), 20 µg de soro albumina bovina (BSA), 2,6 mM de MgCl₂ e 5 U da enzima *Taq* DNA polimerase. Controles negativos (sem DNA) foram feitos para todas as amplificações. Os produtos de PCR obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose, corados e visualizados como descrito no item 3.1.4.

3.2.4. *Preparação de sondas, “blotting” e hibridação*

Uma sonda para o gene *rpoB* de *P. graminis* foi gerada por PCR. O produto de PCR obtido após a amplificação do DNA genômico da estirpe RSA19^T de *P. graminis* com os iniciadores *rpoB1698f* e *rpoB2041r* foi marcado com DIG (digoxigenin-11-dUTP) usando o protocolo descrito pelo fabricante, Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany). O DNA genômico da estirpe RSA19^T digerido com a enzima *HindIII* (obtido conforme descrito no item *Preparação dos DNAs genômicos*) foi transferido, como descrito por Sambrook, Fritsch & Maniatis (1989), para uma membrana de náilon carregada positivamente. As condições de pré-hibridação e hibridação utilizadas com a sonda marcada com DIG foram as recomendadas pelo manual do kit “DIG Nucleic Acid Detection” (Roche). As membranas de náilon foram submetidas a etapas de lavagem em condições estridentes após a hibridação a 65°C por 16h. Os sinais de homologia foram detectados usando o kit de detecção de quimioluminescência baseado em CSPD da Roche, de acordo com as recomendações do fabricante.

3.2.5. *Análise dos produtos de PCR por DGGE*

A eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) foi realizada com o sistema “DCode Universal Mutation Detection” (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA). Os produtos de PCR (10 µl), obtidos com os iniciadores *rpoB1698f-GC* e *rpoB2041r* foram aplicados diretamente sobre os géis de acrilamida 6% (peso/volume), preparado em tampão TAE 1x (20 mM Tris-acetato [pH 7,4], 10 mM acetato de sódio, 0,5 mM de EDTA disódico), contendo um gradiente desnaturante linear de 45%-70%. Os gradientes foram formados com duas soluções estoques de acrilamida a 6% de (peso/volume), uma sem solução desnaturante e a outra contendo 80% de solução desnaturante que contém 7 M de uréia e 40% (volume/volume) de formamida deionizada com a resina AG501-X8 (Biorad). Os géis foram submetidos à eletroforese por 19 horas a 60°C e 75 volts. Após a eletroforese, os géis foram corados e digitalizados como descrito no item 3.1.6.

3.2.6. Clonagem e seqüenciamento dos produtos de PCR

Os produtos de PCR (sem grampo de GC) de cerca de 375 pb do gene *rpoB* foram clonados em vetores pGEM-T Easy, de acordo com as instruções do fabricante (Promega). As condições de eletroporação, extração de DNA plasmidial e seqüenciamento foram as mesmas descritas no item 3.1.8.

3.2.7. Alinhamento das seqüências e análises filogenéticas

As seqüências do 16S rDNA das estirpes-tipo das oito espécies de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio foram recuperadas do banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e alinhadas como o software Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). As seqüências do gene *rpoB* das estirpes-tipo das oito espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio obtidas neste estudo também foram alinhadas da mesma forma. Foram construídas então árvores filogenéticas pelos métodos de Máxima Parcimônia (MP), Máxima verossimilhança (ML) e Neighbor-joining (NJ) com o software PhyloWin (Galtier, Gouy & Gautier, 1996). O software MEGA 2.1 (Kumar, Tamura & Nei, 1993) foi usado para calcular os valores de distância “p” entre os pares das oito espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio, baseado nas seqüências parciais do gene *rpoB* e nas seqüências completas do 16S rDNA.

3.2.8. Identificação de estirpes de *Paenibacillus* através do *rpoB*

Diferentes isolados de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio foram obtidos a partir da rizosfera de diferentes cultivares de milho durante estudos anteriores (von der Weid *et al.*, 2000, da Mota *et al.*, 2002, da Silva *et al.*, 2003). A identificação de 24 destes isolados foi realizada com o software BLASTN 2.2.3 (Altschul *et al.*, 1997) usando um banco de dados local de seqüências de *rpoB* construído para este propósito. Este banco continha seqüências parciais das espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio e 126 seqüências de *rpoB* de outros genomas bacterianos dos mais diversos grupos taxonômicos depositados no GenBank até setembro de 2003 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>). Além disso, para confirmar a identificação destes isolados, todas as seqüências parciais de *rpoB* de *Paenibacillus* foram alinhadas com o software Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) e foi construída uma árvore

filogenética pelo método de ou Neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987), usando o número de diferenças entre as seqüências como valor de distância. A construção da árvore foi realizada com o software MEGA 2.1 (Kumar, Tamura & Nei, 1993).

3.3. Avaliação da diversidade de espécies de *Paenibacillus* em amostras ambientais através de uma nova abordagem de PCR-DGGE baseada no gene *rpoB*

3.3.1. Estirpes bacterianas e condições de cultivo

As estirpes usadas neste estudo e suas respectivas condições de crescimento estão listadas na Tabela 2. As estirpes de *Paenibacillus* foram estocadas aerobicamente a temperatura ambiente em tubos de penicilina contendo o meio GB sólido (item 3.2.1), enquanto estirpes de *Bacillus* foram estocadas em meio LB sólido (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5% e ágar 1,2%, pH 7-7,2), ambos suplementados com 1% (peso/volume) de CaCO₃. Todas as outras estirpes foram estocadas a -20°C nos respectivos meios de cultura listados na Tabela 2 e suplementados com 20% de glicerol.

Tabela 2. Estirpes bacterianas utilizadas neste estudo e a especificidade do sistema de PCR baseado no iniciador *rpoB*BPAEN. (Tabela adaptada do ANEXO 3, da Mota *et al.*, 2005).

Espécies	Estirpes ^a	Números de acesso - <i>rpoB</i> ^b	Produto de PCR (240 bp)	Condições de Crescimento ^c	Origem/Referência ^d
<i>Paenibacillus macerans</i>	LFB126 ^T	AY493863	+	TSB, 30°C	Dr. L. Rabinovitch, FIOCRUZ, RJ, Brasil
<i>P. durus</i> (= <i>P. azotofixans</i>)	P3L5	AY493867	+	TBN, 30°C	Seldin, van Elsas & Penido (1984)
<i>P. peoriae</i>	HSCC 353 ^T	AY493865	+	GB, 30°C	Dr. O. Shida, Higeta Shoyu Co., Chiba, Japão
<i>P. polymyxa</i>	LMD 24.16 ^T	AY493864	+	GB, 30°C	Universidade de Delft, Holanda
<i>P. brasilensis</i>	PB 172 ^T	AY493868	+	GB, 30°C	Dr. I. von der Weid, IMPPG, RJ, Brasil
<i>P. graminis</i>	RSA19 ^T	AY493861	+	TSB, 30°C	Dr. O. Berge, CNRS-CEA, França
<i>P. borealis</i>	KK19 ^T	AY493866	+	TSB, 30°C	Dr. S. Elo, Universidade de Helsinki, Finlândia
<i>P. odorifer</i>	TOD45 ^T	AY493862	+	TSB, 30°C	Dr. O. Berge
<i>P. pabuli</i>	NRRL B-14213	AY728291	+	TSB, 30°C	Dr. J. D. van Elsas, Universidade de Gröningen, Holanda
<i>P. glucanolyticus</i>	NRRL B-14679 ^T	AY728284	+	TSB, 30°C	Dr. L. K. Nakamura, Centro Nacional de

					Pesquisa Agrícola, Peoria, USA
<i>P. campinasensis</i>	KCTC 0364BP ^T	AY728283	+	TSB, 30°C	Dr. A. S. Rosado, IMPPG
<i>P. thiaminolyticus</i>	DSM7262 ^T	AY728285	+	TSB, 30°C	DSMZ
<i>P. curdlanolyticus</i>	DSM10247 ^T	AY728290	+	TSB, 30°C	DSMZ
<i>P. amylolyticus</i>	DSM11730 ^T	AY728292	+	TSB, 30°C	DSMZ
<i>P. jamilae</i>	DSM13815 ^T	AY728281	+	TSB, 30°C	DSMZ
<i>P. massiliensis</i>	2301065 ^T	AY728294	+	TSB, 30°C	Dr. D. Raoult, Hospital de la Timone, Marseille, França
<i>P. sanguinis</i>	2301083 ^T	AY728287	+	TSB, 30°C	Dr. D. Raoult
<i>P. dendritiformis</i>	Type C	AY728286	+	TSB, 30°C	Dr. D. Gutnick, Universidade de Tel-Aviv, Israel
<i>P. timonensis</i>	2301032 ^T	AY728289	+	TSB, 30°C	Dr. D. Raoult
<i>P. favisposus</i>	GMP01 ^T	AY728288	+	TSB, 30°C	Dr. E. Velasquez, Faculdade de Farmácia, Universidade de Salamanca, Espanha
<i>P. lactis</i>	1871 ^T	AY728282	+	TSB, 30°C	Dr. P. Scheldeman, Departamento de Qualidade de Produtos de origem Animal, Centro de pesquisa agrícola, Bélgica
<i>P. daejeonensis</i>	KCTC3745 ^T	AY728293	+	TSB, 30°C	Dr. J. S. Lee, Instituto de Pesquisa de Biodiversidade e Biotecnologia da Coréia, Yusong, Coréia

<i>P. naphthalenovorans</i>	DSM14203 ^T	AY728280	-	TSB, 30°C	DSMZ
<i>P. ehimensis</i>	KCTC3748 ^T	AY728278	-	TSB, 30°C	Dr. J. S. Lee
<i>P. chondroitinus</i>	NRS1347 ^T	AY728296	-	TSB, 30°C	Dr. L. K. Nakamura
<i>P. alginoliticus</i>	NRS1351 ^T	AY728295	-	TSB, 30°C	Dr. L. K. Nakamura
<i>P. validus</i>	Q1	AY728279	-	TSB, 30°C	Dr. L. K. Nakamura
<i>Bacillus licheniformis</i>	T6-3		-	LB, 30°C	IMPPG
<i>B. subtilis</i>	LF-3		-	LB, 30°C	IMPPG
<i>B. cereus</i>	413		-	LB, 30°C	IMPPG
<i>Escherichia coli</i>	K12		-	LB, 37°C	IMPPG
<i>Staphylococcus aureus</i>	A70		-	TSB, 37°C	Dra. M.C. Bastos, IMPPG
<i>Lactobacillus paracasei</i>	ATCC 4223		-	TSB, 37°C	IMPPG

^a estirpe-tipo (¹); ^b seqüências obtidas com os iniciadores *rpoB*1698f e *rpoB*2041r descritos por Dahllöf, Baillie & Kjelleberg (2000), ^c TSB, “Trypticase soy broth” (BBL); TBN, “Thiamine-biotin medium” (Seldin, van Elsas & Penido, 1984); GB, Glucose broth (Seldin *et al.*, 1999); LB, meio Luria-Bertani; ^d UFRJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, IMPPG, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ.

3.3.2. Cultivares de milho e amostras de solo

As quatro cultivares de milho usadas neste estudo podem ser brevemente descritas como: CMS04 – milho tropical, derivado de germoplasmas caribenho, mexicano e brasileiro, com ciclo tardio e grãos dentados amarelos; CMS11 – milho tropical, derivado de germoplasmas caribenho, tuxpeño e mexicano, com grãos amarelos semi-duros e ciclo de vida intermediário; CMS22 – milho subtropical, derivado de germoplasmas mexicano, caribenho e americano, com grãos dentados amarelos e ciclo de vida intermediário; CMS36 – milho tropical, obtido a partir de linhagens de diferentes origens (cateto, tuxpeño, Eto amarillo, etc), possui ciclo de vida tardio, é muito tolerante ao solo ácido e é muito mais alto do que os demais. As quatro cultivares de milho (*Zea mays*) foram plantadas no solo de cerrado, que é comumente cultivado com milho no Estado de Minas Gerais. As características do solo de cerrado de cerrado já foram anteriormente descritas no item 3.1.1. O campo experimental do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo – EMBRAPA, onde as sementes de milho foram diretamente plantadas no solo era constituído por duas fileiras de 5 metros de comprimento com espaçamento de 90 cm entre as fileiras e 20 cm entre as plantas de um mesmo cultivar. Noventa dias após o plantio, três plantas de cada cultivar de milho foram arrancadas e as raízes sacudidas para retirar o solo frouxamente aderido às raízes. O restante do solo fortemente aderido às raízes foi considerado como sendo a rizosfera da planta. O solo de floresta utilizado é considerado um latossolo vermelho/amarelo (distrófico) com textura média, geralmente encontrado nas regiões semi-áridas do Brasil. A região onde este foi coletado apresentava uma cobertura vegetal complexa, com predominância da Caatinga arbórea, característica da região nordeste do país. As amostras de solo e rizosferas foram mantidas a -20°C até a extração de DNA.

3.3.3. Extrações de DNA

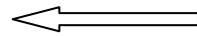
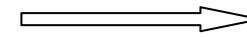
As extrações de DNA genômico foram realizadas utilizando-se o kit de isolamento de DNA da Puregene (Gentra Systems, Minneapolis, USA), a partir de 3 ml das culturas bacterianas crescidas durante uma noite nas condições descritas na Tabela 2. As concentrações de DNA foram mensuradas com o aparelho “Gene Quant” (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Meio grama das

amostras ambientais (solos ou rizosferas) foi usado para extração do DNA com o FastDNA Spin Kit for soil (Qbiogene, BIO 101 Systems, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.3.4. Desenho de iniciadores

Inicialmente foram obtidas seqüências de *rpoB* pertencentes a oito espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio (da Mota *et al.*, 2004) com o par de iniciadores “universais” (*rpoB1698f* e *rpoB2041r*), descritos por Dahllöf, Baillie & Kjelleberg (2000). Essas seqüências de *rpoB*, juntamente com outras 106 seqüências do *rpoB* de genomas de bactérias dos mais diversos grupos taxonômicos depositados no GenBank, foram alinhadas com o software Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). Após o alinhamento, foi encontrada uma região em particular (Figura 1) com características ideais para o desenho de iniciadores específicos para *Paenibacillus*. Então foi desenhado um iniciador reverso (“reverse”) de 20-mer e este denominado *rpoBPAEN* (5’-ATG TTG TCI GAI TCC TTG TT-3’). Este iniciador foi analisado por BLAST-N (Altschul *et al.*, 1997) em busca de seqüências nucleotídicas homólogas no banco de dados GenBank e somente foram encontradas seqüências de *Paenibacillus*. Toda vez que o iniciador “forward” *rpoB1698f* foi utilizado em reações de PCR para DGGE, foi adicionado um grampo de GC à extremidade 5’ deste iniciador.

1791

Localização no gene ^a

1811

^a Localização em <i>E. coli</i> (GeneID: 948488)		5'	A	G	C	A	A	A		G	G	C	G	A	A	T	C	3'					
<i>P. peoriae</i>	5'	A	A	C	A	A	A		C	A	G	T	C	T	G	A	T	A	A	C	A	T	3'
<i>P. brasilensis</i>	5'	A	A	C	A	A	G		C	A	A	T	C	T	G	A	T	A	A	C	A	T	3'
<i>P. polymyxa</i>	5'	A	A	C	A	A	G		C	A	G	T	C	T	G	A	T	A	A	C	A	T	3'
<i>P. macerans</i>	5'	A	A	C	A	A	G		C	A	G	T	C	C	G	A	C	A	A	C	A	T	3'
<i>P. graminis</i>	5'	A	A	C	A	A	G		G	A	T	T	C	A	G	A	C	A	A	C	A	T	3'
<i>P. borealis</i>	5'	A	A	C	A	A	A		G	A	T	T	C	A	G	A	T	A	A	C	A	T	3'
<i>p. odorifer</i>	5'	A	A	C	A	A	A		G	A	C	T	C	A	G	A	C	A	A	C	A	T	3'
<i>P. durus</i>	5'	A	A	C	A	A	G		C	T	G	T	C	C	G	A	C	A	A	C	A	T	3'
Iniciador "reverse" <i>rpoBPAEN</i>	3'	T	T	G	T	T	C		C	T	I	A	G	I	C	T	G	T	T	G	T	A	5'

-----INSERÇÃO-----

Figura 1. Região do alinhamento de seqüências do gene *rpB* de espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio, utilizada para o desenho do iniciador *rpoBPAEN*. O quadrado mostra a inserção de 6 nucleotídeos encontrada somente em seqüências de *Paenibacillus*. Uma inosina foi incorporada ao iniciador onde houve variação de mais de duas bases para a mesma posição. (Figura adaptada do ANEXO 2, da Mota *et al.*, 2005)

3.3.5. Condições de PCR e DGGE

As condições de amplificação por PCR para culturas puras, quando foram usados os iniciadores *rpoB1698f* e *rpoB2041r*, foram as mesmas descritas por Dahllöf, Baillie & Kjelleberg (2000), ou seja, 1 x (5 minutos, 95°C), 6 x (30 segundos, 94°C; 1,5 minutos, 40°C; 1,5 minutos, 72°C), 19 x (30 segundos, 94°C; 1,5 minutos, 50°C; 1,5 minutos, 72°C) e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. As misturas reacionais continham o volume final de 50 µl, sendo 1 µl de DNA molde (50-100 ng), 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 10 mM KCl, 25 pmol de cada iniciador, 2,5 mM de cada dNTP, 20 µg de BSA, 2,6 mM de MgCl₂, e 5 U *Taq* DNA polimerase. Quando foram utilizados os iniciadores *rpoB1698f* e *rpoBPAEN*, a temperatura de anelamento utilizada foi de 40°C, o tempo de extensão de 30 segundos e um total de 25 ciclos. As demais condições permaneceram inalteradas. As amplificações das amostras de solo e de rizosfera foram realizadas em duplicata com um “semi-nested PCR”, que consistiu de uma primeira amplificação com os iniciadores *rpoB1698f* e *rpoB2041r* descritos por Dahllöf, Baillie & Kjelleberg (2000). Em seguida, o produto desta primeira reação foi diluído 1:1000 e usado como molde para a segunda reação de PCR com os iniciadores *rpoB1698f* e *rpoBPAEN*. Foram feitos controles negativos (sem DNA) para todas as reações de PCR e os produtos de PCR visualizados após eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio.

