

Marcia Reed Rodrigues Coelho

**ANÁLISE MOLECULAR DE DIAZOTRÓFICOS PRESENTES NA
RIZOSFERA DE DIFERENTES CULTIVARES DE SORGO**



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 à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientador: Profa. Dra. Lucy Seldin



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
AGOSTO DE 2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

COELHO, Marcia Reed Rodrigues

ANÁLISE MOLECULAR DE DIAZOTRÓFICOS PRESENTES NA RIZOSFERA DE DIFERENTES CULTIVARES DE SORGO

Rio de Janeiro, 2008

92p

Tese: Doutorado em Ciências (Microbiologia)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2008.

Orientador: Lucy Seldin

Referências bibliográficas: f 130

1. Sorgo 2. Diazotróficos 3. Gene *nifH* 4. DGGE 5. PCR em tempo real
6. *Paenibacillus* 7. Cerrado

I. Coelho, Marcia Reed Rodrigues.

II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Doutorado em Ciências (Microbiologia).

III. Análise molecular de diazotróficos presentes na rizosfera de diferentes cultivares de sorgo

“O essencial é invisível aos olhos”

Antoine de Saint-Exupéry

*À minha família, em especial ao
meu querido tio Beto. Que a sua
alegria e a sua bondade sirvam de
exemplo para todos.*

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Microbiana, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro sob a orientação da Profa. Dra. Lucy Seldin e na Universidade de Newcastle upon Tyne, sob co-orientação do Prof. Dr. Anthony O'Donnell.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo dom da vida, por todas as bênçãos que recebi e por me guiar sempre nos caminhos certos.

À minha orientadora Dra. Lucy Seldin, por ter me dado tantas oportunidades em seu laboratório que proporcionaram o meu desenvolvimento profissional. Por ser um exemplo de pessoa e de profissional fazendo de tudo e dando sempre o seu melhor pelo bem e o sucesso do nosso laboratório.

Aos meus pais biológicos e científicos Rosalie e Fernando, que me mostraram desde pequena o fascinante mundo da ciência. Pelo carinho inesgotável, o amor incondicional, a presença constante e o incentivo que sempre me deram. Foram os seus exemplos de atitude e caráter que me fizeram ser quem eu sou hoje. Espero que um dia eu possa retribuir pelo menos um pouquinho de tudo o que recebi de vocês.

À minha irmãzinha Patricia, por simplesmente existir! Pelo seu carinho e amor de sempre, por dividir comigo os momentos alegres e tristes da minha vida, por aturar as conversas científicas chatas na hora do jantar e pelos momentos de descontração e “maluquice” que tivemos quando fiquei escrevendo esta tese. Também às minhas primas Paola e Juliana por serem minhas irmãs, minhas amigas e por nós estarmos sempre juntas. Vocês todas são maravilhosas. Que nós 4 sejamos unidas assim para sempre!

Ao meu namorado Maurício por estar sempre presente, mesmo quando estamos a milhas e milhas de distância, por todo amor, carinho, amizade e cumplicidade de tantos anos, por acreditar em mim e estar sempre me incentivando muito. Te amo!

À minha família, incluindo os queridos agregados, que é o que eu tenho de mais valioso nesta vida, por ser perfeita dentro da sua imperfeição, por ser sempre o meu porto seguro e me proporcionar tantos momentos de alegria, mesmo nos momentos mais tristes que passamos juntos. Em especial a Vovó Lulu e Tia Alzira, por serem minhas segundas mães e me amarem tanto.

À Elisa, José Álvaro, Vivi, Daniel e Carol pelo carinho e incentivo de sempre.

Aos amigos que eu fiz no Laboratório de Genética Microbiana e que acompanharam toda ou parte da trajetória deste trabalho, que começou quando eu entrei no lab. Janinha! (o que seria de nós e do lab sem você?), Deyvison, Diogo Bastos, Diogo Jurelevicius, Erika, Fábio, Joana, Juliana, Kátia, Luciano, Natália, Natalie, Ralph, Renata, Silvia, Simone Cotta, Simone Siqueira e Vanessa. Nós fazemos um ótimo time!! Obrigada pela amizade, conversas (científicas ou não), festinhas e pelo ótimo ambiente de trabalho que nós temos.

Aos amigos de outros laboratórios, carinhosamente chamados de agregados: Raquel Peixoto, Prof. André Santos, Felipe Dias, Profa. Eliana Bergter, Prof. Walter Oelemann, Patrícia Hodos, Claudia Cunha e Marcela Aboim.

Às minhas amigas Elisa, Irene, Raquelzinha, Juliana e Júlia pela nossa amizade preciosa. Muito obrigada por dividirem comigo problemas, soluções, sonhos e muitas alegrias. Adoro vocês!

Aos meus amigos: Bianca, Daniel, Marcela, Renata, Maria Emília, Bebel, Fefi e Paulinha. Aos meus amigos da USU: Marcinha, Maria, Mireille, Natália, Talita e Rodrigo. Obrigada pelo carinho, por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos, festas, bate-papos, conversas, conselhos, enfim, pela nossa amizade. Vocês são muito especiais!

Aos meus amigos pequeninos que fazem a vida ser muito mais alegre com a sua presença: Victinho, Luaninha, Babi, Juju e Miguelzinho.

Ao Prof. Alexandre Rosado por ser um inovador nato e sempre tentar levar seus colegas de trabalho e todo o Instituto para mais perto do futuro.

Ao Prof. Andrew Macrae por estar sempre empenhado em ajudar e dividir seus conhecimentos, especialmente os de bioinformática, com os alunos, e por ter sido um grande incentivador, principalmente na minha ida para o exterior.

Ao Prof. Tony O'Donnell por ter me recebido em seu laboratório e permitido que eu realizasse no doutorado sanduíche parte deste trabalho, e a todos do *Institute for Research on Environment and Sustainability*, em especial Sasha Jenkins, Clare Lanyon e Ian Waite pela imensa ajuda com os experimentos e amizade de sempre.

Aos amigos que fiz em Newcastle: Mimi, Simon, Katia, Emerson, Vivi, Juliana, Carlo, Ivana, Nikki, Chris, Tasos, Cessie, Cedric, Kerry, Mayami, entre outros, que ajudaram a tornar o período em que eu fiquei fora do Brasil muito mais agradável do que eu imaginava. Cheers!

Ao Dr. Ivanildo Marriel e ao Dr. Newton Carneiro da EMBRAPA Milho e Sorgo pela indispensável colaboração neste e em outros trabalhos, sempre nos ajudando com a realização dos ensaios de campo e também com o seqüenciamento de amostras de DNA.

Ao CNPq pela bolsa de estudos a mim concedida nestes quatro anos e à CAPES, através do programa PDEE, pela bolsa de doutorado sanduíche que permitiu a minha ida para a Inglaterra.

À Profª. Thaís Souto-Padrón, coordenadora do programa de pós-graduação em Microbiologia da UFRJ, pela sua dedicação e esforço em manter a qualidade do curso.

Ao Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, na pessoa de sua atual diretora, Profª. Agnes Marie de Sá Figueiredo, aos professores e funcionários pelas condições de trabalho oferecidas.

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

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
1 – INTRODUÇÃO.....	7
1.1 – O plantio de sorgo no Brasil.....	7
1.2 – O Solo.....	7
1.3 - Interações microrganismo-planta.....	8
1.4 - A fixação biológica do nitrogênio.....	11
1.5 – <i>Paenibacillus</i> fixadores de nitrogênio e aplicações na agricultura.....	13
1.6 – Diversidade e ecologia molecular de microrganismos.....	18
1.7 – Técnicas moleculares para estudos de diversidade e ecologia microbiana.....	19
2 – JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	26
3 – OBJETIVOS.....	27
4 – ETAPAS DESENVOLVIDAS.....	28
5 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
5.1 – Análise da diversidade e identificação dos principais grupos de bactérias diazotróficas presentes na rizosfera de duas cultivares experimentais de sorgo plantadas em solo com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, utilizando-se a estratégia de clonagem e seqüenciamento do gene <i>nifH</i>	30
5.2 – Análise da diversidade molecular e quantificação do gene <i>nifH</i> de bactérias presentes na rizosfera de duas cultivares comerciais de sorgo plantadas em solo com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, utilizando-se as técnicas de PCR-DGGE e PCR em tempo real (<i>Real Time PCR</i>).....	34
5.3 – Desenvolvimento de iniciadores específicos para <i>Paenibacillus</i> fixadores de nitrogênio com base no gene <i>nifH</i> e análise da diversidade da população de <i>Paenibacillus</i> fixadores de nitrogênio utilizando-se a estratégia de clonagem e seqüenciamento do gene <i>nifH</i>	38
5.4 – Meios de cultura, soluções e tampões.....	41
6 – RESULTADOS.....	45
6.1 – Análise da diversidade e identificação dos principais grupos de bactérias diazotróficas presentes na rizosfera de duas cultivares experimentais de sorgo plantadas em solo com baixo	

e alto teor de adubo nitrogenado, utilizando-se a estratégia de clonagem e posterior seqüenciamento do gene <i>nifH</i>	45
6.2 – Análise da diversidade molecular e quantificação do gene <i>nifH</i> de bactérias presentes na rizosfera de duas cultivares comerciais de sorgo plantadas em solo com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, utilizando-se as técnicas de PCR-DGGE e PCR em tempo real (<i>Real Time PCR</i>).....	55
6.3 – Desenvolvimento de iniciadores específicos para <i>Paenibacillus</i> fixadores de nitrogênio com base no gene <i>nifH</i> e análise da diversidade da população de <i>Paenibacillus</i> fixadores de nitrogênio utilizando-se a estratégia de clonagem e seqüenciamento do gene <i>nifH</i>	61
7 – DISCUSSÃO	67
7.1 – Análise da diversidade e identificação dos principais grupos de bactérias diazotróficas presentes na rizosfera de duas cultivares experimentais de sorgo plantadas em solo com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, utilizando-se a estratégia de clonagem e seqüenciamento do gene <i>nifH</i>	67
7.2 – Análise da diversidade molecular e quantificação do gene <i>nifH</i> de bactérias presentes na rizosfera de duas cultivares comerciais de sorgo plantadas em solo com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, utilizando-se as técnicas de PCR-DGGE e PCR em tempo real (<i>Real Time PCR</i>).....	72
7.4 – Desenvolvimento de iniciadores específicos para <i>Paenibacillus</i> fixadores de nitrogênio com base no gene <i>nifH</i> e análise da diversidade da população de <i>Paenibacillus</i> fixadores de nitrogênio utilizando-se a estratégia de clonagem e seqüenciamento do gene <i>nifH</i>	76
8 – CONCLUSÕES	79
9– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXOS	90

RESUMO

Marcia Reed Rodrigues Coelho

ANÁLISE MOLECULAR DE DIAZOTRÓFICOS PRESENTES NA RIZOSFERA DE DIFERENTES CULTIVARES DE SORGO

Orientador: Lucy Seldin

Resumo da Tese de Doutorado submetida 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).

Neste estudo foi avaliada a diversidade de diazotróficos e a abundância do gene *nifH* na rizosfera de diferentes cultivares de sorgo plantadas em solo de Cerrado contendo concentrações contrastantes de nitrogênio (12 e 120 kg/ha), através de técnicas moleculares como clonagem e seqüenciamento do gene *nifH*, DGGE e PCR em tempo real. Foram construídas 4 bibliotecas a partir do produto da amplificação com iniciadores para o gene *nifH* do DNA da rizosfera das cultivares experimentais IPA 1011 e IS 5322-C (eficiente e ineficiente na ausência de nitrogênio, respectivamente) plantadas com alto e baixo teor de nitrogênio. Ao todo foram analisadas 245 seqüências que compunham estas bibliotecas de clones. A maioria dos clones (57%) foram relacionados a seqüências de *nifH* de clones ambientais não cultivados. Foram encontradas seqüências afiliadas a *Azohydromonas* spp., *Ideonella* sp., *Rhizobium etli* e *Bradyrhizobium* sp. em todas as bibliotecas. Foram encontradas seqüências de *Delftia tsuruhatensis* nas duas cultivares com altos níveis de nitrogênio, enquanto foram detectados clones de *Methylocystis* sp. somente em plantas tratadas com baixos níveis de nitrogênio. Além disso, as bibliotecas das amostras com baixo teor de nitrogênio apresentaram 30% mais clones de *Bradyrhizobium* sp. do que as com alto teor de fertilizante. A análise estatística mostrou que o teor de nitrogênio foi o fator que mais influenciou as populações de diazotróficos.

A análise discriminante do perfil de DGGE obtido de amostras de DNA do solo e da rizosfera das cultivares comerciais de sorgo (BRS 308 e BRS 310) amplificado com iniciadores para o gene *nifH* mostrou uma separação clara das amostras em três grupos: i) amostras da cultivar BRS 308 com alto teor de nitrogênio, ii) amostras de BRS 308 com baixo teor de

nitrogênio, juntamente com as amostras da cultivar BRS 310 com ambos os níveis de adubação e iii) amostras do solo não rizosférico. Este agrupamento mostra que o nível de adubação influenciou a comunidade de dizotróficos da cultivar BRS 308, mas não a da cultivar BRS 310 e do solo não rizosférico. A análise feita por PCR quantitativo mostrou que a abundância do gene *nifH* variou entre $2,4 \times 10^5$ e $1,3 \times 10^7$ cópias por grama de solo. Em ambas as cultivares houve uma redução na densidade do gene *nifH* quando foram aplicados altos níveis de nitrogênio. A rizosfera da cultivar BRS 308 apresentou uma maior densidade do gene *nifH* em comparação à da cultivar BRS 310 e do solo não rizosférico. Estes resultados demonstraram uma influência da cultivar e da quantidade de nitrogênio aplicado na densidade das populações de dizotróficos.

Neste trabalho também foi desenvolvido um par de iniciadores específicos para o gênero *Paenibacillus* com base no gene *nifH* para o estudo de populações de fixadores de nitrogênio deste gênero em amostras ambientais. Os novos iniciadores nifHPAENf e nifHPAENr foram utilizados para construir duas bibliotecas de clones do gene *nifH* de *Paenibacillus* a partir da rizosfera de sorgo (BRS 308) com baixo e alto teor de nitrogênio. O seqüenciamento e a análise dos clones revelaram uma dominância da espécie *P. durus* e uma maior diversidade de seqüências na amostra com alto teor de nitrogênio.

Palavras-chave: Sorgo, rizosfera, diazotróficos, gene *nifH*, DGGE, PCR em tempo real, *Paenibacillus*

ABSTRACT

Marcia Reed Rodrigues Coelho

MOLECULAR DIVERSITY OF DIAZOTROPHS IN THE RHIZOSPHERE OF DIFFERENT CULTIVARS OF SORGHUM

Supervisor: Lucy Seldin

Resumo da Tese de Doutorado submetida 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).

In this study the diversity of potential diazotrophs and the *nifH* gene abundance in the rhizosphere of different cultivars of sorghum sown in Cerrado soil amended with contrasting levels of nitrogen fertilizer (12 and 120 kg/ha) were assessed by molecular approaches, such as cloning and sequencing of *nifH* PCR fragments, DGGE and real time PCR. Four clone libraries were generated from DNA samples of experimental cultivars IPA 1011 and IS 5322-C (efficient and inefficient when no nitrogen was applied) under low and high levels of nitrogen, and 245 *nifH* sequences were analysed. Most of the clones (57%) were closely related to uncultured environmental clones. *nifH* clones affiliated with *Azohydromonas* spp., *Ideonella* sp., *Rhizobium etli* and *Bradyrhizobium* sp. were found in all libraries. Sequences related to *Delftia tsuruhatensis* were found in both cultivars with high levels of nitrogen, while clones affiliated with *Methylocystis* sp. were detected only under low levels of nitrogen. Moreover, libraries from samples treated with low levels of nitrogen presented 30% more clones of *Bradyrhizobium* sp. than samples with high levels of fertilizer. Statistical analysis showed that the amount of nitrogen used was the determinative factor that influenced the diazotrophic populations.

Discriminant analysis based on DGGE profiles obtained from commercial sorghum cultivars BRS 308 and BRS 310 DNA samples amplified with *nifH* primers showed that they could be separated into 3 groups: i) cultivar BRS 308 sown with high levels of nitrogen, ii) cultivar BRS 308 sown with low levels of nitrogen and cultivar BRS 310 sown either with low or high levels of nitrogen, and iii) non-rhizospheric soil. This grouping suggests a strong influence of the nitrogen level on the diazotrophic community found in the rhizosphere of cultivar BRS 308 but not of cultivar BRS 310 or in non-rhizospheric soil. Quantification by q-

PCR showed that the quantity of *nifH* gene varied from 2.4×10^5 to 1.3×10^7 copies per g of soil in bulk and rhizospheric soil. Rhizosphere of cultivar BRS 308 presented a greater abundance of *nifH* gene when compared to cultivar BRS 310 and non-rhizospheric soil, showing the cultivar influence in diazotrophs population densities. A reduction on *nifH* density was observed in the rhizospheres of both cultivars of sorghum when high levels of nitrogen were applied, indicating that the amount of nitrogen fertilizer added to the soil also influence the diazotrophic population densities. However, this trend was not observed in non-rhizospheric soils.

In this work, a pair of primers specific to the genus *Paenibacillus* based on *nifH* gene was designed and validated aiming to study the potential nitrogen-fixing populations belonging to this genus in environmental samples. The new primers (nifHPAENf and nifHPAENr) were used to construct clone libraries of *Paenibacillus nifH* gene using DNA samples from rhizospheric soil of sorghum sown with low and high levels of nitrogen. Sequencing analysis revealed a clear dominance of *P. durus* species in both samples and a greater sequence diversity in the sample treated with high levels of nitrogen.