As eletroforeses em gel de gradiente desnaturante (DGGEs) foram realizadas com o sistema “DCode Universal Mutation Detection” (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Os produtos de PCR (15 a 25 µl) foram aplicados diretamente sobre os géis de acrilamida (6% peso/volume) preparados em tampão TAE 1x (20 mM Tris-acetato [pH7,4], 10 mM acetato de sódio e 0,5 mM de EDTA disódico), contendo um gradiente desnaturante linear de 45-70%. O gradiente foi formado com soluções estoques de 6% de acrilamida sem desnaturante ou contendo 80% de desnaturante (7M de uréia e 40% [volume/volume] formamida deionizada com a resina AG501-X8 da Bio-Rad). Os géis foram submetidos à eletroforese por 19 horas a 60°C e 75 volts. Após a eletroforese, os géis foram corados e digitalizados como descrito no item 3.1.6.

3.3.6. *Clonagem e seqüenciamento dos produtos de PCR e análise das seqüências obtidas*

Os produtos de PCR do gene *rpoB* sem o grampo de GC (240 pb), obtidos a partir das amostras de solo, foram clonados no vetor pGEM-T Easy de acordo com as recomendações do fabricante (Promega, Wisconsin, USA). As condições de eletroporação, extração de DNA plasmidial e seqüenciamento foram as mesmas descritas no item 3.1.8.

As seqüências geradas neste estudo e outras seqüências recuperadas de bancos de dados foram alinhadas com o software Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). As árvores filogenéticas foram construídas com o método de Neighbor-joining e distância “p” com o software MEGA 3 (Kumar, Tamura & Nei, 2004). Para identificar as bibliotecas de seqüências foi construído um banco local (*rpoBBANK*) com 2269 seqüências de *rpoB* retiradas do GenBank, mais 127 seqüências de genomas microbianos retiradas do banco de dados Omniome (www.tigr.org) e mais as seqüências de *rpoB* de 27 espécies de *Paenibacillus* obtidas neste estudo. A identidade das seqüências foi determinada pelo primeiro “hit” obtido na análise por BLAST-N (Altschul *et al.*, 1997) usando o banco de dados local contendo 2423 seqüências de *rpoB*.

3.3.7. *Análises estatísticas*

A identificação das seqüências foi seguida pelo o cálculo do índice de cobertura (C) das bibliotecas como descrito por Chelius & Triplett (2001), onde $C = 1 - n_1/N$, e n_1/N é a freqüência de clones que aparecem somente uma vez (n_1) e N é o número total de clones. Uma planilha de Excel foi usada para calcular o índice de Shannon-Wiener, $H' = -\sum_{i=1}^S pi \cdot \ln pi$ (Margelef, 1958) e a Equitabilidade, $E = H'/\ln S$ (Pielou, 1969), onde S é o número de espécies observadas e pi é o número de clones de uma dada espécie dividido pelo total de clones observados. Os dados de DGGE foram colocados em uma matriz baseada na presença ou ausência de bandas nos perfis de DGGE (indicadas por 1 ou 0, respectivamente). Foi construído um dendrograma usando-se o coeficiente de DICE e o método de agrupamento par-a-par, baseado na média aritmética das distâncias (UPGMA).

Para essa análise, foi utilizado o software NTSYS versão 2.02 (Exeter Software, Setauket, New York).

4. RESULTADOS

4.1. *Análises de PCR-DGGE baseadas em genes ribossomais das comunidades bacterianas e fúngicas presentes na rizosfera de linhagens de milho (Zea mays L.) sensíveis e tolerantes ao alumínio cultivadas em solo de cerrado sob diferentes condições de estresse*

4.1.1. *Características físico-químicas dos solos*

Antes do início do plantio das diferentes linhagens de milho (sensíveis e tolerantes ao alumínio), metade da área do campo experimental foi tratada com calcário magnesiano para reduzir a toxidez pelo alumínio e a outra metade da área foi mantida sem a calagem. As características físico-químicas dos solos (tratado e não tratado com calcário) estão apresentadas na Tabela 3. Como esperado, o solo tratado mostrou um aumento no valor de pH e um decréscimo na quantidade de alumínio livre. A saturação de alumínio foi reduzida de 30 para 0% após o tratamento do solo. Também foram observados aumentos nas quantidades de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) após o tratamento com o calcário magnesiano.

Tabela 3. Características físico-químicas dos solos de cerrado tratado e não tratado com calcário. (Tabela adaptada de da Mota *et al.*, submetido, ANEXO 1)

Amostra de solo (0-20 cm)	pH	H + Al	Al	Ca	Mg	K	P	M.O.	Sat
Não tratado	5,0	9,20	0,95	1,72	0,25	100	19	37,8	30
Tratado	6,3	3,58	0,10	4,92	1,71	71	11	35,1	0

H + Al = Acidez potencial (cmolc dm^{-3}); Al = Al^{3+} , alumínio trocável (cmolc dm^{-3}); Ca e Mg = Ca^{2+} e Mg^{2+} trocáveis (cmolc dm^{-3}); K = potássio; P = fósforo; M.O. = matéria orgânica (g kg^{-1} de solo); Sat = saturação do alumínio em %.

4.1.2. *Crescimento das plantas em solo tratado e não tratado com calcário*

Quando cultivado em solo tratado com calcário (0% de saturação de Al), as três linhagens de milho (L3 - altamente tolerante, Cateto 237/67 - moderadamente tolerante e L16 - sensível ao alumínio) se mostraram visualmente maiores e mais saudáveis (Figura 2, I) do que as plantas cultivadas no solo não tratado (com 30% de saturação de Al). Noventa dias após o plantio do milho, a produção de grãos e a massa seca de cada linhagem de milho foram afetadas diferentemente, dependendo da quantidade de alumínio livre no solo. A linhagem de milho L3 apresentou uma redução na produção de grão de cerca de 50% (de 2.464 para 1.243 kg por hectare), a linhagem Cateto mostrou uma redução de 72% (de 1.182 para 332 kg por hectare), enquanto que a linhagem L16 apresentou uma redução de 95% (de 1.348 para 61 kg por hectare), sob a condição de estresse de alumínio (solo não tratado com calcário). Quando as três linhagens foram cultivadas no solo tratado com calcário, elas apresentaram valores similares de massa seca, quando o teste de Tukey foi considerado ao nível de 1% de probabilidade (Figura 1, II). Entretanto, quando foram cultivadas em solo não tratado (com alumínio tóxico), os valores de massa seca obtidos foram significativamente diferentes entre a linhagem L16 e as linhagens Cateto 237/67 e L3 (Figura 2, II). Por essa razão, as linhagens Cateto 237/67 e L3 foram consideradas tolerantes ao alumínio e a linhagem L16 foi considerada sensível ao alumínio.

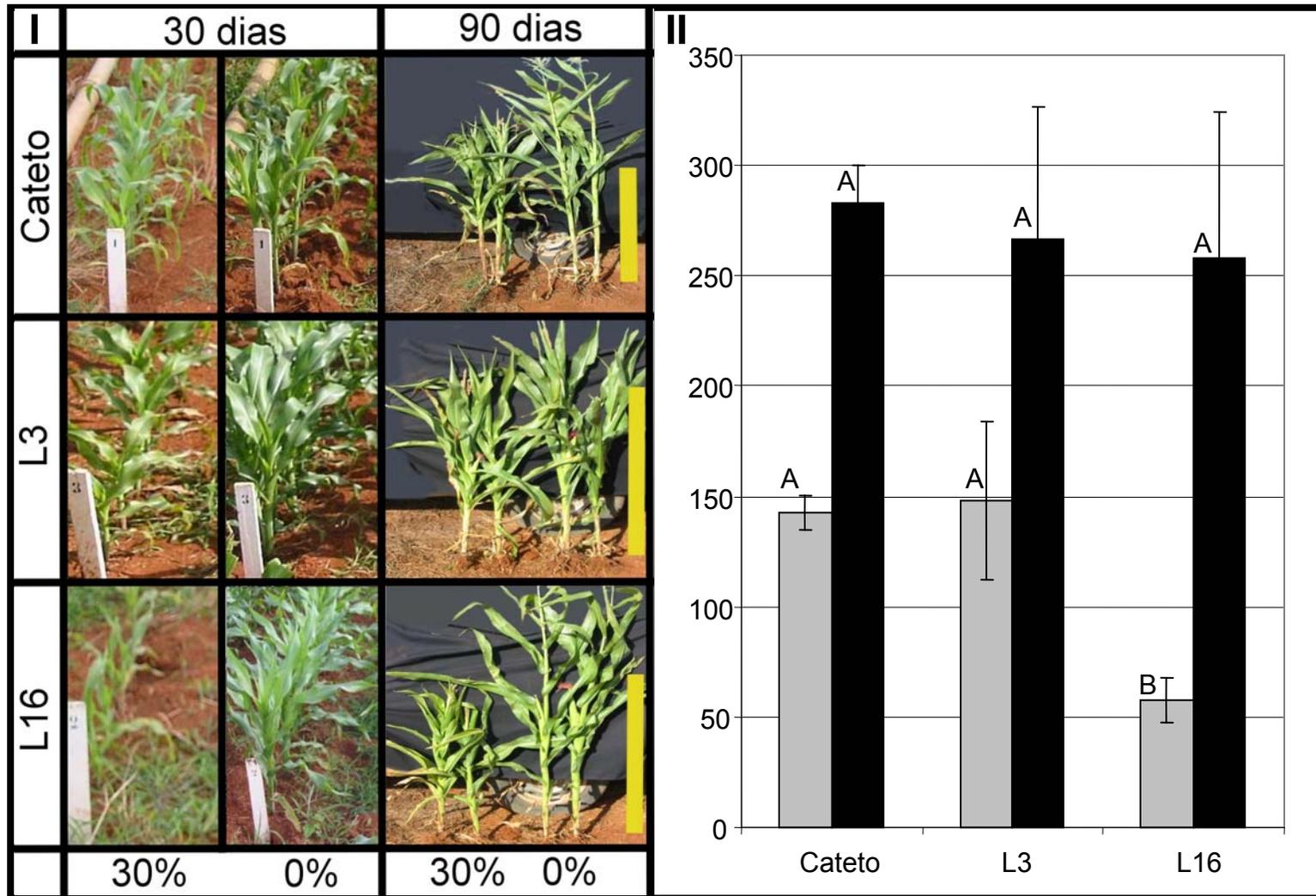


Figura 2. (I) Crescimento das linhagens de milho cultivadas sob o estresse do alumínio (solo não tratado – 30% de saturação de Al) e sem estresse (solo tratado, 0% de saturação de Al), 30 e 90 dias após o plantio em solo de cerrado. (II) Médias das massas secas (gramas de 5 plantas) das linhagens de milho Cateto 237/67, L3 e L16, 90 dias após o plantio. As colunas pretas correspondem às médias obtidas quando as plantas foram cultivadas sem estresse (solo tratado, 0% de sat. de Al) e as colunas cinzas correspondem à condição de estresse (solo não tratado, 30% de sat. de Al). As médias das massas secas obtidas de cada linhagem de milho foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade (A e B representam médias estatisticamente diferentes). (Figura retirada de da Mota *et al.*, submetido, ANEXO 1)

4.1.3. Análise dos perfis de DGGE das comunidades bacterianas

Fragmentos do 16S rDNA bacteriano foram obtidos com os iniciadores 968F-GC e 1401R a partir dos DNAs das diferentes amostras de solo e rizosferas. Estes foram submetidos à DGGE e foram obtidos perfis reproduzíveis entre as réplicas das comunidades bacterianas presentes nas amostras de solo e rizosfera 30 e 90 dias após o plantio (Figura 3, I e II, respectivamente). Estes perfis de DGGE foram usados para a construção de dendrogramas usando a análise de agrupamento hierárquico. Trinta dias após o plantio do milho (Figura 3, I), os perfis das linhagens Cateto, L3 e L16 foram agrupados juntos, de acordo com o tratamento do solo, com e sem calcário (Figura 3, I). As amostras de solo não-rizosférico, tratado e não tratado, também foram agrupadas juntas, porém formando um outro grupo. Os perfis de DGGE da comunidade bacteriana presente no solo não-rizosférico foram mais similares (66% de similaridade) aos perfis da comunidade bacteriana presente nas rizosferas de milho cultivadas sob a condição de estresse por alumínio (solo não tratado – 30% Al), do que as cultivadas no solo tratado com calcário (0% Al). Os perfis de DGGE das linhagens de milho cultivadas em solo não tratado e tratado apresentaram apenas 31% de similaridade e, em ambos os casos, as linhagens L3 e L16 se mostraram mais próximas entre si do que a linhagem Cateto. Os perfis de DGGE da comunidade bacteriana presente nos solos tratado e não tratado com calcário foram separados em 83% de similaridade, indicando um pequeno efeito da calagem após 30 dias.

Noventa dias após o plantio (Figura 3, II), os perfis de DGGE da comunidade bacteriana presente nas linhagens Cateto, L3 e L16 foram agrupados em 61% de similaridade, formando dois grupos de acordo com o tratamento do solo. Os perfis das linhagens L3 e L16 obtidos do solo tratado apresentaram 100% de similaridade, e a linhagem Cateto se diferenciou mais uma vez, mostrando cerca de 90% de similaridade com as demais linhagens. Após o período de 90 dias, os perfis obtidos dos solos não-rizosféricos foram separados dos perfis da comunidade bacteriana presente nas rizosferas em aproximadamente 40% de similaridade. As amostras de solo não-rizosférico, tratado e não tratado com calcário, foram separadas em 49% de similaridade, indicando um aumento da influência do calcário ao longo do tempo sobre a comunidade bacteriana do solo de cerrado.

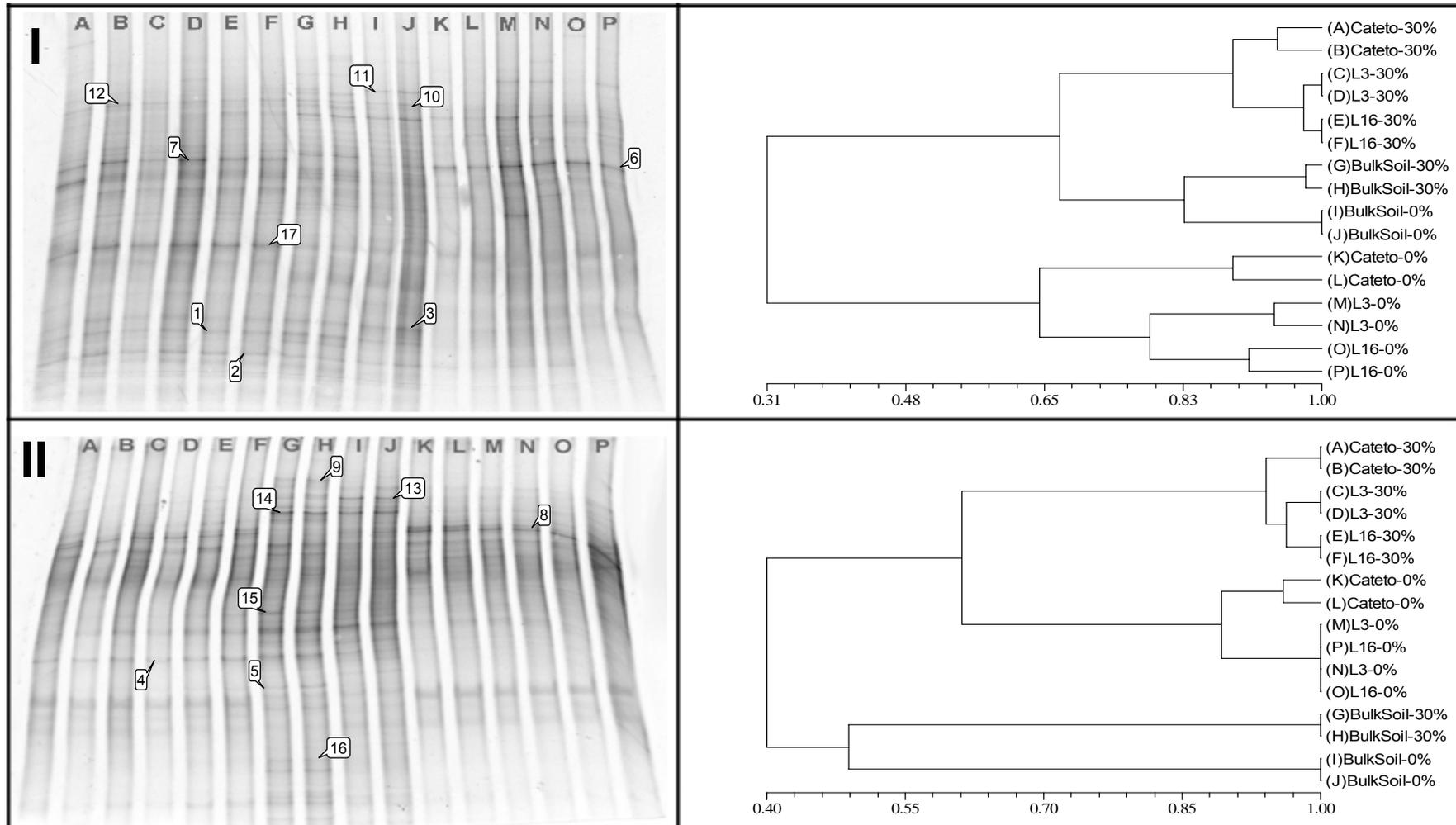


Figura 3. Perfis de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) do 16S rDNA da comunidade bacteriana presente em amostras de solo não-rizosférico e rizosferas das linhagens de milho Cateto 237/67, L3 e L16. Géis obtidos a partir das amostragens realizadas 30 e 90 dias após o plantio do milho (I e II, respectivamente) em condições de estresse por Al (30%) e não estressante (0%) e os respectivos dendrogramas. As canaletas A a P nos géis de DGGE correspondem às mesmas letras apresentadas nos dendrogramas. Os números nos perfis indicam as bandas que foram extraídas dos géis e submetidas à clonagem e ao seqüenciamento. (Figura retirada de da Mota *et al.*, submetido, ANEXO 1)

4.1.4. Análise das seqüências das bandas extraídas da DGGE

Algumas bandas dos perfis de DGGE da comunidade bacteriana (indicadas com números na figura 3, I e II) foram extraídas dos géis de DGGE e submetidas à clonagem e ao seqüenciamento. As identificações das bandas são apresentadas na Tabela 4. Trinta dias após o plantio, os perfis das rizosferas sem estresse (solo tratado) mostraram uma banda dominante identificada como pertencente à ordem Burkholderiales, próxima ao gênero *Herbaspirillum* (banda 6, Figura 3, I e Tabela 4). Por outro lado, os perfis de DGGE da comunidade bacteriana obtidos a partir das rizosferas de plantas cultivadas na condição de estresse por alumínio (solo não tratado, Figura 3 canaletas A-F) e todos os solos não-rizosféricos (Figura 3, canaletas G-J) revelaram muitas bandas dominantes, identificadas como Actinobacteria (bandas 1, 2 e 3) e Rizobiales (bandas 10, 11 e 12) (Figura 3, I e Tabela 4). Foi observada uma banda dominante identificada como Xanthomonadales (banda 17) em rizosferas sob estresse (solo não tratado). Noventa dias após o plantio, muitas populações dominantes (Figura 3, II, bandas 13 e 14) identificadas como Rhizobiales (Tabela 4) foram detectadas nos perfis de solo não-rizosférico, mas não em rizosfera de plantas adultas. A banda 4, identificada como Actinomycetales (Tabela 4), prevaleceu nos perfis de solos rizosféricos e não-rizosféricos do solo não tratado (canaletas A-H). A banda 8, identificada com Burkholderiales, foi observada principalmente em perfis obtidos em amostras de rizosferas obtidas na condição não estressante (solo tratado). Foram observadas populações de Clostridiales (Figura 3, II, banda 9), Actinomycetales (banda 5) e Rubrobacterales (bandas 15 e 16) principalmente no solo não-rizosférico não tratado (Figura 3., II, canaletas G-H).

Tabela 4. Identificação das bandas de DGGE das comunidades bacterianas, obtidas 30 e 90 dias após o plantio, pelos softwares SeqMatch do RDP (Ordem) e BlastN do NCBI (primeiro hit). (Tabela adaptada de da Mota *et al.*, submetido, ANEXO 1).

Bandas	SeqMatch (RDP) (ordem)	Primeiro hit (número de acesso e descrição)- BLAST (NCBI) 20/01/2007	Max. ident.	E- value
1	Actinomycetales	AY360165.1 <i>Micromonospora</i> sp. i19	97%	0.0
2	Actinomycetales	AY917754.1 bactéria não cultivada clone 1969b-35	98%	0.0
3	Actinomycetales	AY326627.1 bactéria não cultivada de solo clone 1202-2	97%	0.0
4	Actinomycetales	AY963437.1 bactéria não cultivada clone AS77	100%	2,00E- 63
5	Actinomycetales	AY326625.1 bactéria não cultivada de solo clone 1309-2	98%	0.0
6	Burkholderiales	DQ129238.1 bactéria não cultivada clone AKIW521	99%	0.0
7	Burkholderiales	AF297697.1 <i>Telluria mixta</i>	99%	0.0
8	Burkholderiales	DQ822441.1 bactéria não cultivada clone WHEATSIP	92%	2,00E- 61
9	Clostridiales	DQ129281.1 bactéria não cultivada clone AKIW496	94%	0.0
10	Rhizobiales	AJ863369.1 bactéria não cultivada clone 17RHF28	94%	2E-163
11	Rhizobiales	DQ404786.1 bactéria não cultivada clone 661238	100%	2,00E- 88
12	Rhizobiales	AY917421.1 bactéria não cultivada clone 1700a-25	98%	0.0
13	Rhizobiales	AY845962.1 bactéria não cultivada de solo clone G1-21	98%	0.0
14	Rhizobiales	AJ863369.1 bactéria não cultivada clone 17RHF28	96%	2,00E- 163
15	Rubrobacterales	AY395403.1 bactéria não cultivada Rubrobacteridae clone EB1084	92%	4,00E- 168
16	Rubrobacterales	AY321277.1 bactéria não cultivada clone SM-OTU59	89%	4,00E- 112
17	Xanthomonadales	AY321255.1 bactéria não cultivada clone SM-OTU37	99%	0.0

4.1.5. Análise dos perfis de DGGE das comunidades fúngicas

Como observado para as comunidades bacterianas, também foram observados perfis de DGGE reprodutíveis entre as réplicas do 18S rDNA das comunidades fúngicas, tanto para amostras de solo como para amostras de rizosfera nos dois tempos de amostragem (Figura 4, I e II). Em geral, foram observados perfis mais estáveis nas comunidades fúngicas quando comparados com os obtidos nas comunidades bacterianas. Trinta dias após o plantio do milho (Figura 4, I), os perfis das três linhagens de milho (Cateto, L3 e L16) foram agrupadas de acordo com o tratamento do solo. As amostras de ambos os solo não-rizosféricos (tratado e não tratado) formaram um grupo em separado. Os perfis das amostras de solo não-rizosférico foram mais semelhantes aos das amostras rizosféricas obtidas na condição de estresse (solo não tratado) do que aos perfis obtidos nas rizosferas sem estresse (solo tratado). As amostras de solo não-rizosférico tratadas e não tratadas foram separadas em 84% de similaridade, indicando um fraco efeito da calagem após 30 dias. As comunidades fúngicas obtidas das rizosferas sob estresse e sem estresse, claramente diferiram nos perfis de DGGE e foram agrupadas separadamente (57% de similaridade).

Noventa dias após o plantio (Figura 4, II), os perfis das três linhagens de milho cultivadas no solo tratado formaram um único grupo. A mesma situação foi observada nos perfis obtidos das rizosferas de milho cultivadas no solo não tratado. Os perfis das amostras rizosféricas obtidas no solo tratado e não tratado foram separadas em 52% de similaridade. Noventa dias após o plantio, os perfis de DGGE obtidos do solo não-rizosférico e das rizosferas obtidas no solo tratado apresentaram cerca de 70% de similaridade.

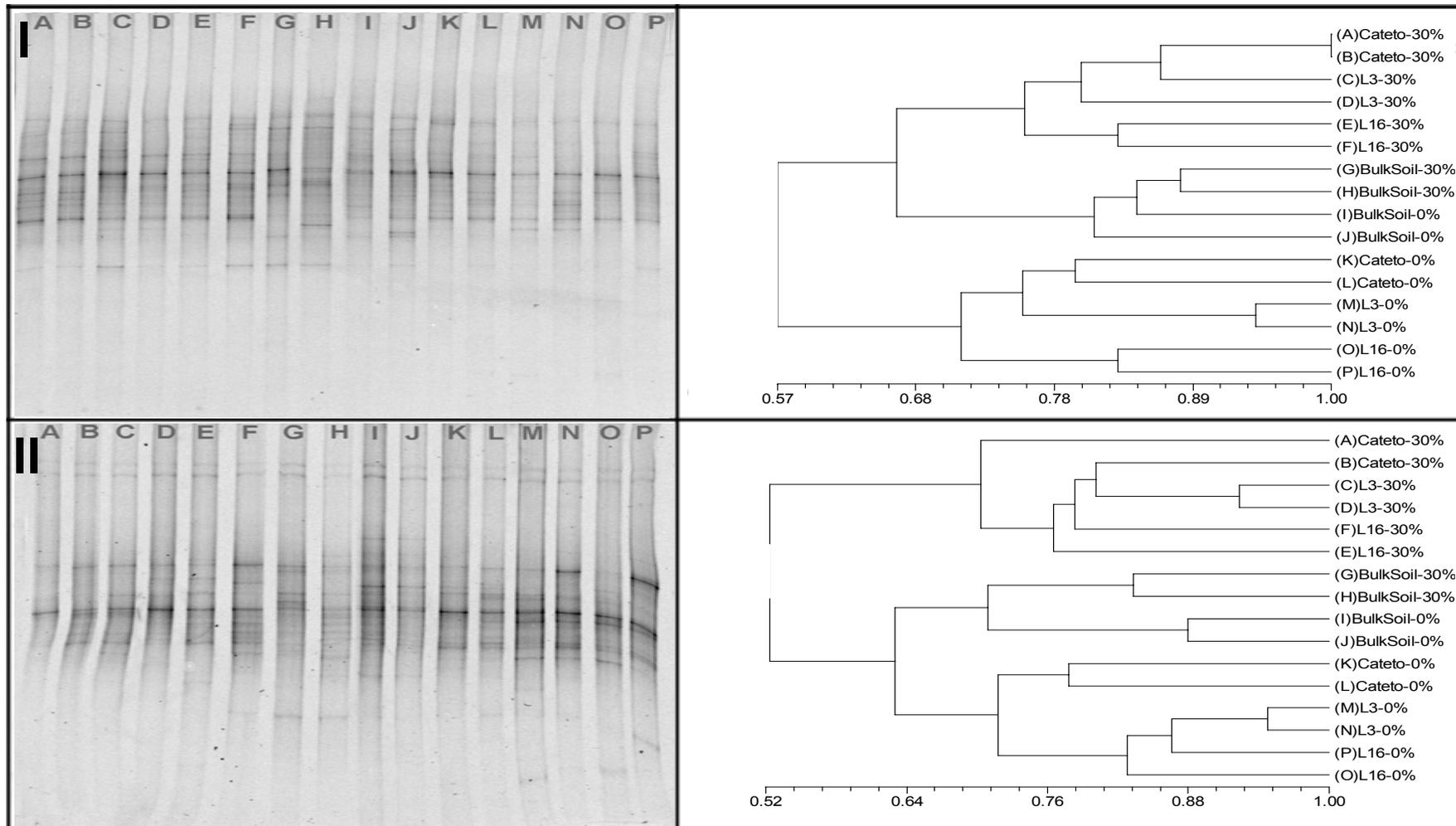


Figura 4. Perfis de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) do 18S rDNA da comunidade fúngica presente em amostras de solo não-rizosférico e rizosferas das linhagens de milho Cateto 237/67, L3 e L16. Géis obtidos a partir das amostragens realizadas 30 e 90 dias após o plantio do milho (I e II, respectivamente) em condições de estresse por Al (30%) e não estressante (0%) e os respectivos dendrogramas.. As canaletas A a P nos géis de DGGE correspondem às mesmas letras apresentadas nos dendrogramas. (Figura retirada de da Mota *et al.*, submetido, ANEXO 1)

4.1.6. Efeito da calagem do solo e das diferentes linhagens de milho sobre a estrutura das comunidades microbianas

Foi utilizada a análise de componentes principais para avaliar o efeito das diferentes linhagens de milho e do tratamento do solo com calcário (calagem) sobre a estrutura das comunidades bacterianas e fúngicas das rizosferas e solos não-rizosféricos (Figura 5). As comunidades microbianas (bacterianas e fúngicas) foram separadas em quatro grupos: amostras obtidas do solo não-rizosférico não tratado (β), solo não-rizosférico tratado (γ), rizosferas sob o estresse do alumínio (α) e rizosferas sem estresse (δ). A única exceção foi observada nas comunidades fúngicas do solo não-rizosférico obtida 30 dias após o plantio (Figura 5, C).

As diferenças nas estruturas das comunidades bacterianas e fúngicas do solo não tratado (β) e tratado (γ) foram mais pronunciadas ao longo do tempo. As populações bacterianas de ambos os solos foram divididas em dois grupos já em 30 dias, mas somente foi observada uma maior distância dos grupos após 90 dias do plantio (Figura 5 A e B, respectivamente). As populações fúngicas dos solos não-rizosféricos tratado e não tratado não foram separadas após trinta dias do plantio (Figura 5 C). Esta separação somente foi observada com clareza 90 dias após o plantio (Figura 5 D). Além disso, só foram observadas pequenas diferenças entre as comunidades microbianas obtidas a partir das diferentes linhagens de milho estudadas (Cateto, L3 e L16). Por esse motivo, essas comunidades formaram um único grupo na PCA. Entretanto, as comunidades bacterianas das rizosferas sob estresse (α) e saudáveis (δ) mostraram uma tendência em se agrupar de forma mais próxima ao longo do crescimento da planta (Figura 5, C e D). Os resultados obtidos nos dendrogramas (análise de grupos hierárquicos) foram condizentes com os obtidos na análise de componentes principais (PCA), revelando uma grande consistência dos dados obtidos.

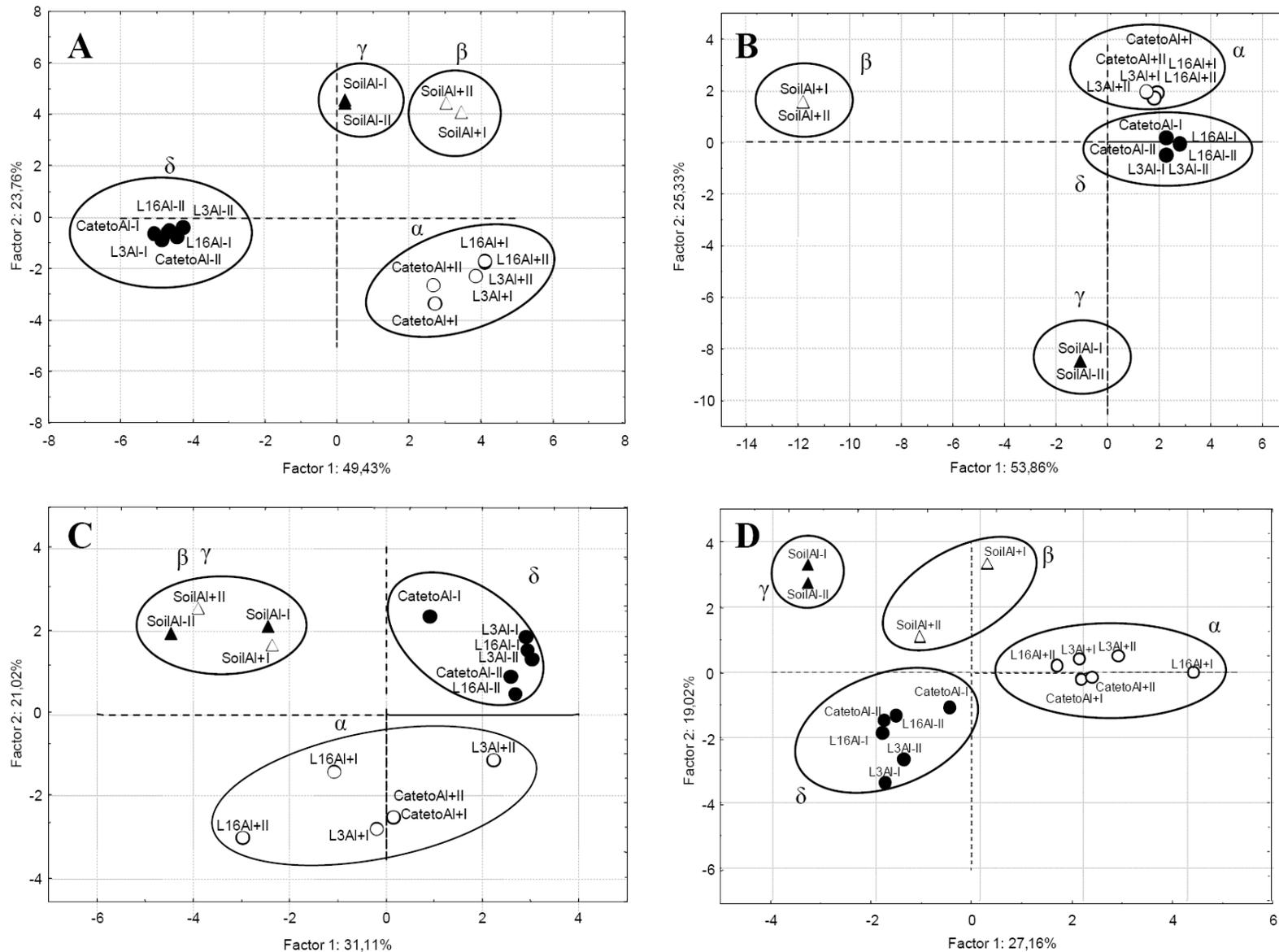


Figura 5. Análise de Componentes Principais a partir dos perfis de DGGE das comunidades microbianas. (A) e (B) representam as comunidades bacterianas obtidas 30 e 90 dias após o plantio, respectivamente; (C) e (D) representam as comunidades fúngicas obtidas 30 e 90 dias após o plantio, respectivamente. Grupos formados pelas comunidades microbianas do solo não tratado (β), solo tratado (γ), rizosferas sob estresse do A (α) e rizosferas não estressadas (δ). (Figura retirada de da Mota *et al.*, submetido, ANEXO 1)

4.2. Uso do gene *rpoB* para a identificação de espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio como alternativa ao gene que codifica o 16S rRNA

Diferentes marcadores têm sido propostos como uma alternativa ao 16S rDNA em estudos de taxonomia e ecologia, principalmente os que apresentam regiões conservadas e variáveis e estão presentes em cópia única em todos os genomas bacterianos já estudados. O gene *rpoB* é um exemplo deste marcador, entretanto, nada se conhecia a seu respeito no genoma de *Paenibacillus*.