Keywords: Sorghum, rhizosphere, diazotrophs, *nifH* gene, DGGE, real time PCR, *Paenibacillus*

Rio de Janeiro
Agosto de 2008

LISTA DE ABREVIATURAS

16S rDNA – fragmento oriundo da amplificação por PCR do gene codifica a subunidade menor do ribossomo bacteriano

16S rRNA – subunidade menor do ribossomo bacteriano (16S)

dag – decagrama (10 g)

DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (eletroforese em gel com gradiente desnaturante)

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EtBr – brometo de etídio

ex. – Por exemplo

FBN – Fixação biológica do nitrogênio

ha – Hectares

IPTG - *Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*

kb – Quilo base (1000 pb)

kg – Quilogramas

mRNA – RNA mensageiro

N – Nitrogênio

ng – Nanogramas

nifH – gene que codifica a enzima dinitrogenase redutase

pb – Pares de base

PCA – *Principal Component 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

PLS-DA – *Partial Least Squares - Discriminat Analysis* (análise discriminante com calibração multivariada por quadrados mínimos parciais)

qPCR – *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (reação quantitativa de polimerização em cadeia)

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (análise do polimorfismo de fragmentos de restrição)

RNA – Ácido ribonucléico

rrs – gene que codifica o 16S rRNA

RT-PCR – *Reverse transcriptase –PCR* (PCR com enzima transcriptase reversa)

seg – Segundos

T-RFLP – *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (análise do polimorfismo de fragmentos terminais de restrição)

X-gal – *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside*

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – O plantio de sorgo no Brasil

O sorgo (*Sorghum bicolor*) é uma planta da família *Poaceae*, originária do centro-oeste da África e de parte da Ásia. Trata-se de um cereal de grande importância, que ocupa o quarto lugar na produção mundial, ficando atrás apenas de trigo, arroz e milho. O sorgo é cultivado principalmente na China, Índia, Brasil e África, em mais de 40 milhões de hectares para a produção de grãos, forragem, xarope e açúcar e também para o uso industrial de suas fibras. No Brasil, tem despontado como uma excelente alternativa para as peculiaridades das diversas regiões do país, devido a sua alta produção de grãos e forragem. Esta planta se desenvolve bem nos meses com menor disponibilidade de chuvas, e essa característica faz desta planta uma cultura promissora para o nordeste do Brasil. Nesta região, o sorgo tem se tornado a melhor opção para o pequeno produtor por ser um cereal de alta produtividade e melhor adaptação. A grande importância econômica desta planta se deve a sua ampla utilização na produção de ração animal. Além disso, pesquisas realizadas pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) comprovam que a adição de até 20% da farinha de sorgo à farinha de trigo, na panificação, não modifica o gosto, a textura e a qualidade do produto (RUAS, GARCIA & TEIXEIRA, 1988).

1.2 – O Solo

O solo é considerado um ambiente complexo onde fatores químicos, físicos e biológicos estão em constante interação. Ele representa um excelente habitat para diversos organismos como bactérias, fungos, algas, vírus, além da micro e macrofauna. Entretanto, o pleno conhecimento da microbiota do solo, bem como dos processos que nele ocorrem, é uma tarefa importante e difícil e vem sendo objeto de estudo há muitas décadas (SIQUEIRA & FRANCO, 1988, FEENEY *et al.*, 2006, VAN DER HEIJDEN, BARDGETT & VAN STRAALLEN, 2008).

Sabe-se atualmente que nos solos está a maior reserva da biodiversidade da terra e a funcionalidade deste ecossistema, resultante de interações entre processos biológicos, químicos e físicos, sustenta o resto da biosfera terrestre (FEENEY *et al.*, 2006). Os microrganismos do solo exercem atividades importantes nos diversos agrossistemas, promovendo a decomposição da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes, incluindo aí o processo de fixação biológica do nitrogênio. O Brasil tem uma das maiores biodiversidades do mundo devido à grande variedade

de ecossistemas, sendo assim, a conservação e a utilização adequada deste recurso biológico é fundamental para o aumento da qualidade ambiental dos sistemas agrícolas, para a redução do uso de fertilizantes nitrogenados e para a diminuição dos custos para o agricultor (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002)

A região do solo que não está sofrendo a influência de raízes de vegetais pode ser considerada um ambiente oligotrófico, já que geralmente esta região é pobre em fontes de carbono disponíveis (VAN ELSAS & VAN OVERBEEK, 1993). Já o solo ao redor das raízes ou o volume de solo que é influenciado biológica e bioquimicamente por elas, é denominado rizosfera. Esta região possui uma concentração de microrganismos muito maior do que a encontrada no resto do solo, o que se deve à presença de altos níveis de nutrientes, como secreções e exsudatos, liberados por raízes de plantas que promovem o chamado “efeito rizosfera”. Este efeito é caracterizado por uma intensa atividade microbiana nesta região (BOWEN & ROVIRA, 1991).

1.3 - Interações microrganismo-planta

Nos últimos anos, muitos pesquisadores têm se dedicado a estudar as comunidades microbianas associadas a raízes de diversas plantas, bem como suas interações. Apesar de receberem a denominação “interações microrganismo-planta”, na realidade, os microrganismos também interagem entre si na rizosfera, no rizoplano e na filosfera (LUGTENBERG, CHIN-A-WOENG, & BLOEMBERG, 2002). Dependendo do efeito causado nas plantas, os microrganismos que interagem com plantas podem ser classificados como patogênicos, saprófitos ou benéficos (LUGTENBERG, CHIN-A-WOENG, & BLOEMBERG, 2002). As associações benéficas podem ser divididas em simbióticas e não simbióticas, dependendo da natureza da interação. As simbióticas são exemplificadas por bactérias como as do gênero *Rhizobium*, capazes de formar nódulos em raízes de plantas (LYNCH, 1990). As associações não simbióticas são exemplificadas por bactérias de vida livre que se encontram próximas à raiz de diferentes plantas, também chamadas de rizobactérias.

Diversos experimentos já mostraram que estirpes bacterianas específicas, inoculadas em sementes, colonizavam as raízes e aumentavam o crescimento da planta. Para descrever estas estirpes, Kloepper & Schroth (1978) introduziram o termo “rizobactérias promotoras do crescimento de plantas” (“Plant Growth Promoting Rhizobacteria” - PGPR). Numa visão geral, independentemente dos mecanismos de promoção do crescimento da planta, as PGPRs devem colonizar a rizosfera em volta da raiz, o rizoplano (superfície da raiz) ou a raiz (dentro dos

tecidos radiculares) (GLICK, 1995). De acordo com Gray & Smith (2005), os rizóbios podem ser considerados PGPRs devido à bem caracterizada relação de simbiose leguminosa-rizóbio. Estes mesmos autores descrevem para as rizobactérias a existência de um gradiente de proximidade da raiz e intimidade definido por: i) bactérias vivendo no solo ao redor das raízes, utilizando metabólitos excretados pela planta como fontes de carbono e nitrogênio; ii) bactérias colonizando o rizoplane (superfície radicular); iii) bactérias residindo no tecido radicular, habitando os espaços entre as células corticais; iv) bactérias vivendo dentro das células em estruturas radiculares especializadas, ou nódulos. Além disto, Gray & Smith (2005) também propõem uma divisão das PGPRs em dois grupos: PGPRs intracelulares (iPGPR), que englobam as bactérias que habitam o interior das células vegetais, produzem nódulos e estão localizadas dentro dessas estruturas especializadas; e PGPRs extracelulares (ePGPR), que são bactérias que vivem fora das células vegetais, não produzem nódulos, mas melhoram o crescimento da planta através da produção de compostos sinalizadores que estimulam diretamente o crescimento vegetal, aumentam a resistência das plantas ou melhoram a mobilização dos nutrientes do solo. As ePGPRs podem ainda ser classificadas em três tipos diferentes, de acordo com o grau de associação com as raízes das plantas: bactérias que vivem próximo, mas sem estabelecer contato com as raízes; bactérias que colonizam a superfície radicular e bactérias que vivem nos espaços entre as células do córtex radicular. Esta distinção teria um importante papel no desenvolvimento de conceitos e na compreensão dos mecanismos de promoção do crescimento, destacando as diferenças na forma de indução do crescimento.

Várias estirpes de diferentes espécies e gêneros de bactérias presentes no solo já foram descritas como PGPR, entre elas espécies dos gêneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas* e *Frankia* (BASHAN & LEVANONY, 1990, SIMONET *et al.*, 1991, HOLL & CHANWAY, 1992, KLOPPER & BEAUCHAMP, 1992, O'NEIL *et al.*, 1992, SHISHIDO, LOEB & CHANWAY, 1995, CHIARINI *et al.*, 1998). Direta ou indiretamente, as PGPR podem melhorar o desenvolvimento das plantas, promovendo interações positivas com as raízes das mesmas. Indiretamente podem prevenir a proliferação de microrganismos fitopatogênicos através da produção de substâncias antimicrobianas (LUGTENBERG, WEGER & BENNET, 1991, GLICK, 1995), e da competição pela exclusão de nicho (VAN ELSAS & HEIJNEN, 1990). Diretamente podem disponibilizar ou sintetizar nutrientes para a planta, o que pode se dar através da fixação biológica do nitrogênio atmosférico (GLICK, 1995), pela produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal, como ácido indol acético (AIA), giberelinas ou citocininas (NIETO & FRANKENBERGER, 1989), pela produção de compostos capazes de solubilizar o fosfato presente no solo, tornando-o disponível para os vegetais (VAN

VEEN, VAN OVERBEEK & VAN ELSAS, 1997), e pela síntese de sideróforos (O'SULLIVAN & O'GARA, 1992).

Estudos demonstram que o tipo de solo pode influenciar na atividade das PGPR (KLOEPPER, SCHOTH & MILLER, 1980). de Freitas & Germida (1990) sugerem que quanto menos fértil o solo, maior é a estimulação feita pelas PGPR para o crescimento da planta, ao passo que Fages (1994) demonstrou que a promoção do crescimento de milho por uma estirpe de *Azospirillum lipoferum* era independente do tipo de solo e da cultivar da planta. Contudo, a maioria dos autores observa que os maiores aumentos na germinação e na produção, geralmente ocorrem em plantas inoculadas com estirpes de PGPRs isoladas da rizosfera destas próprias plantas. Este fato faz com que seja necessário o estudo das estirpes melhores adaptadas a cada planta e região específica (CHANWAY, HOLL & TURKINGTON, 1988, FAGES & ARSAC, 1991, REED & GLICK, 2004).

PGPRs de vida livre podem ser administradas em plantações em fórmulas disponíveis comercialmente. Como exemplo, podemos citar: *Azospirillum lipoferum* CTR1 (AZOGREEN-m) e *A. brasilense* Cd (Zea-Nit), aplicados no cultivo de milho e *Bacillus subtilis* CB122 (BioYield™) aplicado em cultivo de brócolis, cenoura e tomate (REED & GLICK, 2004). A maioria destes produtos atua como agentes de biocontrole em alternativa ao uso de pesticidas e como fertilizante, contribuindo indiretamente na promoção do crescimento de plantas. Contudo, estas fórmulas ainda não são amplamente utilizadas na agricultura (CHET & CHERNIN, 2002, REED & GLICK, 2004).

Além de serem aplicáveis na agricultura, as PGPRs também podem ser aplicadas na silvicultura e no reflorestamento. Embora alguns tipos de árvores tenham uma germinação rápida e eficiente sem inoculação, muitas têm dificuldade para crescer e se estabilizar como planta adulta (ZAADY & PEREVOLTSKY, 1995). Assim como na agricultura, parece haver uma especificidade na promoção do crescimento, onde uma estirpe bacteriana específica só atua como PGPR em determinadas árvores (SHISHIDO & CHANWAY, 2000). Entretanto, existem também estirpes bacterianas com um amplo espectro de ação, como *Paenibacillus polymyxa* L6, que promove efetivamente o crescimento de diversas variedades de pinheiros e outras espécies de árvores. Curiosamente, essa estirpe foi originalmente isolada da rizosfera de centeio, uma espécie não arbórea (HOLL & CHANWAY, 1992, CHANWAY, 1995). Outro tipo de aplicação de PGPR seria na inoculação de plantas que promovem a biorremediação de solos contaminados. Neste caso, as PGPRs atuariam auxiliando no aumento da biomassa e na nutrição e saúde da planta biorremediadora (BELIMOV *et al.*, 1998).

1.4 - A fixação biológica do nitrogênio

Todos os organismos vivos necessitam de nitrogênio para desenvolver suas funções mais básicas, como a síntese de proteínas. O nitrogênio molecular (N_2) constitui aproximadamente 80% da atmosfera da terra, mas não pode ser diretamente assimilado pela maioria dos seres vivos. Para ser utilizado, o nitrogênio deve ter a tripla ligação entre os seus dois átomos ($N\equiv N$) quebrada, para que os átomos se combinem com o hidrogênio e a amônia (NH_3) possa ser formada e utilizada pelas plantas ($N_2 + 8e^- + 8H^+ + 16MgATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16 MgADP + 16Pi$). A quebra desta ligação exige uma grande quantidade de energia e a presença da enzima nitrogenase que é sensível ao oxigênio. A nitrogenase é constituída por duas proteínas principais: uma maior, tetramérica (contendo duas subunidades α e duas subunidades β), chamada dinitrogenase e também de proteína FeMo ou componente I (codificada pelos genes *nifD* e *nifK*) e uma menor, dimérica (formada por duas subunidades iguais), chamada dinitrogenase redutase e também de proteína Fe ou componente II (codificada pelo gene *nifH*). Além destes genes, outros envolvidos no funcionamento da nitrogenase (aproximadamente 20 genes em *Klebsiella pneumoniae*) vão formar o operon *nif*, atuando na regulação (*nifA* e *nifL*), no transporte de elétrons (*nifJ* e *nifF*), na ativação da proteína Fe (*nifM*), na formação do cofator FeMo-co (*nifQ*, *B*, *V*, *N*, *X* e *E*), entre outras funções ainda desconhecidas (TRIPLETT, 2000, DIXON & KAHN, 2004).

A este processo é dado o nome de fixação biológica do nitrogênio (FBN). Diversas espécies pertencentes a diferentes gêneros de procariotos, que possuem a informação genética para a síntese da nitrogenase (genes *nif*), são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (YOUNG, 1992). Alguns microrganismos podem fixar o nitrogênio atmosférico fazendo uso de nitrogenases alternativas, que contêm vanádio ao invés de molibdênio (genes *vnf*) ou somente Fe, ao invés de molibdênio (genes *anf*) (ENKH-AMGALAN, KAWASAKI & SEKI, 2005, TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Desde 1970 a população mundial aumentou 78%, e a formação de nitrogênio reativo 120%. Neste contexto, o termo nitrogênio reativo corresponde a compostos nitrogenados ativos biológica, fotoquímica e radiologicamente na atmosfera e na biosfera da terra, incluindo as formas inorgânicas reduzidas (ex: NH_3 e NH_4^+), oxidadas (ex: NO , HNO_3 , N_2O e NO_3^-) e os compostos orgânicos (ex: uréia, amins e proteínas), em contraste com o gás nitrogênio não reativo (N_2) (GALLOWAY *et al.*, 2008). O uso extensivo de fertilizantes químicos nitrogenados na agricultura permitiu um aumento significativo na produção mundial. Infelizmente, como consequência, o meio ambiente vem sofrendo impactos negativos como a contaminação dos

lençóis freáticos, que ocorre quando fertilizantes nitrogenados adicionados ao solo são lixiviados e levados até os lençóis freáticos, podendo chegar a rios e lagoas e causar a eutrofização destes ambientes (LEWIS *et al.*, 1984). A acidificação do solo e a produção de óxido nitroso (N₂O) pela desnitrificação (que contribui para efeito estufa) são outros problemas não menos importantes (BISWAS *et al.*, 2000).

A FBN como fonte de adubo para plantas é uma alternativa ecologicamente correta, já que dispensa o uso de aditivos químicos, reduzindo assim os impactos negativos da produção de alimentos e fibras. A biofertilização é responsável por aproximadamente 65% das adubações nitrogenadas em colheitas do mundo inteiro, sendo a família *Rhizobiaceae* o melhor e mais conhecido exemplo de biofertilizante de origem bacteriana (SPAINK, KONDOROSI & HOOYKAAS, 1998). Estirpes destes grupos são capazes de formar nódulos em leguminosas, fixando o nitrogênio para a planta, enquanto esta fornece nutrientes e proteção para a bactéria. Mais recentemente, estirpes do gênero *Burkholderia* também foram descritas como capazes de formar nódulos nas raízes de plantas leguminosas tropicais (VANDAMME *et al.*, 2002).