Para confirmar a presença de apenas uma cópia do gene *rpoB* no genoma de espécies de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio, o DNA genômico da estirpe *P. graminis* RSA19^T (digerido com *Hind*III) foi hibridado com uma sonda para o gene *rpoB*. Esta sonda marcada com DIG foi gerada por PCR a partir do genoma da própria estirpe RSA19^T e os iniciadores *rpoB*1698f e *rpoB*2041r. Foi observada a presença de somente uma banda de aproximadamente 4 kb (Figura 6 a, b). Como o tamanho esperado para o gene *rpoB* de bactérias Gram-positivas é de cerca de 3,5 kb, acreditamos então que o gene *rpoB* está presente em uma única cópia, pelo menos no genoma de *P. graminis*. É provável que o mesmo resultado seja obtido para outras espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio, uma vez que até o momento nenhum genoma bacteriano completamente seqüenciado apresentou múltiplas cópias desse gene (Dahlöf, Baillie & Kjelleberg, 2000, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

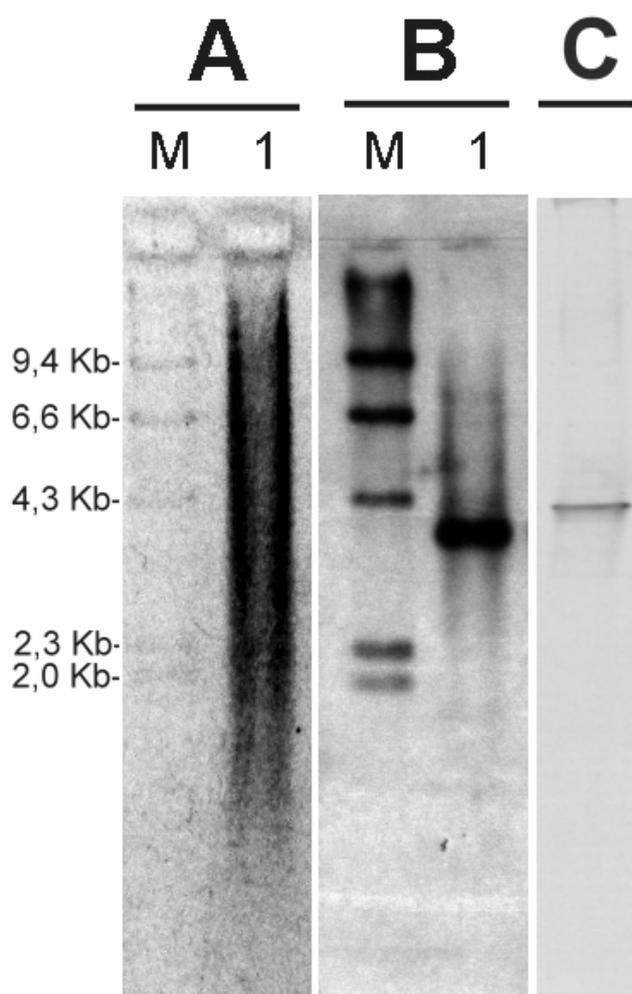


Figura 6. Marcador de tamanho molecular composto de DNA de fago lambda marcado com digoxigenina e digerido com a enzima *HindIII*. (M); DNA de *P. graminis* (RSA19^T) digerido com a enzima *HindIII*. (1); Eletroforese em gel de agarose (A); Perfil de hibridação com a sonda para o gene *rpoB* marcada com digoxigenina (B); Banda única visualizada após a DGGE do produto de PCR do gene *rpoB* obtido com o DNA da estirpe tipo de *P. graminis* RSA19^T (C). (Figura retirada do ANEXO 2, da Mota *et al.*, 2004)

As seqüências do 16S rDNA de oito estirpes de referência de espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio (Tabela 1) foram recuperadas do GenBank e comparadas entre si. Os valores de similaridade entre as seqüências estão apresentados na Tabela 1. Foram observados valores de similaridade entre as seqüências analisadas na faixa de 91,6 a 99,1%, indicando uma alta similaridade entre as espécies do grupo dos *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio.

O gene *rpoB* foi então amplificado a partir do DNA das mesmas estirpes-tipo de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio e os iniciadores *rpoB1698f* e *rpoB2041r* (gerando fragmentos de 375 pb). Estes fragmentos de PCR foram seqüenciados e as seqüências nucleotídicas obtidas foram comparadas entre si. Um banco de dados contendo seqüências do gene *rpoB* de estirpes de *Paenibacillus* (AY493861-AY493868) foi então criado por nós. As oito espécies de *Paenibacillus* estudadas apresentaram similaridades entre 77,9 a 97,3% quando suas seqüências do *rpoB* foram comparadas entre si (Tabela 1), mostrando maior poder de discriminação entre as espécies do que as seqüências do 16S rDNA. Quando as seqüências parciais de *rpoB* foram comparadas com as seqüências completas do gene 16S rDNA, para comparar o poder de discriminação de cada gene, o *rpoB* se mostrou cerca de 3,1 vezes mais discriminativo que o 16S rDNA.

As relações filogenéticas entre as espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio foram inferidas com base em seqüências parciais de *rpoB* e seqüências completas do gene do 16S rRNA, através de diferentes métodos de reconstrução filogenética. Independente do método filogenético utilizado, as árvores filogenéticas apresentaram as mesmas topologias para cada gene (dados não mostrados). A comparação dos resultados obtidos com ambos os genes mostrou resultados congruentes e similares, mas não idênticos. Pequenas diferenças puderam ser observadas nas topologias das árvores. Este fato poderia ser explicado pela escolha da cópia do 16S rDNA analisada. A Figura 7 mostra duas árvores obtidas pelo método de Máxima Parcimônia, onde são apresentados os números de sítios informativos para parcimônia. Quando as seqüências do 16S rDNA foram analisadas (1245 sítios), foram encontrados somente 93 sítios informativos para parcimônia, enquanto 89 sítios informativos para parcimônia foram observados quando as seqüências de *rpoB* foram analisadas (360 sítios). Como podemos observar, as seqüências parciais do gene *rpoB* foram tão informativas quanto as seqüências completas do 16S rDNA.

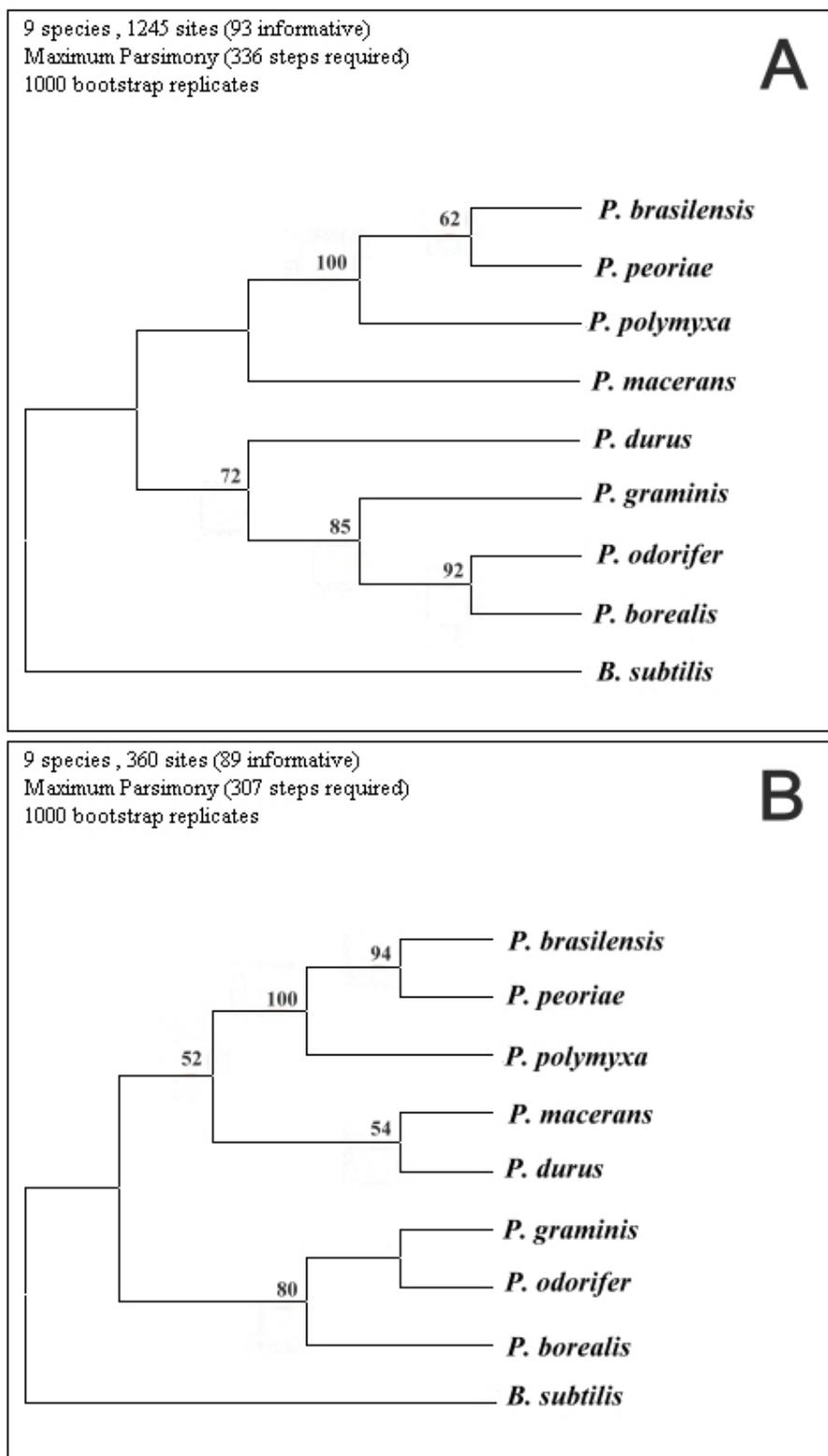


Figura 7. Árvores filogenéticas baseadas nas seqüências do 16S rDNA (A) e *rpoB* (B) mostrando as relações entre as oito espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio. As árvores foram construídas pelo método de Máxima Parcimônia e os resultados do bootstrap (realizado com 1000 replicatas) superiores a 50% são representados a esquerda dos nós dos ramos e expressos em valores de percentagem. (Figura retirada do ANEXO 2, da Mota *et al.*, 2004)

Para demonstrar a utilidade do gene *rpoB* na identificação de estirpes de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio, o DNA obtido de 24 estirpes de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio, previamente isoladas da rizosfera de milho plantado no solo de cerrado ou várzea no Brasil e identificadas em nosso laboratório somente até o gênero, foi amplificado com os iniciadores para o *rpoB* e um produto de 375 pb foi obtido para todas as estirpes testadas. A análise destas seqüências claramente permitiu relacionar todos os 24 isolados a uma das oito espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio. Além disso, a identificação das espécies indicada pelos dados de seqüenciamento parcial do gene *rpoB* foi confirmada com as características fenotípicas de cada um dos isolados (Seldin, van Elsas & Penido, 1984, Berge *et al.*, 2002, da Mota *et al.*, 2002, von der Weid *et al.*, 2002).

A Figura 8 mostra a árvore filogenética obtida pelo método de Neighbor-Joining e a identificação dos 24 isolados, juntamente com o percentual de similaridade calculado com a respectiva seqüência de referência do *rpoB* da estirpe-tipo de cada uma das espécies. As seqüências obtidas mostraram valores de similaridade entre 92% a 99% com uma das seqüências de referência de *Paenibacillus*. Entretanto, foram observadas divergências intra-específicas entre os isolados analisados.

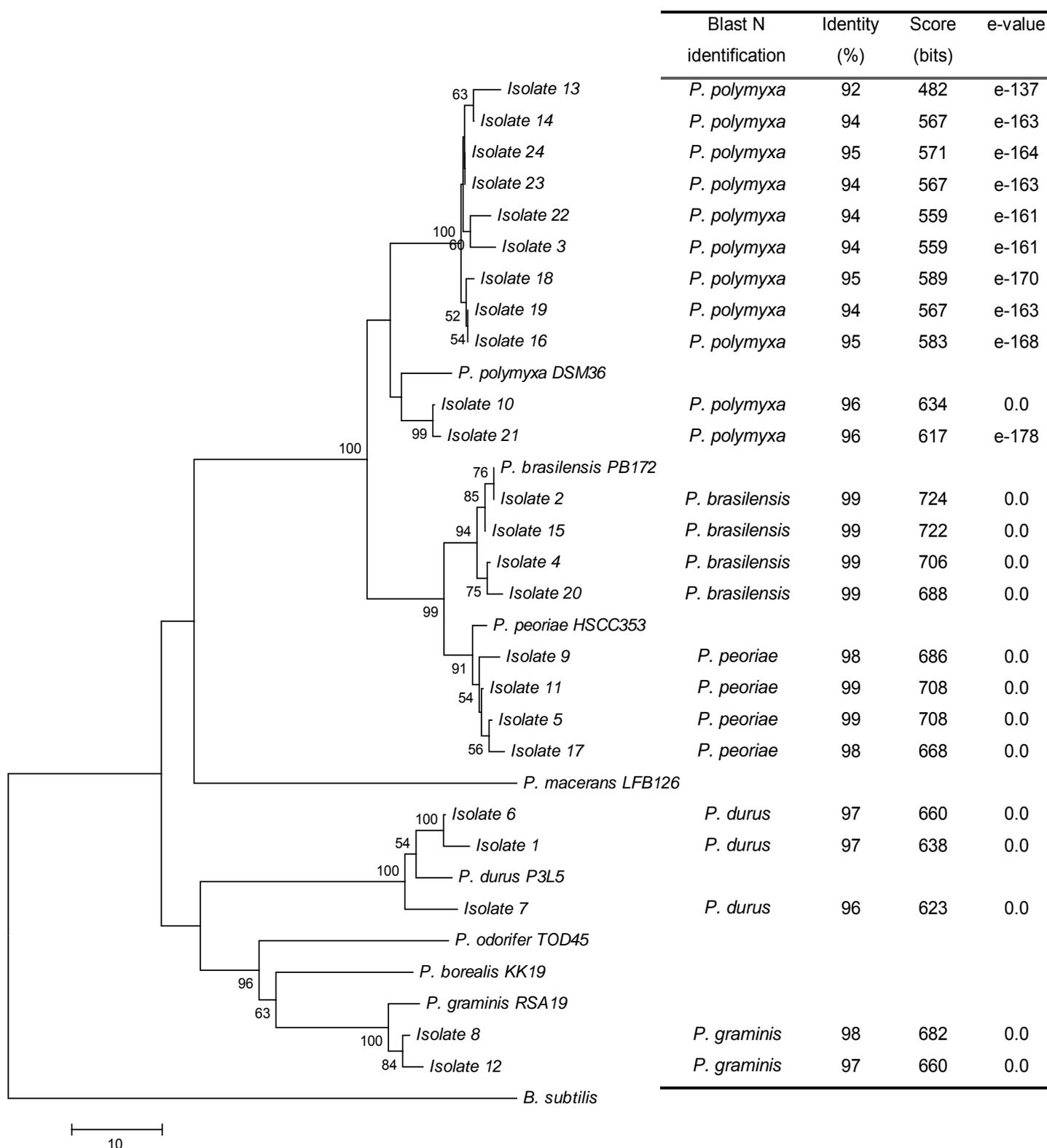


Figura 8. Árvore filogenética das seqüências parciais do gene *rpoB* (375 pares de bases) mostrando as relações entre as oito espécies de *Panibacillus* fixadoras de nitrogênio e os 24 isolados das rizosferas de milho. Esta árvore foi construída pelo método de Neighbor-joining e os resultados do bootstrap (realizado com 1000 replicatas) superiores a 50% são representados a esquerda dos nós dos ramos e expressos em valores de percentagem. A identificação dos isolados (baseada no Blast N do *rpoB*), juntamente com as percentagens de similaridade com a estirpe de referência mais próxima também estão representadas ao lado dos isolados. (Figura retirada do ANEXO 2, da Mota *et al.*, 2004)

4.3. Análise da diversidade de espécies de *Paenibacillus* em amostras ambientais através de uma nova abordagem de PCR-DGGE baseada no gene *rpoB*

4.3.1. Desenho do iniciador *rpoBPAEN* e análise de sua especificidade em culturas puras

No item anterior (4.2), o uso do *rpoB* como ferramenta para estudos taxonômicos foi inicialmente proposto para estirpes de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio. Neste estudo, todas as seqüências de *rpoB* presentes nos bancos de dados foram comparadas com as 8 seqüências de *rpoB* previamente obtidas de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio. Foi observada uma inserção de 6 nucleotídeos em todas as oito espécies de *Paenibacillus* e em mais nenhuma outra espécie presente no banco de dados GenBank. A região dessa inserção (mostrada na Figura 1) foi utilizada então como base para o desenho do iniciador “reverse” *rpoBPAEN*, específico para o gênero *Paenibacillus*. Entre as oito espécies analisadas, foram observadas algumas divergências entre as bases nessa região do alinhamento. Por esse motivo, duas inosinas (I, base complementar às quatro bases A, T, C e G) foram adicionadas à seqüência do iniciador *rpoBPAEN* (5'-ATG TTG TCI GAI TCC TTG TT-3'). Algumas diferenças foram observadas entre o iniciador e as seqüências de *rpoB* previamente obtidas de *Paenibacillus*, entretanto, a especificidade do iniciador não foi afetada nas condições de PCR utilizadas.