A fixação do nitrogênio atmosférico por microrganismos do solo de vida livre pode ser considerada como uma pequena fonte de nitrogênio biodisponível, se comparada à simbiose rizóbio-leguminosas (PEOPLES & CRASWELL, 1992, KANUNGO, KAMAKRISHNAN & RAO, 1997). Contudo, a capacidade de fixação não simbiótica do nitrogênio está presente na maioria dos solos e, em determinados ambientes terrestres, pode atuar como uma fonte dominante de nitrogênio. Assim, esses microrganismos diazotróficos são muito diversos e encontrados em vários grupos bacterianos, como Proteobacteria, Cyanobacteria, Firmicutes e Actinobacteria (SIMONET *et al.*, 1991, WIDMER *et al.*, 1999, LOVELL *et al.*, 2000, POLY, MONROZIER & BALLY, 2001b). Dentre os microrganismos de vida livre que se associam a diferentes vegetais e são capazes de fixar nitrogênio, podemos citar como exemplos as espécies *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Clostridium pasteurianum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Azotobacter vinelandii* e *Paenibacillus durus* (UEDA *et al.*, 1995, ROSADO *et al.*, 1998a, LOVELL *et al.*, 2001). Utilizando um consórcio de culturas das bactérias diazotróficas *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*, Oliveira *et al.* (2006) detectaram os efeitos da promoção do crescimento em variedades de cana-de-açúcar micropropagadas plantadas em solo com baixos e médios níveis de fertilizante. Recentemente, pesquisadores da EMBRAPA Agrobiologia desenvolveram um inoculante comercial a partir destas mesmas estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio. Atualmente o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo assim, o uso deste inoculante poderá significar além de uma redução de custos,

um ganho ambiental, já que implicará também na redução da aplicação de até 50% de nitrogênio para a planta (http://www.cnpab.embrapa.br/destaques/inoculante_cana.html).

Diversos autores vêm se dedicando a estudar a diversidade genética de bactérias diazotróficas em solos e na rizosfera de diversas plantas (PICENO, NOBLE & LOVELL, 1999, LOVELL *et al.*, 2000, HAMELIN *et al.*, 2002, REITER *et al.*, 2003). Muitas vezes estes microrganismos aparecem em números elevados, levando a crer que possam ter um papel importante na fixação de nitrogênio (VAN BERKUM & BOHLOOL, 1980, BALLY *et al.*, 1983, UEDA *et al.*, 1995) e na manutenção da fertilidade do solo (YOSHIDA & ARCANJAS, 1973, HIROTA *et al.*, 1978).

1.5 – *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio e aplicações na agricultura

Por muito tempo, bactérias aeróbias que apresentavam a forma de bastonetes e que em condições desfavoráveis tinham a capacidade de formar esporos foram classificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*. Com o advento das técnicas moleculares e devido à grande heterogeneidade do gênero *Bacillus*, Ash *et al.* (1991) realizaram uma análise comparativa da seqüência do DNA ribossomal 16S das espécies que formavam este gênero. Com base nestes dados, foi possível dividir o gênero *Bacillus* em pelo menos 5 linhas filogenéticas distintas, onde um grupo (grupo 3) passou a ser considerado um novo gênero denominado *Paenibacillus* (ASH *et al.*, 1993).

O gênero *Paenibacillus* compreende espécies Gram-positivas, anaeróbias facultativas ou aeróbias estritas e formadoras de endósporos. Vários açúcares são fermentados produzindo metabólitos ácidos. Os níveis de similaridade das seqüências do gene que codifica o 16S rRNA são maiores que 89,6% entre os membros deste gênero e a espécie-tipo do gênero é *P. polymyxa* (SHIDA *et al.*, 1997). Atualmente este gênero possui 91 espécies e 2 sub-espécies publicadas ou em fase de publicação (última atualização feita em 03 de Junho de 2008 – <http://www.bacterio.cict.fr/p/paenibacillus.html> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Dentre estas, 14 são descritas como possuidoras de estirpes capazes de fixar o nitrogênio atmosférico: *P. polymyxa*, *P. macerans*, *P. peoriae*, *P. durus*, *P. graminis*, *P. odorifer*, *P. borealis*, *P. brasiliensis*, *P. wynnii*, *P. massiliensis*, *P. sabinae*, *P. zanthoxyli*, *P. forsythiae* e *P. donghaensis*. Em geral elas são de vida livre, anaeróbias facultativas, formadoras de endósporos e habitam o solo e a rizosfera de diversas plantas. Até alguns anos atrás, o verdadeiro potencial biotecnológico destes microrganismos não simbiotes era praticamente desconhecido. Entretanto, diversos trabalhos têm demonstrado a grande importância destes microrganismos que

exercem, de alguma maneira, um efeito benéfico na promoção do crescimento de plantas (HOLL & CHANWAY, 1992, ROSADO & SELDIN, 1993). Além disso, essas bactérias podem ser de grande importância econômica, uma vez que podem gerar um aumento da produtividade agrícola e um menor consumo de fertilizantes (LUGTENBERG, WEGER & BENNET, 1991).

Em relação a sua importância na agricultura, desde os anos 60, estirpes de *Paenibacillus* vêm sendo descritas como fixadoras de N₂ atmosférico. Outros mecanismos, que não a fixação do N₂, também exercem um papel importante no efeito estimulante sobre as plantas como, por exemplo, a produção de substâncias com atividade semelhante a do ácido indol acético (CHANWAY, HOLL & TURKINGTON, 1988) e a produção de substâncias antimicrobianas (VON DER WEID *et al.*, 2003). Devido a estas características, várias estirpes de *Paenibacillus* podem ser consideradas com PGPR.

Diversas estirpes de *P. polymyxa*, que é a espécie mais estudada do gênero, foram testadas com sucesso na promoção do crescimento de diferentes espécies de gramíneas e plantas forrageiras (CHANWAY, HOLL & TURKINGTON, 1988, HOLL *et al.*, 1988). Além disso, *P. polymyxa* possui também 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). Rosado & Seldin (1993) demonstraram que uma estirpe de *P. polymyxa* isolada de solo de cerrado era capaz de produzir uma nova substância antimicrobiana que inibia o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e fungos. Outros trabalhos mostram também a interação de *P. polymyxa* com 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 ao aumento da nodulação e, conseqüentemente, uma melhoria no desenvolvimento da planta (PETERSEN, SRINIVASAN & CHANWAY, 1996). Além disso, Chanway (1995) verificou que uma estirpe de *P. polymyxa* (L6) promovia efetivamente o crescimento de diversas variedades de pinheiros e outras espécies de árvores podendo ser aplicada na silvicultura e no reflorestamento. Mais recentemente Timmusk, Grantcharova & Wagner (2005) verificaram que esta espécie foi capaz de invadir as raízes de *Arabidopsis thaliana* formando biofilmes e agindo como agente de biocontrole contra fitopatógenos, enquanto Cho *et al.* (2007) isolaram uma estirpe capaz de inibir fungos fitopatogênicos na raiz de ginseng.

A espécie hoje conhecida como *Paenibacillus durus* é considerada um sinônimo de *P. azotofixans*. Em 1994, a espécie *Clostridium durum* foi transferida para o gênero *Paenibacillus* (COLLINS *et al.*, 1994), passando a se chamar *P. durum*. Estirpes pertencentes às espécies *P.*

durum e *P. azotofixans* eram bastante relacionadas (COLLINS *et al.*, 1994). Baseado neste fato e na disponibilidade de técnicas moleculares empregadas na identificação de estirpes de *P. azotofixans*, Rosado, van Elsas & Seldin (1997b) realizaram um estudo comparativo destas duas espécies utilizando um conjunto de iniciadores e uma sonda oligonucleotídica, ambos específicos para o gene que codifica a molécula de 16S rRNA de *P. azotofixans*. O DNA da estirpe-tipo de *P. durum* não só amplificava com os iniciadores, como também apresentava homologia com a sonda nucleotídica. Além disso, foi constatada a presença de seqüências homólogas ao gene *nifKDH* de *Klebsiella pneumoniae* em ambas as espécies, e as hibridizações DNA-DNA revelaram que a homologia do DNA genômico de *P. durum* e *P. azotofixans* variava de 69% a 85%. Com base nestes resultados, Rosado, van Elsas & Seldin (1997b) propuseram que a espécie *P. durum* fosse incluída na espécie *P. azotofixans*. Entretanto, Logan *et al.* (1998), de Vos & Truper (2000) e Truper (2003) determinaram que, além do nome *P. durum* estar graficamente incorreto, devendo ser trocado para *P. durus*, esta espécie deveria ter prioridade sobre *P. azotofixans* (SELDIN, VAN ELSAS & PENIDO, 1984) por ter sido anteriormente chamada de *C. durum* (SMITH & CATO, 1974). Sendo assim, *P. azotofixans* passou a ser considerado sinônimo de *P. durus*.