A especificidade do iniciador *rpoBPAEN* foi testada juntamente com o iniciador *rpoB1698f* em amostras de DNA de cultura pura pertencentes a outras 19 espécies do gênero *Paenibacillus* e outras sete espécies pertencentes a outros gêneros bacterianos (Tabela 2). Essas espécies de *Paenibacillus* foram escolhidas por representarem diferentes grupos filogenéticos (I a XI) formados com base em seqüências do 16S rDNA (Figura 9). Pelo menos uma espécie de cada grupo foi testada (sete do grupo I, cinco do grupo XI, quatro do grupo V, três do grupo VI, três do grupo IX, duas do grupo III e uma de cada grupo II, IV e X), excetuando os grupos VII e VIII. Quando as espécies pertencentes a outros gêneros foram testadas, não foi detectado produto de PCR. Ao contrário, um produto de aproximadamente 240 pb foi observado em 22 espécies de *Paenibacillus* (Tabela 2). Cinco espécies de

Paenibacillus, pertencentes ao mesmo grupo filogenético com base no 16S rRNA (Figura 9, grupo XI), apresentaram resultados negativos na PCR. Os DNAs obtidos dessas 5 espécies foram então amplificados com os iniciadores “universais” para o gene *rpoB* descritos por Dahllöf, Baillie & Kjelleberg (2000). Após o seqüenciamento destes produtos de PCR, foi observado que a inserção de 6 pares de bases presente nas outras espécies de *Paenibacillus* não estava presente nas espécies desse grupo filogenético. Sendo assim, foi proposta a divisão da árvore filogenética em dois grupos (A e B) como base na presença (grupo A) ou ausência (grupo B) da inserção de 6 pares de bases.

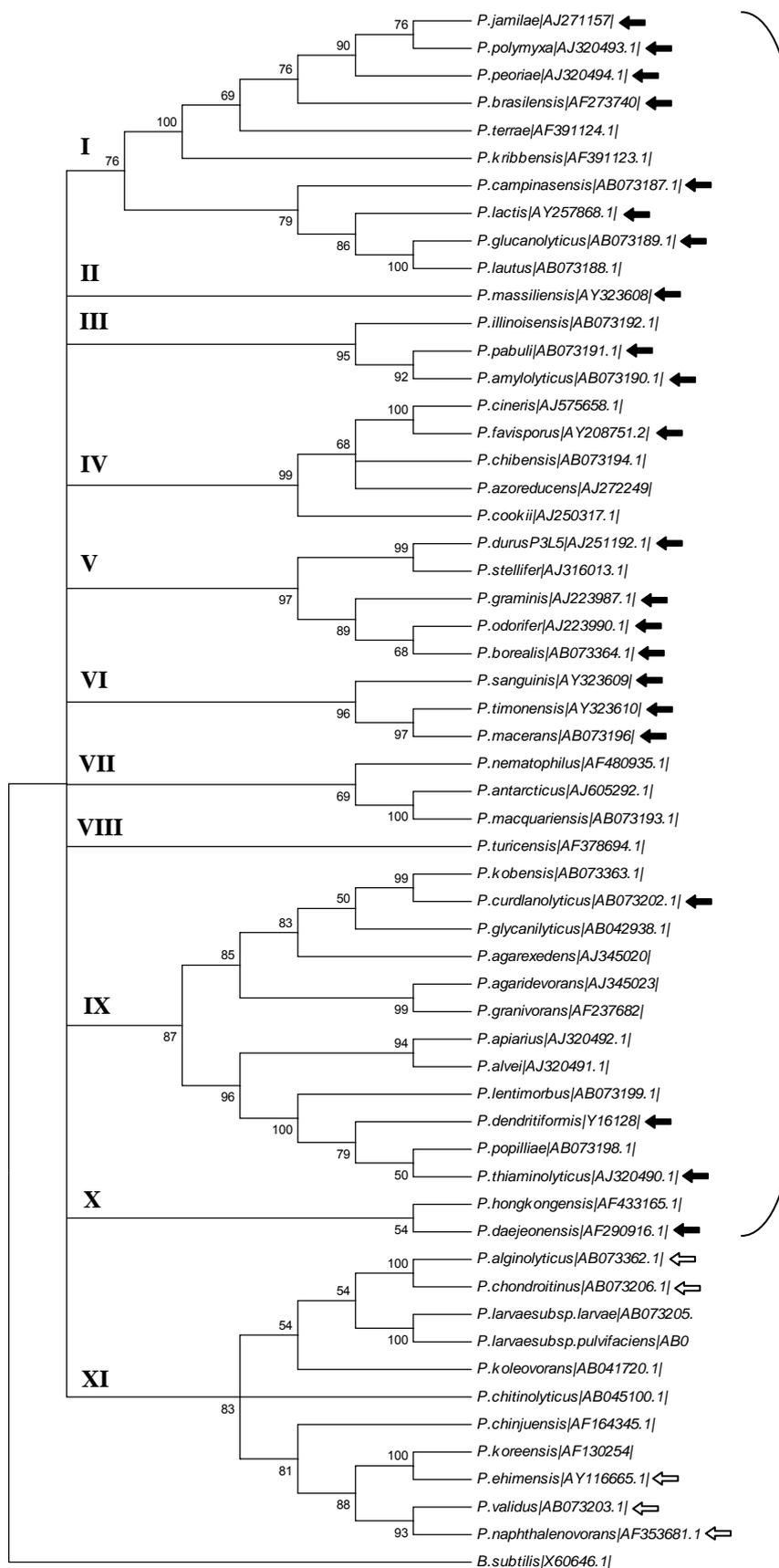


Figura 9. Árvore consenso construída com seqüências completas do 16S rDNA de espécies de *Paenibacillus*. A análise de bootstrap com 1000 replicatas e valores acima de 50% são mostrados na árvore. O número de acesso do GenBank de cada espécie é mostrado entre parênteses. As setas indicam as espécies utilizadas neste estudo. Os ramos filogenéticos foram nomeados com números romanos e os grupos A e B representam, respectivamente, os resultados obtidos na amplificação por PCR com o iniciador *rpoBPAEN*; positivos (setas sólidas) ou negativos (setas ocas). (Figura retirada do ANEXO 3, da Mota *et al.*, 2005)

4.3.2. Bibliotecas de seqüências de *rpoB* derivadas de amostras de solo e suas relações filogenéticas

Para validar o novo iniciador específico para *Paenibacillus* baseado no gene *rpoB* em amostras ambientais, foram construídas bibliotecas de seqüências deste gene derivadas de amostras de solo (cerrado e floresta). O protocolo de extração de DNA de solo utilizado neste trabalho resultou em amostras de DNA com quantidade e qualidade suficientes para sua utilização em reações de amplificação por PCR. Foram obtidos produtos de PCR com os iniciadores *rpoB1698f* e *rpoBPAEN* a partir de ambos os solos. A seguir estes produtos foram clonados dando origem a duas bibliotecas, uma de solo de cerrado (29 clones) e a outra de solo de floresta (33 clones). Os 62 insertos foram seqüenciados e suas seqüências puderam ser relacionadas a uma das seqüências de referência do *rpoB* de *Paenibacillus*. Além disso, para avaliar a diversidade de espécies de *Paenibacillus* nestes dois solos brasileiros, todos os clones foram analisados por BLAST-N. Os resultados confirmaram a grande especificidade do sistema, uma vez que todas as seqüências obtidas nestes dois solos foram atribuídas a espécies de *Paenibacillus* pela análise de BLAST-N. Considerando apenas o primeiro “hit” do BLAST-N, os clones obtidos do cerrado foram relacionados às espécies *P. amylolyticus* (51,7%), *P. graminis* (44,8%) e *P. favisporus* (3,4%) com níveis de similaridade que variaram entre 88-98%. Já os clones obtidos do solo de floresta foram relacionados às espécies *P. favisporus* (36,4%), *P. macerans* (18,2%), *P. amylolyticus* (12,1%), *P. lactis* (9,1%), *P. graminis* (9,1%), *P. thiaminolyticus* (6%), *P. campinasensis*, *P. sanguinis* (3%) e *P. dendritiformis* (3%), com níveis de similaridade que variaram entre 81-98% (Figura 10).

Para determinar se o tamanho das bibliotecas de clones refletia a diversidade real das comunidades, o índice de cobertura das bibliotecas obtidas foi calculado como descrito por Chelius & Triplett (2001), com base na identificação por BLAST-N. O índice de cobertura da biblioteca obtida do solo de cerrado foi de 96,5% da diversidade total e o valor obtido para o solo de floresta foi ligeiramente menor, cerca de 90,9%. Os valores do índice de Shannon-Wiener mostraram uma maior diversidade das populações de *Paenibacillus* no solo de floresta ($H' = 1,86$) do que no solo de cerrado ($H' = 0,82$). Além disso, os valores de equitabilidade também foram maiores no solo de floresta ($E = 0,84$) do que no solo de cerrado ($E = 0,74$).

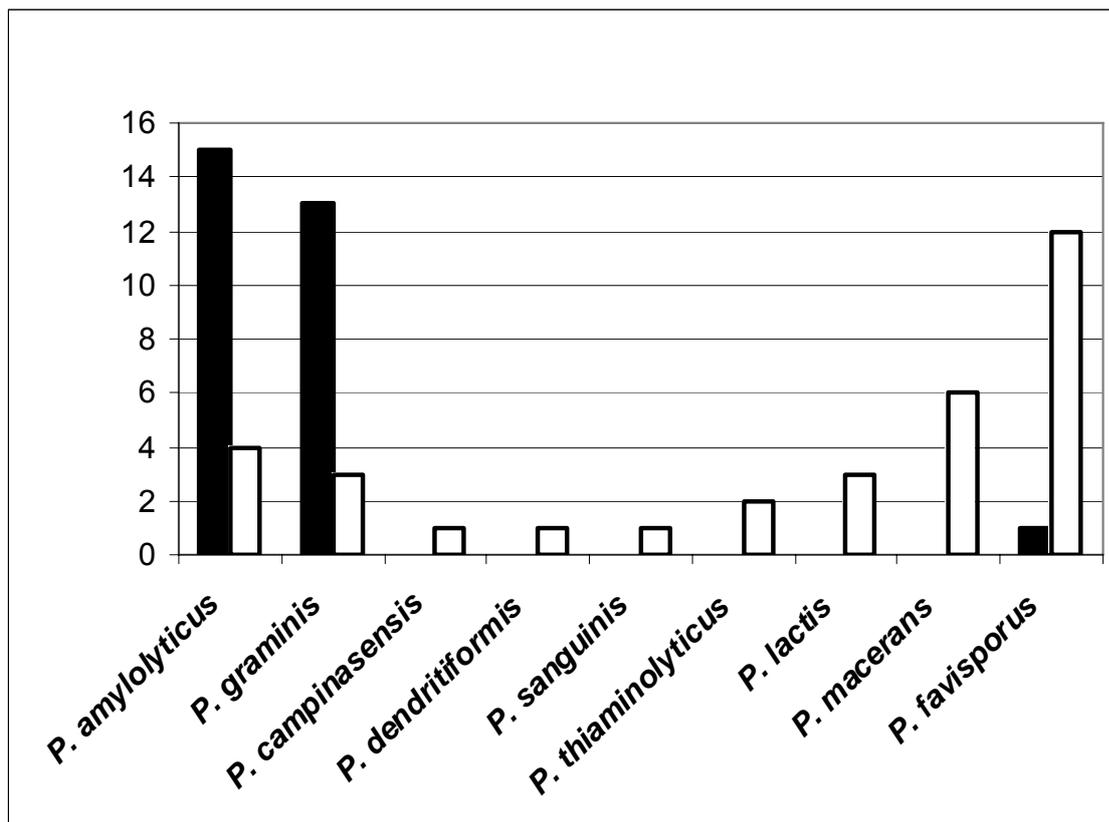


Figura 10. Histograma mostrando os clones obtidos dos solos de cerrado (em preto, 29 clones) e floresta (em branco, 33 clones). A identificação dos clones foi realizada através da análise de BLAST-N utilizando o banco de dados local contendo 2423 seqüências do gene *rpoB*. O primeiro “hit” do BLAST-N obtido para cada clone foi considerado a melhor identificação da espécie, permitindo assim a comparação dos solos. (Figura retirada do ANEXO 3, da Mota *et al.*, 2005)

Finalmente foram realizadas análises filogenéticas com o intuito de relacionar as seqüências de *rpoB* obtidas das amostras ambientais com as seqüências de referência (Figura 11). As seqüências obtidas do solo de cerrado foram agrupadas em 3 ramos principais (Figura 11 A), enquanto as seqüências obtidas do solo de floresta foram agrupadas em 4 ramos (Figura 11 B). Todas as seqüências obtidas dos solos puderam ser relacionadas a uma das 22 seqüências de referência de *Paenibacillus*, com exceção dos clones F8, F9, F43, F57, F67, F68 e F70, obtidos do solo de floresta. Alguns clones relacionados a determinadas espécies de *Paenibacillus* só foram encontrados em um tipo de solo. Por exemplo, seqüências relacionadas à espécie *P. macerans* foram observadas apenas no solo de floresta (Figura 11, B2). Muitas seqüências relacionadas à espécie *P. favisporus* foram observadas no solo de floresta, enquanto somente uma seqüência relacionada a essa espécie foi observada no solo de cerrado.

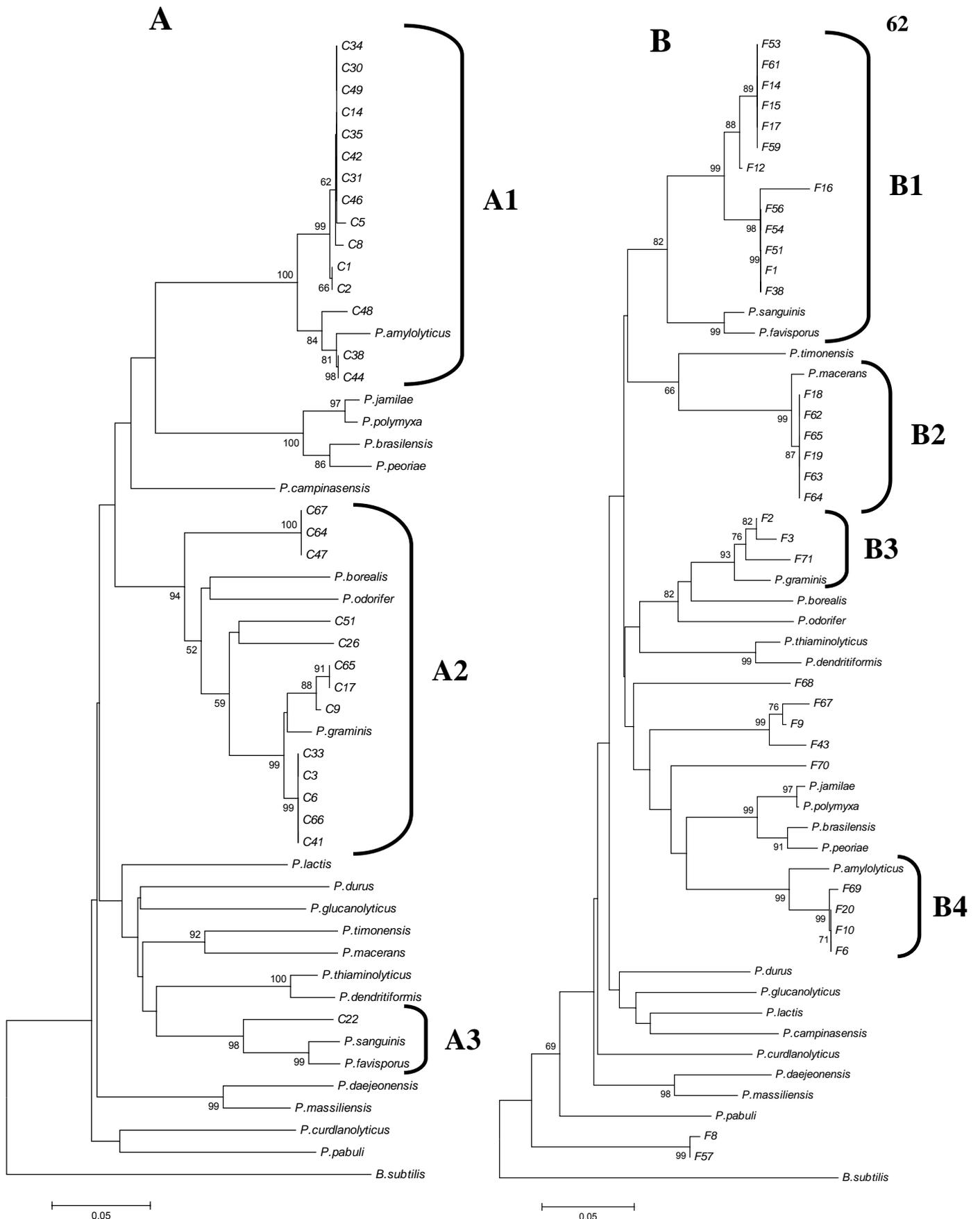


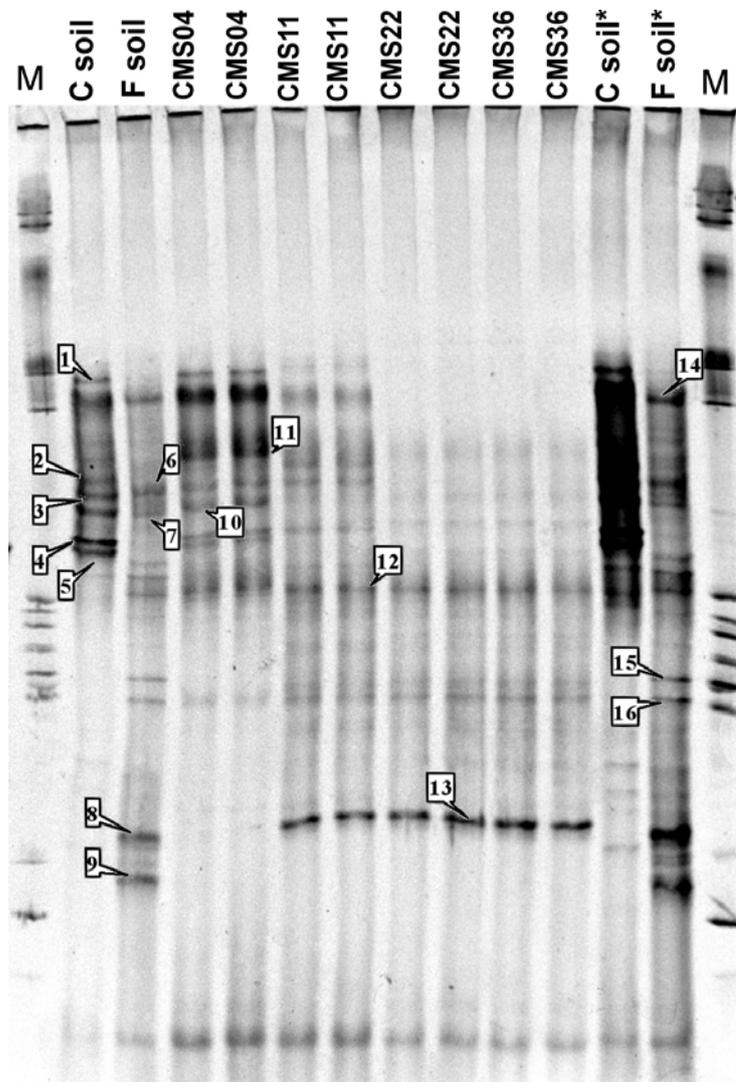
Figura 11. Árvores filogenéticas mostrando as relações entre espécies de *Paenibacillus* e clones obtidos dos solos de cerrado (A) e floresta (B) baseado na seqüência parcial (240 pb) do gene *rpoB*. Os grupos de espécies relacionadas às seqüências ambientais obtidas foram numerados e assinalados em ambas as árvores. As análises de bootstrap foram realizadas com 1000 replicadas e apenas valores maiores de 50% são mostrados na árvore. (Figura retirada do ANEXO 3, da Mota *et al.*, 2005)

4.3.3. Avaliação da diversidade de *Paenibacillus* através de PCR-DGGE baseado em *rpoB* em duas amostras de solo e diferentes cultivares de milho

Mais uma vez, o novo iniciador específico para *Paenibacillus* baseado no gene *rpoB* foi testado em amostras ambientais. Foram utilizadas as rizosferas de quatro cultivares de milho (CMS04, CMS11, CMS22 e CMS36) plantadas em solo de cerrado, além dos dois solos – cerrado e floresta – para a extração de DNA total e amplificação por PCR utilizando-se o sistema baseado em *rpoB* aqui desenvolvido. O objetivo era avaliar a diversidade de *Paenibacillus* através de PCR-DGGE nestes habitats. Após a separação dos produtos de PCR do gene *rpoB* na eletroforese em gel de gradiente desnaturante, foram obtidos perfis de populações dominantes de *Paenibacillus* (Figura 12 A). Tanto as amostras de solo quanto as de rizosfera das diferentes cultivares de milho apresentaram padrões reprodutíveis de bandas de DGGE entre as duplicatas. Por essa razão, apenas uma canaleta de cada amostra foi utilizada para a construção do dendrograma. Este foi construído utilizando-se 25 marcadores, correspondendo às diferentes bandas observadas nos perfis de DGGE, além do coeficiente de DICE e o método de UPGMA.

A amostra de solo de floresta foi separada em cerca de 45% de similaridade do grupo formado pelas demais amostras, isto é, solo de cerrado e rizosferas de milho (Figura 12 B). As amostras de rizosfera das cultivares CMS22 e CMS36 apresentaram perfis idênticos, enquanto a rizosfera da cultivar CMS04 apresentou o perfil mais próximo (cerca de 76% de similaridade) da amostra de solo de cerrado, no qual todas as cultivares foram plantadas.

A



B

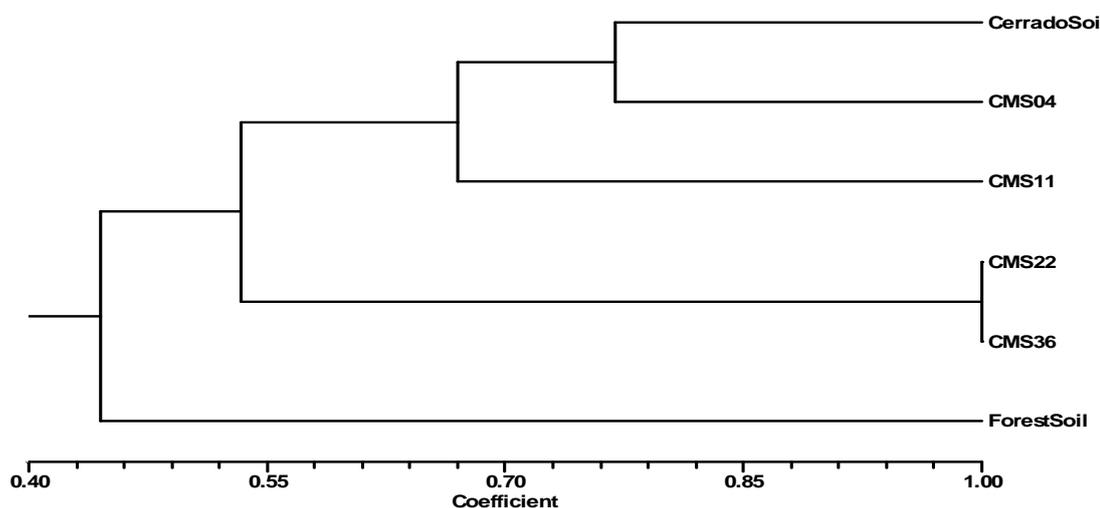


Figura 12. (A) Perfis de DGGE, obtidos com a abordagem de PCR-DGGE específica para *Paenibacillus* baseada no gene *rpoB*, de solos de cerrado (canaletas C soil e C soil*) e floresta (canaletas F soil e F soil*) e rizosferas de milho, 90 dias após o plantio em solo de cerrado (canaletas CMS04, CMS11, CMS22 e CMS36). A canaleta M contém 5 μ l de BenchTop 1Kb DNA ladder (Promega), as canaletas C soil* e F soil* contém 25 μ l do produto de PCR e as demais canaletas 15 μ l de produto de PCR. Os números correspondem às bandas que foram retiradas do gel, reamplificadas e seqüenciadas. (B) O dendrograma mostra os níveis de similaridade das comunidades de *Paenibacillus* obtidas dos solos de cerrado (“cerrado Soil”) e floresta (“Florest soil”) e das rizosferas de milho plantadas em solo de cerrado. (Figura retirada do ANEXO 3, da Mota *et al.*, 2005).

4.3.4. Seqüências das bandas de DGGE

Algumas bandas dos perfis de DGGE da comunidade de *Paenibacillus* (indicadas com números na Figura 12) foram extraídas dos géis de DGGE e submetidas à clonagem e ao seqüenciamento. A análise por BLAST-N das 16 seqüências obtidas mostrou que estas eram relacionadas às espécies *P. graminis* (bandas 1 e 5, com valores de similaridade de 92% e 90%, respectivamente), *P. amylolyticus* (bandas 2, 3, 4, 10 e 11, com valores de similaridade variando entre 91% a 96%), *P. favisporus* (bandas 6, 7, 8, 9, 15 e 16, com valores de similaridade entre 89% a 91%), *P. lactis* (banda 14, com 89%) e *P. durus* (bandas 12 e 13, ambas com 96% de similaridade). Embora algumas bandas pertencentes à mesma espécie tenham apresentado padrões de migração diferentes na DGGE, esses resultados já haviam sido observados por da Mota *et al.* (2004) e podem representar diferentes estirpes de uma mesma espécie. Os perfis das rizosferas das cultivares de milho CMS11, CMS22, CMS36 apresentaram uma banda forte (Figura 12, banda 13), que pode ser identificada como *P. durus*. Entretanto, esta banda não foi detectada nem na cultivar CMS04 nem nas amostras de solo não-rizosférico. Os resultados obtidos com as seqüências obtidas a partir dos perfis de DGGE claramente refletem as populações observadas nas bibliotecas de seqüências obtidas diretamente das amostras de solo.

5. DISCUSSÃO

5.1. *Efeito da calagem do solo e das linhagens de milho sobre a estrutura das comunidades microbianas*

As comunidades microbianas presentes na rizosfera das três linhagens de milho (tolerantes ou sensíveis ao alumínio tóxico) cultivadas no solo de cerrado (tratado e não tratado com calcário) foram analisadas através da amplificação por PCR do DNA ribossomal 16S e 18S e subsequente análise dos perfis de DGGE. Esta abordagem forneceu uma visão geral das mudanças que ocorrem nos perfis das comunidades microbianas do solo de cerrado em resposta à prática agrícola conhecida como calagem do solo (adição de calcário), que sabidamente resulta na redução da toxicidade do alumínio presente no solo (Lorenz, Preston & Feger, 2001). A importância da estrutura das comunidades microbianas em um determinado ambiente (como o solo) já é bem documentada e vários aspectos fundamentais para o funcionamento deste ecossistema, como a decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, estimulação do crescimento de plantas, patogenicidade e supressão de doenças em plantas, têm sido relacionados a presença dos microrganismos (Christensen, 1989, Thorn, 1997; Kowalchuk, 1999).

Os perfis de eletroforese em gel de gradiente desnaturante obtidos das comunidades bacterianas analisadas aqui mostraram que as rizosferas de milho selecionaram diferentes populações bacterianas, dependendo da condição do solo (0% ou 30% de saturação de alumínio). Este fenômeno foi mais acentuado em plantas jovens (30 dias após o plantio), mas também foi observado em plantas adultas (90 dias após o plantio) (Figura 3). Essa baixa similaridade entre as comunidades bacterianas obtidas das plantas cultivadas no solo tratado com calcário (0% de alumínio) e não tratado (30% de saturação de alumínio) pode estar relacionada às condições fisiológicas da planta, já que diferenças consideráveis foram observadas tanto na produção de grãos como no crescimento de plantas, cultivadas nas duas condições do solo (0% e 30% de saturação de Al) (Figura 2). Da mesma forma, populações bacterianas presentes em rizosferas de trigo saudável foram diferentes das observadas em plantas não saudáveis

(McSpadden-Gardener & Weller, 2001). Os dados apresentados aqui corroboram com a hipótese de que o estado metabólico da planta pode influenciar e alterar a estrutura da comunidade microbiana presente no solo ao redor das raízes, através do efeito rizosfera. Dependendo da condição do solo, a planta pode responder de diferentes maneiras. Estudos anteriores demonstraram que variedades tolerantes ao alumínio aumentaram a exsudação de ácidos orgânicos, como o citrato e o malato, quando cultivadas “in vitro” na presença de alumínio (Ma, Ryan & Delhaize, 2001; Ma & Furukawa, 2003; Piñeros *et al.*, 2005) ou elas podem apresentar mecanismos internos de tolerância ao alumínio, como a detoxificação do alumínio (Ma, Zheng & Matsumoto, 1997; Ma & Hiradate, 2000).

Também foram observadas, em menor escala, diferenças entre as populações bacterianas associadas com as três linhagens de milho estudadas, quando comparada com a observada pela condição do solo (0 e 30% de alumínio). A população bacteriana encontrada na linhagem Cateto, foi sempre diferente das demais linhagens estudadas (L3 e L16). Estudos anteriores já indicavam que o cultivar da planta pode exercer uma forte influência sobre a microflora da rizosfera (Salles, van Veen & van Elsas, 2004; Garbeva *et al.*, 2006), entretanto, o tipo do solo parece ser o fator determinante em outros estudos (Horwath, Elliott & Lynch, 1998; da Silva *et al.*, 2003; Garbeva, van Veen & van Elsas, 2004). Neste estudo, foi observada uma clara influência da condição do solo sobre a comunidade bacteriana.

Além disso, também foram observadas diferenças ao longo do crescimento da planta, ou seja, entre os dois tempos de amostragem 30 e 90 dias após o plantio. Trinta dias após o plantio, as rizosferas das plantas crescidas sob a condição de estresse (solo não tratado) apresentaram perfis de DGGE mais semelhantes aos obtidos dos solos não-rizosféricos, do que aos de rizosferas de plantas saudáveis (solo tratado). Vários fatores ambientais como a estrutura, parâmetros físico-químicos, disponibilidade de nutrientes, conteúdo de matéria orgânica e pH do solo, têm sido descritos como importantes na dinâmica de comunidades microbianas do solo. Esses fatores coletivamente são responsáveis pela determinação da composição indígena de microrganismos do solo, os quais irão fazer parte do processo de colonização das raízes (Marschner *et al.*, 2001; Garbeva, van Veen & van Elsas, 2004; Salles, van Veen & van Elsas, 2004). Como observado neste estudo, o tratamento do solo com calcário não só elevou o

pH do solo, reduzindo a toxicidade do alumínio e favorecendo o crescimento da planta, mas também alterou a estrutura das comunidades bacterianas do solo não-rizosférico. Esse efeito foi intensificado com o tempo, e a maior diferença pode ser observada na amostragem de 90 dias das populações bacterianas do solo tratado e não tratado com calcário que foram separadas em 49% de similaridade (Figura 3, II). Neste sentido, alguns trabalhos mostram que muitos materiais calcários usados na calagem do solo para agricultura apresentam baixa solubilidade, sendo dissolvidos lentamente ao longo do tempo (Lorenz, Preston & Feger, 2001).

Os fungos são frequentemente dominantes em solos quando se considera a biomassa como parâmetro de análise (Thorn, 1997). Entretanto, poucos estudos sobre a comunidade total de fungos têm sido realizados por métodos independentes de cultivo de microrganismos, quando comparados com o número de estudos realizados sobre as comunidades bacterianas (Anderson & Cairney, 2004). O principal problema para estudar a diversidade de comunidades fúngicas através de métodos independentes de cultivo de microrganismos era o uso de iniciadores de PCR específicos baseados no 18S rDNA, que não amplificavam com sucesso todas as amostras de DNA ambiental (Oros-Sichler *et al.*, 2006). Recentemente, um novo conjunto de iniciadores e uma nova metodologia foram empregados com sucesso e permitiram a análise do 18S rDNA de comunidades fúngicas através de DGGE (Oros-Sichler *et al.*, 2006). Esta nova abordagem de “semi-nested PCR” também foi aplicada com sucesso neste estudo. Os perfis de DGGE relevaram que as populações fúngicas presentes nas rizosferas são influenciadas muito mais pelo tratamento do solo no qual a planta foi cultivada (condição de estresse por Al ou não estressante), do que pela linhagem da planta (Figura 4). A baixa similaridade entre as comunidades fúngicas das rizosferas obtidas dos solos tratado e não tratado, pode ser explicada mais uma vez pela condição de saúde da planta, uma vez que diferenças significativas foram observadas na produção de grão e crescimento da planta em relação à condição do solo onde foram plantadas (tratado e não tratado). As comunidades fúngicas também sofreram algumas alterações durante o crescimento da planta (30 e 90 dias após o plantio). Porém, nenhuma banda específica relacionada à condição do solo, linhagem de milho ou tempo de crescimento pode ser observada nos perfis

de DGGE. Por essa razão, nenhuma banda das comunidades fúngicas foi seqüenciada.

Uma das vantagens da análise de DGGE é a possibilidade de extrair bandas dos géis para seqüenciamento do DNA e a identificação de membros das comunidades com base na comparação com seqüências disponíveis em bancos de dados. Neste estudo, após o tratamento do solo de cerrado com calcário, muitas bandas com alto conteúdo de GC (localizadas na parte de baixo dos géis das comunidades bacterianas) e identificadas como Actinobacteria tiveram a sua intensidade reduzida com o tempo. Populações de Actinobacteria são geralmente encontradas em solos ácidos (Seong *et al.*, 1993) e o aumento de 1 unidade no valor do pH do solo observado após o tratamento do solo com calcário poderia ter afetado a persistência dessas populações no solo tratado. Bandas identificadas como Rhizobiales foram detectadas principalmente em solos não-rizosféricos. Os rizóbios geralmente realizam associações simbióticas com muitas plantas leguminosas, onde fixam nitrogênio no interior das raízes dessas plantas. Por outro lado, em milho (família Poaceae), *Azospirillum* e outras bactérias, como *Herbaspirillum* e *Bulkholderia* (Bulkholderiales), são consideradas importantes fixadoras biológicas de nitrogênio atmosférico (Baldani & Baldani, 2005). Estas bactérias também produzem hormônios do crescimento de plantas (giberelinas e auxinas), além de fixar o nitrogênio atmosférico (Bastián *et al.*, 1998; Perin *et al.*, 2006). Trinta dias após o plantio, uma população predominante (banda 6) identificada como Burkholderiales (e próxima ao gênero *Herbaspirillum*) foi observada na rizosfera de plantas saudáveis (solo tratado). Esta população pode ter um efeito positivo sobre o crescimento das plantas jovens. Por outro lado, uma banda encontrada nas rizosferas de plantas sob estresse (solo não tratado) foi identificada como Xanthomonadales. Rizosferas de plantas sob estresse geralmente são mais susceptíveis a patógenos oportunistas do que plantas saudáveis. Além disso, estirpes de *Xanthomonas* sp. (Xanthomonadales) foram descritas como patógenos de milho (Eory, Momo & Alvarez, 1995) e *X. campestris* pv. *holcicola* (Elliott) é considerada o agente causal da doença "leaf spot" em milho. Mais recentemente, uma nova doença causada por *Xanthomonas* sp., conhecida como "False Red Stripe", foi descrita em milho (Mantovani, Marini & Gigliotti, 2006). Entretanto, não se pode afirmar que essa banda corresponda a um

patógeno, uma vez que patógenos e microrganismos comensais podem ter seqüências do gene que codifica o 16S rRNA semelhantes.