Estirpes pertencentes à espécie *P. durus* foram isoladas de solo e da rizosfera de raízes de diferentes gramíneas (SELDIN, VAN ELSAS & PENIDO, 1984, ROSADO *et al.*, 1998a). Esta espécie é capaz de usar o N₂ como única fonte de nitrogênio, e todas as suas estirpes são capazes de fixar N₂ com taxas relativamente altas. Além disso, em *P. durus*, a expressão de genes da nitrogenase não é afetada pela presença do nitrato (SELDIN, VAN ELSAS & PENIDO, 1984), podendo fixar nitrogênio mesmo em solos fertilizados com nitrato (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987). Seldin, Bastos & Penido (1989) realizaram um estudo onde 22 estirpes de *P. durus* foram testadas quanto à presença de homologia com os genes *nif* de *K. pneumoniae*. Todas as estirpes testadas apresentaram homologia com os genes *nif* estruturais, mais especificamente, os genes *nifD* e *nifH*. Rosado *et al.* (1998b) desenvolveram um sistema de *nested* PCR com iniciadores específicos para o gene *nifH* de *P. durus* para posterior análise por DGGE. Este estudo revelou a diversidade dos genes *nifH* em populações de *P. durus* e em amostras de solo e rizosfera, e permitiu verificar a heterogeneidade das seqüências de diferentes genes *nifH*, mostrando ainda que *P. durus* provavelmente possui várias cópias deste gene. Achouak, Normand & Heulin (1999) verificaram através de testes de redução de acetileno que, dentre os *Paenibacillus* capazes de fixar nitrogênio, a espécie *P. durus* era a que possuía maior atividade da enzima nitrogenase.

Microorganismos da espécie *P. macerans*, isolados com frequência da rizosfera de diversas gramíneas (PRIEST, 1993), também podem ser consideradas promotoras em potencial do crescimento de plantas, uma vez que também são capazes de fixar o nitrogênio. Produzem ainda substâncias com atividade antimicrobiana (FOGARTY, 1983) que poderiam inibir o desenvolvimento de possíveis fitopatógenos (fungos e/ou bactérias), prejudiciais ao crescimento vegetal. Além disso, Halsall & Gibson (1985) verificaram que culturas mistas de *Cellulomonas gelida* e *Azospirillum sp.* ou *P. macerans* apresentaram a capacidade de decompor a celulose da palha de trigo e utilizar a energia dos produtos resultantes para fixar o nitrogênio atmosférico. Entretanto, até hoje poucos trabalhos foram realizados em regiões de clima tropical e pouco se sabe o papel desta espécie como rizobactéria promotora do crescimento de plantas.

Paenibacillus peoriae é uma espécie próxima a *P. polymyxa* que, na época em que foi descrita, só podia ser diferenciada de *P. polymyxa* por apenas alguns testes fenotípicos. Esta espécie originalmente não foi descrita como fixadora de nitrogênio, entretanto, a presença do gene *nifH* (que codifica a enzima dinitrogenase redutase) já foi comprovada em sua estirpe-tipo (ACHOUAK, NORMAND & HEULIN, 1999). Em 2003, von der Weid *et al.* caracterizaram pela primeira vez uma substância antimicrobiana produzida por uma estirpe de *P. peoriae*. Neste estudo, a estirpe NRRL BD-62 foi capaz de inibir diferentes espécies de fungos e bactérias fitopatogênicas, tornando-se assim um agente em potencial para o controle biológico.

Estirpes de *P. borealis* foram isoladas de húmus de uma floresta na Finlândia e caracterizadas como degradadoras de carboxi-metil celulose e quitina, além de solubilizarem o fosfato orgânico (ELO *et al.*, 2001). Em 2002, Berge *et al.* descreveram as espécies *P. graminis* e *P. odorifer*, isoladas de rizosfera de plantas e de alimentos processados, respectivamente, e a presença do gene *nifH* foi demonstrada nas suas estirpes-tipo. Os autores também verificaram que estas possuíam a seqüência do 16S rDNA muito semelhante a de *P. durus*. Alguns anos depois, Vollú *et al.* (2006) demonstraram que estirpes de *P. graminis* eram capazes de produzir ciclodextrinas, conferindo grande potencial para a aplicação destas na indústria. Neste mesmo ano, von der Weid *et al.*, (2002) descreveram a espécie *P. brasilensis*, com estirpes isoladas de rizosfera de milho. Neste caso, todas as estirpes eram capazes de fixar nitrogênio. Posteriormente, as estirpes PB177 e Sa3 mostraram ser capazes também de produzir substâncias antimicrobianas com um espectro de ação bastante amplo, sendo ativas contra diversos fungos patogênicos para plantas e humanos (VON DER WEID *et al.*, 2005; FORTES *et al.*, 2008). Outra característica importante descrita nesta espécie foi a capacidade da estirpe PB177 de se associar a hifas de fungos micorrízicos (*Glomus sp.* e *Glomus intraradices*), que resultou no aumento da micorrização (TOLJANDER *et al.*, 2005). Além disso, Selim *et al.* (2005)

descreveram um peptídeo produzido pela estirpe B2 de *Paenibacillus* sp. isolada da micorrizosfera de sorgo colonizada por *Glomus mosseae*, com propriedades antagonísticas contra bactérias Gram-positivas e negativas e fungos.

Nos últimos 3 anos, foram descritas seis novas espécies de *Paenibacillus* com estirpes fixadoras de nitrogênio (*P. wynnii*, *P. massiliensis*, *P. sabinae*, *P. zanthoxyli*, *P. forsythiae* e *P. donghaensis*), porém até hoje pouco se sabe sobre elas. A espécie *P. wynnii* foi isolada de amostras de solo da Antártica e todas as estirpes descritas possuem o gene *nifH* (RODRÍGUEZ-DÍAZ *et al.*, 2005). No ano seguinte, Zhao, Xie & Chen (2006) demonstraram a presença de duas cópias do gene *nifH* no genoma de *P. massiliensis* T7 através de experimentos de *Southern blotting*, utilizando como sonda um produto de PCR de *nifH*. Em 2007, foram isoladas cinco estirpes da rizosfera de arbustos (*Sabina squamata*) que possuíam sua seqüência do gene que codifica o 16S rRNA muito semelhante à da espécie *P. durus*. Através da homologia DNA-DNA, de análise do conteúdo de GC e da produção de ácidos a partir de carboidratos estas estirpes foram descritas como uma nova espécie denominada *P. sabinae* (MA *et al.*, 2007a). Ainda neste ano, o mesmo grupo descreveu a espécie nova *P. zanthoxyli*, cujas estirpes haviam sido isoladas da rizosfera de arbustos (*Zanthoxylum simulans*). Estas estirpes possuíam sua seqüência do gene que codifica o 16S rRNA muito similar as das espécies *P. durus* e *P. stellifer*, porém, com base nas características fenotípicas, no conteúdo de GC, na homologia DNA-DNA e nas seqüência do gene *nifH*, elas foram consideradas uma nova espécie (MA, ZHANG & CHEN, 2007b). Em 2008, CHOI *et al.* descreveram a espécie *P. donghaensis*, cujas estirpes foram isoladas de sedimento marinho. Todas foram capazes de degradar xilana e se mostraram filogeneticamente próximas à espécie *P. wynnii*. Neste mesmo ano, MA & CHEN (2008) isolaram da rizosfera da planta *Forsythia mira* uma nova espécie fixadora de nitrogênio denominada *P. forsythiae*. Esta espécie se mostrou bem próxima às espécies *P. durus*, *P. sabinae* e *P. zanthoxyli* na comparação das suas seqüências do gene que codifica o 16S rRNA.

Nos últimos anos, muitas informações foram obtidas a partir de estudos da diversidade genética de espécies de *Paenibacillus* em rizosfera de milho e sorgo (SELDIN *et al.*, 1998, VON DER WEID *et al.*, 2000, MOTA *et al.*, 2002, 2005, COELHO *et al.*, 2007), bem como a partir de estudos de caracterização genética e fenotípica de estirpes deste gênero capazes de fixar nitrogênio (COELHO *et al.*, 2003). Além disso, Vollú *et al.* (2003) descreveram um iniciador específico para a espécie *P. macerans*, facilitando a identificação de novos isolados desta espécie.

Seqüências de DNA de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio têm sido frequentemente isoladas do solo e da rizosfera de diversas plantas em trabalhos que analisam a diversidade de

diazotróficos (REITER *et al.*, 2003, SILVA *et al.*, 2003, ZEHR *et al.*, 2003, BÜRGMANN *et al.*, 2004, DIALLO *et al.*, 2004, MOTA *et al.*, 2005, BUCKLEY *et al.*, 2007, COELHO *et al.*, 2007). Este fato, juntamente com o que já se sabe sobre a importância destas bactérias para a agricultura, permite inferir a importância destes microrganismos no ambiente. Entretanto, poucos estudos foram realizados sobre a diversidade e a ecologia das espécies de *Paenibacillus* descritas mais recentemente.

1.6 – Diversidade e ecologia molecular de microrganismos

A ecologia microbiana abrange o estudo das interações entre os microrganismos e destes com os demais seres vivos que convivem em um habitat comum. É uma área de extrema importância para o entendimento de mecanismos que levam à manutenção e ao equilíbrio entre espécies e sua conservação, bem como para a preservação do ambiente. A biodiversidade encontrada no Brasil, apesar de tão vasta, é pouco conhecida e explorada. Sendo assim, existe uma grande potencialidade do uso de microrganismos que, como citado anteriormente, possuem funções cruciais para a manutenção da vida na terra (MELO & VALADARES, 1998).