A análise de componentes principais (PCA) é um método estatístico que concentra a variabilidade de grandes conjuntos de dados em um outro conjunto menor de variáveis chamadas de componentes principais. A redução no número de variáveis usadas para descrever os dados facilita a interpretação das relações existente entre os dados observados (Mumford *et al.*, 2007). Os padrões de PCA das comunidades microbianas resultaram em agrupamentos de amostras semelhantes aos observados na análise de grupos hierárquicos, confirmando a consistência dos dados. Os métodos multivariados mostraram que o efeito do tratamento com calcário sobre a comunidade microbiana do solo aumentou com o tempo, provavelmente devido às lentas taxas de dissolução de materiais calcários no solo, ou a lenta resposta da comunidade microbiana. Além disso, os dados da PCA revelaram um efeito mais rápido sobre a comunidade bacteriana do que sobre a comunidade fúngica dos solos não-rizosféricos, tratados com calcário. Sendo assim, poderíamos considerar as comunidades bacterianas como bioindicadores mais sensíveis do que as comunidades fúngicas na avaliação dos efeitos do tratamento com calcário sobre a comunidade microbiana do solo.

5.2. *Uso do gene rpoB para a identificação de espécies de Paenibacillus fixadoras de nitrogênio como alternativa ao gene que codifica o 16S rRNA*

As técnicas moleculares que permitem acessar diretamente a diversidade de grupos bacterianos específicos têm sido quase sempre desenvolvidas com base no 16S rDNA, devido ao enorme banco de dados de seqüências disponíveis deste gene (*rrs*), que facilita muito a identificação das populações ambientais. Além disso, a aplicação de PCR-DGGE para gerar perfis das comunidades bacterianas a partir de DNA de amostras ambientais tem se mostrado uma ferramenta muito importante em estudos de diversidade microbiana (Torsvik *et al.*, 1994; Muyzer *et al.*, 1996; van Elsas *et al.*, 1998). Entretanto, muitas espécies bacterianas possuem múltiplas cópias dos genes ribossomais nos seus genomas, as quais podem exibir micro heterogeneidades. O número de cópias de operons

ribossomais por genoma bacteriano pode variar de 1 a 15 (Klappenbach *et al.*, 2001) e, por essa razão, o número de bandas observado nos perfis de DGGE baseados no gene que codifica o 16S rRNA pode ser muito maior do que o número de populações bacterianas presentes naquela comunidade estudada. O fato de um organismo ser representado por mais de uma banda em perfis de DGGE baseados em 16S rRNA já foi demonstrado por da Silva *et al.* (2003) em *Paenibacillus* spp. e por Salles, De Souza & van Elsas (2002) em *Bulkholderia* spp. Os perfis de DGGE obtidos nestes estudos são muito complexos e não fornecem uma estimativa acurada da riqueza de populações presentes nas comunidades.

Como observamos no item anterior, a análise de PCR-DGGE baseada nos genes ribossomais *rrs* (16S rDNA e 18S rDNA) permitiu monitorar mudanças ou detectar diferenças na estrutura de comunidades de bactérias e fungos, respectivamente, presentes em amostras ambientais. Entretanto, a utilização de iniciadores universais, baseados nestes genes ribossomais, permite apenas uma identificação parcial, que dificilmente apontará a espécie ou até mesmo o gênero com precisão. Isto porque esses genes são altamente conservados sendo, portanto, pouco discriminativos entre os diferentes grupos taxonômicos. Além disso, muitas vezes apenas uma pequena porção destes genes é avaliada através da PCR-DGGE e isso prejudica ainda mais o poder de discriminação dos genes ribossomais. Além disso, micro heterogeneidades do 16S rRNA são freqüentes em isolados bacterianos do ambiente e essas heterogeneidades encontradas entre as múltiplas cópias do 16S rRNA de um mesmo genoma causam problemas em estudos ecológicos e taxonômicos (Dahllöf, Baillie & Kjelleberg, 2000). Embora estudos propondo alternativas a esses problemas, como o uso do *rpoB* por exemplo, não tenham sido realizados na mesma proporção, estudos anteriores já haviam demonstrado que o gene *rpoB* é muito útil para identificação de isolados bacterianos de importância médica como uma alternativa ao gene que codifica o 16S rRNA (Mollet, Drancourt & Raoult, 1997; Renesto *et al.*, 2001; Drancourt & Raoult, 2002). Entretanto, para muitos gêneros bacterianos, como os *Paenibacillus*, seqüências do gene *rpoB* nem estavam disponíveis nos bancos de dados.

Neste estudo escolhemos o grupo dos *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio para iniciar a aplicação do *rpoB* em estudos de ecologia molecular e taxonomia,

pois estirpes pertencentes a essas espécies têm sido frequentemente isoladas da rizosfera de gramíneas de interesse comercial (Rosado *et al.*, 1998; Seldin, 1992; Seldin & Penido, 1986; Seldin, van Elsas & Penido, 1984) e por apresentarem heterogeneidades entre as cópias do 16S rDNA em seus genomas (Nübel *et al.*, 1996).

O número de cópias do gene *rpoB* no genoma da estirpe-tipo de *Paenibacillus graminis* foi primeiro estimado pela análise de PCR-DGGE. A Figura 6(C) mostra o perfil de DGGE obtido a partir do produto de PCR do gene *rpoB* obtido com os iniciadores descritos por Dahllöf, Baillie & Kjelleberg (2000) e a estirpe-tipo de *P. graminis*. O mesmo padrão (somente uma banda por amostra) foi observado em géis de DGGE quando as outras espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio foram avaliadas (dados não mostrados). Isto pode indicar a presença de apenas uma cópia deste gene no genoma. Por outro lado, muitas bandas por estirpe são observadas quando são usados os iniciadores para o 16S rDNA. da Silva *et al.*, (2003) demonstraram a presença de uma a seis bandas no gel de DGGE (cópias diferentes) quando o 16S rDNA foi analisado a partir do DNA genômico de várias estirpes de *Paenibacillus*.

Os dados apresentados neste estudo demonstraram que a análise da seqüência de um fragmento de 375 pares de base do gene *rpoB* é uma abordagem molecular que permite a identificação de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio ao nível de espécie. O seqüenciamento desse pequeno fragmento (375 pares de base) do gene *rpoB* é mais fácil, rápido e barato do que um grande fragmento como o 16S rDNA (1450 pares de base). Os problemas inerentes à presença de múltiplas cópias do 16S rDNA no genoma de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio e o seu limitado poder de discriminação podem agora ser evitados com a utilização do gene *rpoB* em estudos taxonômicos e ecológicos, como discutiremos em mais detalhes no próximo ítem (5.3).

5.3. Análise da diversidade de espécies de *Paenibacillus* em amostras ambientais através de uma nova abordagem de PCR-DGGE baseada no gene *rpoB*

Para evitar as limitações inerentes às análises baseadas no 16S rRNA, inicialmente foi avaliada a utilização do gene *rpoB* como uma alternativa ao 16S rRNA no estudo de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio. Os dados obtidos neste estudo mostraram que o *rpoB* é uma ferramenta poderosa para a identificação de espécies fixadoras de nitrogênio dentro do gênero *Paenibacillus*. A partir desses resultados, foi avaliada a aplicabilidade do gene *rpoB* em estudos de ecologia molecular. Primeiro, foi desenvolvido um iniciador baseado em uma região contendo uma inserção de 6 bases presentes em uma região de 375 pb na seqüência do *rpoB* de oito espécies fixadoras de nitrogênio. O objetivo principal foi desenvolver um sistema de PCR específico que permitisse a amplificação de fragmentos do gene *rpoB* pertencentes a espécies de *Paenibacillus* diretamente de amostras ambientais, e que possibilitasse a subsequente análise desses fragmentos por DGGE ou clonagem e seqüenciamento de DNA. A especificidade que o iniciador *rpoBPAEN* conferiu ao sistema foi confirmada com os nossos resultados obtidos a partir amostras de DNAs de cultura pura e de solo. Em ambos os casos, foram amplificadas somente seqüências de *Paenibacillus*. Esse iniciador permitiu a amplificação da maioria das espécies de *Paenibacillus*. Entretanto, das 27 espécies testadas, 5 espécies (pertencentes a um mesmo ramo filogenético, Figura 9 B) não apresentaram a inserção de 6 nucleotídeos em suas seqüências de *rpoB* e, conseqüentemente, não foram amplificadas com esse iniciador.

Além dos dados obtidos com DNAs de cultura pura, a especificidade do sistema também foi confirmada com DNAs de amostras ambientais (Figura 10 e 11), já que todos os 62 clones seqüenciados pertenciam a populações de *Paenibacillus*. Além disso, foram observadas pequenas variações entre as seqüências de clones pertencentes a uma mesma espécie. Essas variações já foram observadas também em outros estudos onde o gene *rpoB* foi utilizado (Drancourt & Raoult, 2002; da Mota *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2002). A identificação dos clones mostrou que espécies como *P. amylolyticus* (amilolítica) e *P. graminis* (fixadora de nitrogênio) são mais freqüentes em solo de cerrado, enquanto

espécies como *P. favisporus* (xilanolítica) e *P. macerans* (fixadora de nitrogênio) são predominantes no solo de floresta. Além disso, os clones obtidos do solo de floresta foram mais diversos do que os obtidos de solo de cerrado.

O sucesso da abordagem de PCR-DGGE baseado no *rpoB* e específico para *Paenibacillus* dependerá da qualidade e quantidade de DNA alvo para a reação de PCR. Os métodos de extração de DNA (da Silva *et al.*, 2003; Rosado *et al.*, 1996) de culturas puras, assim como o de amostras ambientais (solo e rizosferas), produziram quantidades suficientes para a amplificação por PCR das populações de *Paenibacillus*. Além disso, a utilização da “semi-nested PCR”, na qual o iniciador contendo o grampo de GC é utilizado na segunda reação, aumenta a sensibilidade do método. Abordagens de “nested PCR” têm se mostrado mais eficientes para a detecção de comunidades bacterianas em amostras de solo, onde as populações alvo estejam presentes em baixo número ou em ambientes contendo altas concentrações de matéria orgânica que pode afetar a reação de PCR devido a presenças de possíveis inibidores (Salles, de Souza & van Elsas, 2002).

Os perfis de DGGE das populações de *Paenibacillus* oriundas dos solos de cerrado e floresta e das rizosferas dos diferentes cultivares de milho cultivados em solo de cerrado sugerem que o tipo de solo é o fator responsável por mudanças observadas na estrutura da comunidade de *Paenibacillus*. O mesmo resultado foi observado por da Silva *et al.* (2003), onde o tipo de solo (cerrado ou Várzea) influenciou mais drasticamente a estrutura da comunidade de *Paenibacillus* do que o tipo de cultivar plantado. Por outro lado, quando o gene *rpoB* foi utilizado, as diferenças entre as comunidades de *Paenibacillus* presentes nas rizosferas das diferentes cultivares de milho estudadas (CMS04, CMS11, CMS22 e CMS36) foram observadas mais claramente do que quando o 16S rDNA foi utilizado por da Silva *et al.* (2003). As cultivares de milho CMS22 e CMS36 formaram um grupo em 100% de similaridade (Figura 12 B), indicando que as populações predominantes nestas cultivares são as mesmas. Por outro lado, a cultivar CMS04 mostrou uma tendência a se agrupar mais próxima à amostra de solo não-rizosférico. As diferenças na formação dos grupos podem ocorrer devido a diferenças na região de anelamento dos iniciadores (16S rRNA ou *rpoB*) ou ao número de marcadores (bandas) obtidas na análise baseada no 16S rRNA. Neste estudo, o número de marcadores obtidos foi muito menor do que os obtidos nos

perfis baseados em 16S rRNA, usados por da Silva *et al.* (2003) para construção do dendrograma. O uso do *rpoB* produziu perfis com muito menos bandas e mais fáceis de serem interpretados. Uma banda forte (Figura 12 , banda 13) presente em três cultivares de milho foi identificada como *P. durus*. Esta espécie é composta por estirpes com uma alta capacidade de fixação de nitrogênio (Seldin, van Elsas & Penido, 1984), uma característica muito importante e desejada na rizosferas de plantas.

Neste trabalho a abordagem de PCR-DGGE utilizada para amplificação específica de fragmentos do gene *rpoB* da comunidade de *Paenibacillus* através de uma “semi-nested PCR” mostrou ser uma ferramenta muito útil para detectar membros dominantes das comunidades de *Paenibacillus* de amostras ambientais como solo e rizosferas (de milho cultivado em solo de cerrado). Uma clara distinção entre as comunidades dos dois solos foi observada, indicando que a seleção de grupos específicos de *Paenibacillus* ocorre em cada solo. Além disso, perfis de DGGE muito mais fáceis de serem interpretados foram obtidos com essa abordagem baseada no *rpoB*, quando comparados com os perfis obtidos com o 16S rDNA, que apresentam problemas inerentes as múltiplas cópias do 16S rDNA presentes nos genomas de *Paenibacillus* (Nübel *et al.*, 1996). Os estudos de PCR-DGGE e seqüenciamento utilizando essa nova abordagem baseada em *rpoB*, podem ser muito úteis para monitorar mudanças na estrutura de comunidades de *Paenibacillus* frente a diferentes tratamentos agrícolas ou mesmo cultivares de plantas.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Através de métodos independentes de cultivo de microrganismos, as diferenças das comunidades bacterianas e fúngicas puderam ser avaliadas nas rizosferas de diferentes linhagens de milho (sensíveis e tolerantes ao alumínio) plantadas em solo de cerrado submetido ou não à calagem (contendo 0% ou 30% de saturação de alumínio, respectivamente).
- ✓ As comunidades bacterianas presentes nas rizosferas de milho foram menos afetadas pela linhagem do milho (Cateto 237/67, L16 e L3) do que pelo tratamento do solo (calagem).
- ✓ Foram observadas diferenças na comunidade bacteriana ao longo do crescimento da planta (30 e 90 dias após o plantio).
- ✓ As comunidades fúngicas foram menos afetadas pela calagem do solo do que as comunidades bacterianas.
- ✓ A clonagem e o seqüenciamento de fragmentos do 16S rDNA (bandas retiradas dos géis de DGGE das comunidades bacterianas do solo não-rizosféricos) de cerrado revelaram que populações de Actinomycetales e Rhizobiales estavam entre os ribotipos predominantes.
- ✓ Foi demonstrado que a análise da seqüência de um fragmento de 375 pb do gene *rpoB* é uma abordagem molecular que permite a identificação de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio ao nível de espécie.
- ✓ Foi confirmada a presença de apenas uma cópia do gene *rpoB* no genoma de *Paenibacillus graminis*.
- ✓ O gene *rpoB* se mostrou cerca de 3,1 vezes mais discriminativo que o 16S rDNA.
- ✓ Foi desenvolvida e validada com sucesso uma nova abordagem de PCR-DGGE e seqüenciamento do gene *rpoB* para o estudo da estrutura de comunidades de *Paenibacillus* spp. em amostras ambientais.

- ✓ Através dos perfis de DGGE das populações de *Paenibacillus* oriundas dos solos de cerrado e floresta e das rizosferas dos diferentes cultivares de milho cultivados em solo de cerrado, foi observado que o tipo de solo influenciou a estrutura da comunidade de *Paenibacillus*.
- ✓ Os problemas inerentes à presença de múltiplas cópias do 16S rDNA no genoma de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio e o seu limitado poder de discriminação podem agora ser evitados com a utilização do gene *rpoB* em estudos taxonômicos e ecológicos.

7. REFERÊNCIAS

- AACC (1976). American association of cereal chemists. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. Saint Paul, MN, 256 pp.
- Altschul, S.F., Thomas, L.M., Alejandro, A.S., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Alvarez, V.M., von der Weid, I., Seldin, L. & Santos, A.L.S. (2006) Influence of growth conditions on the production of extracellular proteolytic enzymes in *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 and *Paenibacillus polymyxa* SCE2. *Letters in Applied Microbiology* **43**: 625-630.
- Anderson, I.C. & Cairney, J.W.G. (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology* **6**: 769-779.
- Aniol, A. (1985) Induction of aluminium tolerance in wheat seedlings by low doses of aluminium in the nutrient solution. *Plant Physiology* **75**: 551-555
- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Xavier, D.F., Boddy, R.M. & Döbereiner, J. (1982) Efeito da calagem no número de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina na rizosfera de milho, trigo e feijão. *Revista de Microbiologia* **13**: 250-263.
- Baldani, J.I. & Baldani, V.L. (2005) History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **77**: 549-579.
- Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R. & Bottini, R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation* **24**: 7-11.
- Beatty, P.H. & Jensen, S.E. (2002) *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. *Canadian Journal of Microbiology* **48**:159-169.

- Berge, O., Guinebretière, M.H., Achouak, W., Normand, P. & Heulin, T. (2002) *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**., 607-616.
- Brimecombe, M.J., De Leij, F.A. & Lynch, J.M. (2001) The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. *In*: Pinton, R., Varanini, Z., Nannipieri, P. (Eds.), *The Rhizosphere – biochemistry and organic substances at soil-plant interface*. Marcel Dekker, NY, pp. 41-94.
- Bona, L., Matuz, J. & Purnhauser, L. (1991) Aluminium tolerance of *Triticum aestivum* L. populations related to plant induced pH changes of nutrient solution. *In*: Proceedings of the second international symposium on plant-soil interactions at low pH. Ceckley, West Virginia. USA. Edited by Wright R.J., Baligar V.C. & Murrmann R.P. pp.1057-1062
- Boon, N., Windt, W., Vertraete, W. & Top, E.M. (2002) Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology* **39**: 101-112.
- Budi, S.W, van Tuinen, D., Martinotti, G. & Gianinazzi, S. (1999) Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. *Applied Environmental Microbiology* **65**: 5148-5150.
- Chanway, C.P., Holl, F.B. & Turkington, R. (1988) Genotypic coadaptation in plant growth promotion of forage species by *Bacillus polymyxa*. *Plant Soil* **106**: 281-284.
- Chanway, C.P., Nelson, L. M. & Holl, F. B. (1988) Cultivar-specific growth promotion of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) by coexistent *Bacillus* species. *Canadian Journal of Microbiology* **34**: 925-929.
- Chelius, M.K. & Triplett, E.W. (2001) The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecology*. **41**: 252-263.
- Christensen, M. (1989) A view of fungal ecology. *Mycologia* **81**: 1-19.

- Costa, R., Gotz, M., Mrotzek, N., Lottmann, J., Berg, G. & Smalla, K. (2006) Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of microbial guilds. *FEMS Microbiology Ecology* **56**: 236-249.
- da Mota, F.F., Gomes, E.A., Paiva, E. & Seldin, L. (2005) Assessment of the diversity of *Paenibacillus* species by a novel *rpoB*-based PCR-DGGE method. *FEMS Microbiology Ecology* **52**: 317-328.
- da Mota, F.F., Nóbrega, A., Marriel, I.E., Paiva, E. & Seldin, L. (2002) Genetic diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations isolated from the rhizosphere of four cultivars of maize (*Zea mays*) planted in cerrado soil. *Applied Soil Ecology* **20**: 119-132.
- da Mota, F.F., Gomes, E.A., Paiva, E., Rosado, A.S. & Seldin, L. (2004) Use of *rpoB* gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the 16S rRNA gene. *Letters in Applied Microbiology* **39**: 34-40.
- da Silva, K.R.A., Salles, J.F., Seldin, L. & van Elsas, J.D. (2003) Assessment of the diversity of *Paenibacillus* spp. in the rhizosphere of different maize cultivars in two soils by *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE and sequence analysis. *Journal of Microbiological Methods* **54**: 213-231.
- Dahlöf, I., Baillie, H. & Kjelleberg, S. (2000) *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rDNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 3376-3380.
- Davison, J. (1988) Plant beneficial bacteria. *Biotechnology*. **6**: 282-286
- Défago, G., Duffy, B.K. & Keel, C. (1994) Risk assessment for the release of plant growth-promoting rhizobacteria. In: "Proceedings of the third international workshop on plant growth-promoting rhizobacteria". pp. 254 CSIRO Adelaide, Australia.
- Dianese, J.C., Santos, L.T.P. & Furlanetto, C. (1994). New *Meliola* species on *Salacia crassifolia*. *Fitopatologia Brasileira* **19**: 314.
- Dijksterhuis, J., Sanders, M., Gorris, L.G. & Smid, E.J. (1999) Antibiosis plays a role in the context of direct interaction during antagonism of *Paenibacillus*

- polymyxa* towards *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology* **86**:13-21.
- Döbereiner, J. & Pedrosa, F.O. (1987) Nitrogen - Fixing Bacteria in Non leguminous. Crop Plants. Springer-Verlag, New York.
- Drancourt, M. & Raoult, D. (2002) *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 1333-1338.
- Elo, S., Suominen, I., Kämpfer, P., Juhanoja, J., Salkinoja-Salonen, M. & Haahtela, K. (2001) *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 535-545.
- Eory, V.J., Momo, F.R. & Alvarez, M. (1995) Growth and survival of *Azospirillum* in roots and maize rhizospheres with different levels of acidity. *Revista Argentina de Microbiología* **27**: 99-105.
- Fogarty, W.M. (1983) Microbial Enzymes and Biotechnology. Essex, UK : Applied Science Publishers.
- Friedberg, F. & Rhodes, C. (1986) Cloning and characterization of the beta-amylase gene from *Bacillus polymyxa*. *Journal of Bacteriology* **165**:819-824.
- Galtier, N., Gouy, M. & Gautier, C. (1996) Seaview and Phylo_Win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *CABIOS* **12**: 543-548.
- Garbeva, P., Postma, J., van Veen, J.A. & van Elsas, J.D. (2006) Effect of aboveground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. *Environmental Microbiology* **8**: 233-246.
- Garbeva, P., van Veen, J.A. & van Elsas, J.D. (2004) Microbial diversity in soil-selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppression. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 243-270.
- Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, C., Cacco, G. & van Elsas, J.D. (1999) Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* **38**: 1-15.

- Glick, B.R. (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 109-117.
- Gomes, N.C., Fagbola, O., Costa, R., Rumjanek, N.G., Buchner, A., Mendonça-Hagler, L. & Smalla, K. (2003) Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3758-3766.
- Gouzou, L., Burtin G., Philippy R., Bartoli F. & Heulin T. (1993) Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* on soil aggregation in the wheat rizhosfere: preliminary examination. *Geoderma* **56**: 479-491
- Grau, F.H. & Wilson, P.W. (1962) Physiology of nitrogen-fixation by *Bacillus polymyxa*. *Journal of Bacteriology* **83**: 490-496.
- Halsall, D.M. & Gibson, A.H. (1985) Cellulose decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Cellulomonas gelida* and *Azospirillum* species or *Bacillus macerans*. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 1021–1026.
- Heuer, H. & Smalla, K. (1997) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities,. *In* van Elsas, J.D., Wellington, E.M.H., Trevors, J. (eds.), *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. pp. 353-373.
- Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K. & De Vos P. (1996) Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods* **26**: 247-259.
- Holl, F.B., & Chanway C.P. (1992) Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Canadian Journal of Microbiology* **38**: 303-308.
- Holl, F.B., Chanway, C.P., Turkington, R. & Radley, R. A. (1988) Response of crested wheat grass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry* **20**: 19-24.

- Horwath, W.R., Elliott, L.F. & Lynch, J.M. (1998) Influence of soil quality on the function of inhibitory rhizobacteria. *Letters in Applied Microbiology* **26**: 87-92.
- Howeler, R.H. (1991) Identifying plants adaptable to low pH conditions. *In: Proceedings of the second international symposium on plant-soil interactions at low pH*. Brackley, West Virginia, USA. Edited by Wright R.J., Baligar V.C. & Murrmann R.P. pp.885-904.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M. & Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* **180**: 4765-4774.
- Khammas, K.M. & Kaiser P. (1992) Pectin decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Azospirillum* and *Bacillus* species. *Canadian Journal of Microbiology* **38**: 794-797.
- Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R. & Schmidt, T.M. (2001) rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Research*. **29**: 181-184.
- Kloepper, J.W. & Schroth, M.N. (1978) Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *In: Proceedings of the fourth international conference on plant pathogenic bacteria*, Angers, France, pp. 879-882.
- Kloepper, J.W., Lifshitz, R. & Zablutowicz, R.M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnology* **7**: 39-44.
- Ko, K.S., Lee, H.K., Park, M.Y., Lee, K.H., Yun, Y.J., Woo, S.Y., Miyamoto, H. & Kook, Y.H. (2002) Application of RNA polymerase beta-subunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 2653-2658.
- Kochian, L.V. (1995) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Physiology* **46**: 237-260.
- Kowalchuk, G.A. (1999) Fungal community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *In: Ackermann, A.D.L., van Elsas, J.D., de Bruijn, F.J. (Eds.), Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 3.4.6.1-16.

- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (1993) MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis, version 1.0. The Pennsylvania State University, PA.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**: 150-163.
- Kundu, B.S. & Gaur, A.C. (1980) Establishment of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere and their effect on yield and nutrient uptake of wheat crop. *Plant and Soil* **57**: 223-230.
- Kuske, C.R., Ticknor, L.O., Miller, M.E., Dunbar, J.M., Davis, J.A., Barns, S.M.M & Belnap, J. (2002) Comparison of soil bacterial communities in rhizosphere of three plant species and the interspecies in an arid grassland. *Applied Environmental Microbiology* **68**: 1854-1863.
- Lambert, B. & Joos, H. (1989) Fundamental aspects of rhizobacterial plant growth promotion research. *Trends in Biotechnology* **7**: 215-219.
- Lebuhn, M., Heulin, T. & Hartmann, A. (1997) Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots. *FEMS Microbiology Ecology* **22**, 325-334.
- Lorenz, K., Preston, C.M. & Feger, K.H. (2001) Long-term effects of liming on microbial biomass and activity and soil organic matter quality (¹³C CPMAS NMR) in organic horizons of Norway spruce forests in Southern Germany. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **164**: 555-560.
- Lynch, J.M. (1990) Beneficial interactions between microorganisms and roots. *Biotechnology Advances* **8**: 335-346.
- Ma, J.F. & Furukawa, J. (2003) Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a mini review. *Journal of Inorganic Biochemistry* **97**: 46-51.
- Ma, J.F. & Hiradate, S. (2000) Form of aluminum for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Planta* **211**: 355-360.
- Ma, J.F., Ryan, P.R. & Delhaize, E. (2001) Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science* **6**: 273-278.

- Ma, J.F., Zheng, S.J. & Matsumoto, H. (1997). Detoxifying aluminum with buckwheat. *Nature* **390**: 569-570.
- Magalhães, P.C., Durães, F.O.M. & Schaffert, R. E. (2000). Fisiologia da planta do sorgo. Circular Técnica, Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas, n. 3, p. 01-46.
- Mallonee, D.H. & Speckman, R.A. (1989) Transformation of *Bacillus polymyxa* with plasmid DNA. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 2517-2521.
- Mantovani, E.S., Marini, D.C. & Giglioti, E.A. (2006) Host range of *Xanthomonas* sp., causal agent of the false red stripe of sugarcane, among grasses. *Summa Phytopathologica* **32**: 124-130.
- Margelef, D.R. (1958) Information theory in ecology. *General systems* **3**: 36-71.
- Marschner, P., Yang, C.H. Lieberei, R. & Crowley, D.E. (2001) Soil and plant specific effect on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 1437-1445.
- Mavingui, P. & Heulin, T. (1994) *In vitro* chitinase antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane populations of *Bacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry* **26**: 801-803.
- Mavingui P., Laguerre, G., Berge, O. & Heulin, T. (1992) Genetic and phenotypic diversity of *Paenibacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 1894-1903.
- McSpadden-Sardener, B.B. & Weller, D.M. (2001) Changes in populations of rhizosphere bacteria associated with take-all disease of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4414-4425.
- Mollet, C., Drancourt, M. & Raoult, D. (1997) *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular Microbiology* **26**: 1005-1011.
- Montefusco, A., Nakamura, L. K. & Labeda, D. P. (1993) *Bacillus peoriae* sp. nov. *International Journal of Systematic Microbiology* **43**: 388-390.
- Mumford, K.G., MacGregor, J.F., Dickson, S.E. & Frappa, R.H. (2007) Multivariate analysis of ground water and soil data from a waste disposal site. *Ground Water Monitoring and Remediation* **27**: 92-102.
- Muyzer, G. & Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis

- (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**: 127-141. Review.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H. & Wawer, C. (1998). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *In*: Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D.; de Bruijn, F.J., eds. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp.1-23.
- Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A. & Wawer, C. (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA: A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *In*: *Molecular Microbial Ecology Manual* (Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D. and de Bruijn, F.J., Eds.), 3.4.4, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Myers, R., Fischer, S., Lerman, L. & Maniatis, T. (1985) Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* **13**: 3131-3145.
- Nakatsu, C.H. (2007) Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science Society of America Journal* **71**: 562-571.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W. & Backhaus, H. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* **178**: 5636-5643.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. & Sekiya T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **86**: 2766-2770.
- Oros-Sichler, M., Gomes, N.C., Neuber, G. & Smalla, K. (2006) A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. *Journal of Microbiological Methods* **65**: 63-75.

- Perin, L., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., Baldani, I., Estrada-de los Santos, P., Reis, V. M. & Caballero-Mellado, J. (2006) *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 1931-1937.
- Petersen D.J., Srinivasan M. & Chanway C.P. (1996) *Bacillus polymyxa* stimulates increased *Rhizobium etli* populations and nodulation when co-resident in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris*. *FEMS Microbiology Letters* **142**: 271-276.
- Pielou, E.C. (1969) Association tests versus homogeneity tests: their use in subdividing quadrats into groups. *Vegetation* **18**: 4-18.
- Piñeros, M.A., Shaff, J.E., Manslank, H.S., Alves, V.M. & Kochian, L.V. (2005) Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study. *Plant Physiology* **137**: 231-241.
- Pires, M.N. & Seldin, L. (1997) Evaluation of Biolog system for identification of strains of *Paenibacillus azotofixans*. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**: 195-200.
- Piuri, M., Sanchez-Rivas, C. & Ruzal, S.M. (1998) A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology* **27**: 9-13.
- Priest, F.G. (1993) Systematics and Ecology of *Bacillus* In: "*Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics". (ed). Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. & Losick, R. American Society for microbiology, Washington, D.C.
- Reichardt, K. (1981) Soil physico-chemical conditions and the development of roots. In "The soil-root system in relation to brazilian agriculture. Russel, R.S., Igue, K. & Mehta, Y.R. Londrina, IAPAR. p. 103-114.
- Renesto, P., Gouvernet, J., Drancourt, M., Roux, V. & Raoult, D. (2001) Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 430-437.
- Rosado, A.S., de Azevedo, F.S., da Cruz, D.W., van Elsas, J.D. & Seldin, L. (1998) Phenotypic and genetic diversity of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated

- from the rhizoplane or rhizosphere soil of different grasses. *Journal of Applied Microbiology* **84**: 216-226.
- Rosado, A.S. & Duarte, G.F. (2002) Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. *In: Genética e melhoramento de microrganismos*. Mello, I.S. (ed). EdUSP, São Paulo, pp.97-129.
- Rosado, A.S., Duarte, G.F., Seldin, L. & van Elsas, J.D. (1997) Molecular microbial ecology: a minireview. *Brazilian Journal of Microbiology* **28**: 135-147.
- Rosado, A.S. & Seldin, L. (1993) Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **9**: 521-528.
- Rosado, A.S., Seldin, L., Wolters, A.C. & van Elsas, J.D. (1996) Quantitative 16S rDNA-targeted polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization for the detection of *Paenibacillus azotofixans* in soil and the wheat rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* **19**: 153-164.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Salles, J.F., De Souza, F.A. & van Elsas, J.D. (2002) Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1595-1603.
- Salles, J.F., van Veen, J.A. & van Elsas, J.D. (2004) Multivariate analysis of *Burkholderia* species in soil-effect of crop and land use history. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 4012-4020.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Satokari, R.M., Vaughan, A.D.L., Akkermans, M., Saarela & Vos, W.M. (2001) Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 504-513

- Schaeffer, P. (1969) Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes, and exotonins. *Bacteriological Reviews* **33**: 48-71.
- Seldin, L. (1992) Primary characterization of the bacteriophage BA-4 from a nitrogen-fixing *Bacillus azotofixans* strain. *Microbios* **71**: 167-177.
- Seldin, L., Azevedo, F.S., Alviano, D.S., Alviano, C.S. & Bastos, M.C.F. (1999) Inhibitory activity of *Paenibacillus polymyxa* SCE2 against human pathogenic micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* **28**: 423-427.
- Seldin, L. & Penido, E.G.C. (1986) Identification of *Bacillus azotofixans* using API tests. *Antonie van Leeuwenhoek* **52**: 403-409.
- Seldin, L., van Elsas, J.D. & Penido E.G.C. (1984) *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soil and grass roots. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**: 451-456.
- Seong, C.N., Goodfellow, M., Ward, A. C. & Hah, Y.C. (1993) Numerical classification of acidophilic actinomycetes from acid soil. *Korean Journal of Microbiology* **31**: 355-363.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S. & Myers, R.M. (1989) Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **86**: 232-236.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K. & Komagata, K. (1997) Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis* and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 289-298.
- Shishido, M., Loeb, B.M. & Chanway, C.P. (1995). External and internal root colonization of lodgepole pine seedlings by two growth-promoting *Bacillus* strains originated from different root microsites. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 707-713.

- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H. & Berg, G. (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4742-4751.
- Thies, J.E. (2007) Soil Microbial Community Analysis using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Soil Science Society of America Journal* **71**: 579–591.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876-4882.
- Thorn, G. (1997) The fungi in soil. *In*: van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.), *Modern soil Microbiology*. Marcel Decker, Inc., NY, pp. 63-127.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F.L., Sorheim, R., Michalsen, J. & Salte, K. (1994) Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities. *In*: *Beyond the Biomass* (Ritz, K., Dighton, J. and Giller, K.E., Eds.), Wiley, Chichester, United Kingdom.
- Vasconcellos, C.A., Santos, H.L. & Franca, G.E. (1988) Calagem e adubacao na cultura do sorgo. *In* "Recomendações técnicas para o cultivo do sorgo". Sete Lagoas MG. Embrapa – Milho e Sorgo. (Circular Técnica, 3ª ed.).
- van Elsas, J.D., Duarte, G.F., Rosado, A.S. & Smalla, K. (1998) Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in soil environment. *Journal of Microbiological Methods* **32**: 133-154.
- von der Weid, I., Alviano, D.S., Santos, A.L.S., Soares, R.M., Alviano, C.S. & Seldin, L. (2003) Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. *Journal of Applied Microbiology* **95**: 1143-1151.
- von der Weid, I., Artursson, V., Seldin, L. & Jansson, J.K. (2005) Antifungal and root surface colonization properties of GFP-tagged *Paenibacillus brasilensis* PB177. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**: 1591-1597.

- von der Weid, I., Duarte, G.F., van Elsas, J.D. & Seldin, L. (2002) *Paenibacillus brasilensis* sp. nov., a new nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 2147-2153.
- von der Weid, I., Nobrega, A., Paiva, E., van Elsas, J. D. & Seldin, L. (2000) Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in cerrado soil. *Research in Microbiology* **151**: 369-381.
- Walker, R., Powell, A.A. & Seddon, B. (1998) *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf french beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. *Journal of Applied Microbiology* **84**: 791-801.
- Witz, D. F., Detroy, R. W. & Wilson, P. W. (1967) Nitrogen fixation by growing cells and cell-free extracts of the *Bacillaceae*. *Archives in Microbiology* **55**: 369-381.

ANEXOS

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](#)