A diversidade biológica pode ser considerada como a variedade de espécies em um ecossistema, bem como a variedade genética intra-específica. Esta diversidade supostamente constitui a base da sustentação da atividade agrícola, juntamente com as variedades de plantas cultivadas, seus polinizadores, agentes de controle biológico de pragas e doenças e uma enorme gama de microrganismos envolvidos em processo biogeoquímicos responsáveis pela formação e manutenção dos atributos físicos e da fertilidade do solo (KENNEDY & SMITH, 1995).

O estudo da estrutura das populações bacterianas no solo, rizosfera e rizoplano tem sido alvo de muitas pesquisas, devido à resposta positiva de muitas plantas à inoculação com estirpes bacterianas capazes de melhorar seu desenvolvimento. A colonização bacteriana é afetada por diversos fatores bióticos e abióticos, tais como a dinâmica de populações microbianas na rizosfera, características da planta, tipo de solo e o tipo de manejo deste (KLOPPER & BEAUCHAMP, 1992). Além disso, populações microbianas podem sofrer variações temporárias na estrutura genética devido à pressão seletiva exercida pelo meio ambiente, que provoca trocas genéticas dentro da população local (DI CELLO *et al.*, 1997). Assim, o estudo da estrutura genética das populações microbianas na rizosfera, bem como seus padrões de diversidade, são necessários para se avaliar o impacto de estímulos externos, bem como da adição de inoculantes microbianos ao solo, que podem afetar o equilíbrio pré-existente entre populações nativas. Da mesma forma, estes estudos são importantes para o entendimento do papel ecológico destes

microrganismos no ambiente, como também para futuras aplicações biotecnológicas, nas quais é necessário prever o destino dos microrganismos (naturais ou geneticamente modificados) liberados no meio ambiente (WISE *et al.*, 1996, DI CELLO *et al.*, 1997).

1.7 – Técnicas moleculares para estudos de diversidade e ecologia microbiana

Durante muito tempo, a detecção e a identificação de microrganismos em amostras ambientais vinham sendo realizadas, na maioria das vezes, através de plaqueamento e cultivo em meios de cultura. Porém, qualquer meio de cultura é, de uma forma ou de outra, seletivo para um ou outro grupo de microrganismos. Isto faz com que nem sempre seja possível isolar determinadas populações microbianas, uma vez que a maioria das bactérias que habitam o solo não é cultivável (>90%) em meios de cultura (HUGENHOLTZ & PACE, 1996).

Os avanços nas técnicas de biologia molecular, somados aos grandes desenvolvimentos que vem ocorrendo na área de bioinformática, produziram uma renovação na microbiologia ambiental, constituindo uma nova área que tem sido referida como Ecologia Microbiana Molecular (AKKERMANS, VAN ELSAS & DE BRUIJN, 1995, ROSADO *et al.*, 1997a). O uso de métodos moleculares nos oferece respostas a perguntas sobre diversidade microbiana, anteriormente quase impossíveis de serem solucionadas, e permite monitorar microrganismos introduzidos no ambiente (ROSADO *et al.*, 1997a).

1.7.1 – Extração de DNA da comunidade microbiana predominante no solo

Para estudarmos a diversidade e a ecologia microbiana molecular, é de fundamental importância o investimento em métodos eficientes de extração de DNA. Deve ser levado em consideração o fato de que queremos analisar diferentes tipos de organismos, presentes em amostras de diferentes tipos de ambiente. Esta etapa de obtenção do DNA é essencial para que se tenha um resultado confiável, já que é em cima deste DNA extraído que todo o trabalho se desenvolverá (ROSADO *et al.*, 1997a).

Vários protocolos já foram descritos para a extração de ácidos nucléicos do ambiente (OGRAM, SAYLER & BARKAY, 1987, SMALLA *et al.*, 1993, AKKERMANS, VAN ELSAS & DE BRUIJN, 1995, GRIFFITHS *et al.*, 2000). A extração de ácidos nucléicos presentes no solo segue duas abordagens: a lise direta *in situ* ou a indireta, através da extração de células seguida de lise celular, ambas seguidas da extração do DNA total da amostra e de etapas de

purificação. Atualmente diversos *kits* rápidos e eficientes de extração de DNA de amostras ambientais estão disponíveis no mercado.

1.7.2 – PCR – Reação da Polimerase em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR (*polymerase chain reaction*) ou reação da polimerase em cadeia é uma técnica que constitui uma das bases para estudos moleculares de diversidade e ecologia microbiana. Ela permite a amplificação de seqüências de DNA por meio de iniciadores (*primers*) que são oligonucleotídeos que delimitam uma determinada seqüência de DNA que deverá ser amplificada (SAIKI *et al.*, 1988).

Uma das muitas utilidades desta técnica é a detecção de microrganismos no solo a partir de amostras antes consideradas insuficientes para serem analisadas pelos métodos moleculares por possuírem uma quantidade de DNA muito pequena (SMALLA *et al.*, 1993, BRIGLIA *et al.*, 1996).

Nesta técnica, podemos utilizar iniciadores específicos para os microrganismos de interesse. Atualmente, encontramos uma vasta gama de iniciadores que podem ter como alvo desde a população predominante, como no caso de iniciadores universais para fungos, eubactérias ou archaeas, até iniciadores específicos para uma determinada espécie microbiana. Além disso, podemos encontrar na literatura, ou ainda desenvolver, novos iniciadores para o estudo de genes funcionais de microrganismos de interesse.

1.7.3 – Diversidade do gene *nifH*

A maioria dos conhecimentos sobre a genética e a regulação da fixação de nitrogênio foi inicialmente obtida através de estudos em *Azotobacter vinelandii* e *Klebsiella pneumoniae*. Nesta última já foram identificados pelo menos 20 genes que carregam as informações para a realização deste processo (TRIPLETT *et al.*, 1989, RUBIO & LUDDEN, 2005). O gene *nifH* possui seqüências extremamente conservadas entre todos os microrganismos já analisados e é considerado um dos mais antigos genes funcionais descritos (TRIPLETT *et al.*, 1989). As relações filogenéticas entre bactérias, baseadas em divergências na seqüência do gene *nifH*, se apresentam de maneira muito semelhante àquelas inferidas pela análise das seqüências de rDNA 16S (HENNEKE *et al.*, 1985), e essa característica permitiu o desenvolvimento de estratégias moleculares de maneira similar ao que é feito com as seqüências de 16S rDNA. Embora tenha revolucionado nossa visão de diversidade microbiana, sozinha, a análise do gene que codifica a molécula de 16S rRNA não é suficiente para o total entendimento da ecologia microbiana, já que

esta ferramenta não nos fornece informações consistentes sobre as funções biológicas, fisiológicas e ecológicas (ZEHR *et al.*, 2003).

A expressão do gene da nitrogenase é altamente regulada desde níveis de transcrição (CHEN *et al.*, 1998) até modificações pós-traducionais da proteína (KIM, ZHANG & ROBERTS, 1999). Assim, podemos considerar a transcrição do operon *nifHDK* um bom marcador para fixação de nitrogênio, já que este não é constitutivamente expresso e é regulado em resposta a fatores que controlam a fixação do N₂ (ZEHR *et al.*, 2003).

O gene *nifH* tem sido utilizado para se estudar e descrever populações microbianas em diferentes ecossistemas. Assim, por se tratar de um gene funcional, nestes estudos pode ser traçada uma correlação entre estrutura e função da comunidade microbiana. Diversos estudos mostram a utilização do gene *nifH* em técnicas independentes de cultivo para a comparação da população de diazotróficos na rizosfera de plantas como gramíneas de regiões alagadas, vegetações de pastos e batata doce (POLY *et al.*, 2001a, HAMELIN *et al.*, 2002, REITER *et al.*, 2003, DIALLO *et al.*, 2004). Rosado *et al.* (1998b) desenvolveram um sistema de *nested* PCR com iniciadores específicos para o gene *nifH* de *P. durus* com posterior análise por DGGE para se avaliar a diversidade dos genes *nifH* de *P. durus* em amostras de solo e rizosfera. Também através de DGGE, Warttinen *et al.* (2008) verificaram as variações na comunidade diazotrófica ativa na rizosfera e no solo ao redor de plantações de arroz. Além disso, a aplicação deste gene também já foi demonstrada na verificação do efeito da cultivar e da adubação nitrogenada na população de fixadores de nitrogênio e na expressão de genes *nifH*, presentes em raiz de diferentes cultivares de arroz (TAN, HUREK & REINHOLD-HUREK, 2003, KNAUTH *et al.*, 2005).

Filogeneticamente, o gene *nifH* pode ser dividido em 4 grupos (*clusters*) que contém 49 subgrupos diferentes. Destes, 22 não contém nenhum representante cultivável e vários outros subgrupos contêm um ou poucos membros cultiváveis (ZEHR *et al.*, 2003). Está se tornando cada vez mais comum encontrar trabalhos em que os autores isolam seqüências de diazotróficos que se agrupam com seqüências de organismos não cultivados, o que vem demonstrando a importância em potencial destes organismos ainda não cultivados. Buckley *et al.* (2007) desenvolveram uma metodologia com base no DNA marcado com ¹⁵N₂ (¹⁵N₂ DNA-SIP *stable isotope probing*) e puderam detectar diazotróficos de vida livre no solo que eram os responsáveis pela fixação do nitrogênio *in situ*. Do mesmo modo, a maioria das seqüências foi identificada como sendo de organismos fixadores não cultivados. Esta tendência também pode ser observada em diversos estudos de diversidade do gene *nifH* em solos provenientes de várias regiões do planeta como solos tropicais, temperados, árticos e do Tibete onde a maioria dos clones obtidos

foram relacionados a seqüências de fixadores não cultivados, indicando que estas seqüências podem representar um novo e ainda não explorado grupo de fixadores não cultivados (DESLIPPE & EGGER, 2006, IZQUIERDO & NÜSSLEIN, 2006, ZHANG *et al.*, 2006). Atualmente o GenBank possui mais de 16 mil seqüências de *nifH* depositadas (junho de 2008 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), e é um dos maiores bancos de seqüências não ribossomais contendo dados de organismos cultiváveis e não cultiváveis (ZEHR *et al.*, 2003).

1.7.4 – DGGE – Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*Denaturing gradient gel electrophoresis*)

A técnica de DGGE, introduzida na ecologia microbiana por MUYZER, DE WAAL & UITTERLINDEN (1993), permite analisar produtos de PCR de acordo com suas seqüências de pares de bases, e não de acordo com o tamanho dos produtos, como é feito na eletroforese tradicional. Nesta técnica, são utilizados géis de poliacrilamida contendo um gradiente linear desnaturante (de uréia e formamida), nos quais moléculas de DNA com o mesmo tamanho, porém com diferentes seqüências, apresentam perfis migratórios diferentes. A separação se baseia num princípio físico simples de que a mobilidade eletroforética do DNA em um gel de poliacrilamida vai depender da estrutura secundária da molécula, que pode ser helicoidal, parcialmente desnaturada ou fita simples. As moléculas parcialmente desnaturadas, compostas por partes em dupla hélice e partes em fita 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 há a desnaturação de um domínio, ocorre uma transição na conformação da molécula, que passa de helicoidal para parcialmente desnaturada e, nessa situação, a migração da molécula no gel é 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. Então, fragmentos de mesmo tamanho, obtidos após amplificação por PCR e visualizados em gel de agarose, podem ser separados no DGGE, quando possuírem seqüências nucleotídicas distintas.

Através da técnica de DGGE, é possível detectar aproximadamente 50% das variações de seqüências em fragmentos de DNA com até 500 pares de bases (MYERS *et al.*, 1985). Essa

porcentagem 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 grampo de GC, quando anexado à extremidade 5' de um dos iniciadores, é amplificado por PCR juntamente com o DNA e introduzido no fragmento de DNA amplificado (SHEFFIELD, COX & MYERS, 1989), agindo como um domínio de alta resistência à desnaturação, que impede a dissociação das duas fitas do DNA em fitas simples. Normalmente, o comprimento do grampo de GC varia entre 30 e 50 nucleotídeos (MUYZER *et al.*, 1998)

O DNA presente em um gel de DGGE pode ser transferido para membranas de náilon e hibridizado com sondas específicas para detecção de grupos microbianos específicos. Além disso, bandas podem ser cortadas do gel, eluidas, 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 técnica de DGGE vem sendo empregada em diversos trabalhos de análise de comunidade bacteriana total baseados no gene que codifica a molécula de 16S rRNA permitindo assim, a detecção, a identificação e o monitoramento de membros predominantes da comunidade, os quais são muitas vezes organismos não cultiváveis em laboratório. O número e a posição das bandas no gel de DGGE fornecem uma estimativa do número e da abundância relativa das populações numericamente predominantes numa amostra e permitem a comparação de diversas comunidades microbianas (BOON *et al.*, 2002). Também através do DGGE, grupos bacterianos específicos podem ser estudados dentro de uma comunidade através de iniciadores específicos baseados em seqüências do gene que codifica 16S rRNA (SALLES, DE SOUZA & VAN ELSAS, 2002, SILVA *et al.*, 2003) ou em outros genes de interesse como *nifH* (ROSADO *et al.*, 1998b, PICENO, NOBLE & LOVELL, 1999, DIALLO *et al.*, 2004).

Contudo, assim como muitas outras técnicas, o DGGE possui limitações metodológicas. As limitações estão relacionadas às variáveis envolvidas no processo como um todo, tais como: a eficiência da extração de DNA, que pode ser mais eficaz na lise de um grupo microbiano em detrimento de outro; o grau de especificidade dos iniciadores, definido em função de seqüências de microrganismos conhecidos e seqüenciados; o procedimento de amplificação por PCR, que pode apresentar amplificação preferencial de algumas seqüências e formação de artefatos de técnica; a co-migração de bandas no gel; além dos problemas referentes a variações de seqüências, devido à heterogeneidade de alguns genes que estão presentes em mais de uma cópia no genoma bacteriano (HEUER & SMALLA, 1997, MUYZER & SMALLA, 1998).

1.7.5 – Clonagem e seqüenciamento de genes

Quando se deseja conhecer a estrutura de uma comunidade microbiana do solo e/ou compará-la numa escala espacial e temporal, observando e analisando-se, por exemplo, os efeitos do tempo ou de alguma variável biótica ou abiótica, a técnica de DGGE se faz muito útil e confiável. Porém, quando estamos mais interessados não mais na estrutura da comunidade, mas sim na identificação dos microrganismos que dela fazem parte, a técnica de DGGE deixa um pouco a desejar. Isso porque, na técnica de DGGE, seria necessária a excisão e eluição das bandas contidas no gel de poliacrilamida, para um posterior seqüenciamento das mesmas. Muitas vezes isso não é possível devido à grande quantidade de bandas numa mesma amostra e à co-migração de bandas, o que torna inviável o seqüenciamento devido a sobreposição de picos. Além disso, a quantidade de bandas presentes num gel é limitada, representando cerca de 0,5 a 1% da comunidade (HEUER & SMALLA, 1997, MUYZER & SMALLA, 1998). Nesses casos uma técnica alternativa seria a construção de uma biblioteca de clones. Para isso é feita uma reação de amplificação por PCR do DNA da amostra ambiental com iniciadores baseados no gene que se pretende estudar, o fragmento amplificado é inserido num vetor de clonagem e, a partir daí é construída uma biblioteca de clones deste gene. Os clones obtidos que possuem o gene inserido são seqüenciados e assim podemos identificar as seqüências dos microrganismos presentes na amostra, comparando-se estas com as já depositadas nos bancos de dados (GenBank, RDP, EMBL).

1.7.6 – PCR em Tempo Real (*Real Time PCR*)

A técnica de PCR em tempo real, ou PCR quantitativo, permite a detecção da amplificação de seqüências de DNA e a quantificação do produto amplificado a cada ciclo através de uma molécula repórter fluorescente (sondas fluorescentes), como Taqman, e corantes que se ligam ao DNA, como SYBR Green I. O PCR quantitativo monitora a fluorescência emitida pela molécula repórter durante a extensão de cada ciclo, sendo o sinal diretamente proporcional à quantidade de produto de PCR. A partir de diluições seriadas de amostras de DNA de concentração conhecida, são construídas curvas padrão para facilitar a quantificação de amostras ambientais desconhecidas, comparando-as com o padrão. A quantificação das concentrações iniciais é feita pela determinação do *cycle threshold* (Ct), ponto que detecta o

ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial e a fluorescência emitida pelo acúmulo de amplicons é significativamente maior dos níveis de fluorescência do *background*. Nesse ponto o número de genes amplificados é proporcional ao número de genes presentes na amostra ambiental e, conseqüentemente, amostras desconhecidas podem ser quantificadas (comparando-se seus valores de Ct com os da curva padrão). Quanto maior a concentração inicial de DNA alvo, mais precocemente o valor de Ct é atingido, enquanto reações contendo menores concentrações de DNA alvo vão necessitar de um maior número de ciclos de amplificação antes do nível da fluorescência ser maior que o nível da do *background*.

Esta técnica foi desenvolvida para uso na área médica, principalmente na execução de diagnósticos mais precisos e mais rápidos. Atualmente ela vem sendo aplicada na microbiologia ambiental permitindo a detecção e a quantificação do número de cópias de genes e de transcritos microbianos a partir de amostras ambientais. Hoje, um dos desafios para os pesquisadores na ecologia microbiana é tentar relacionar informações sobre a abundância de uma determinada população bacteriana no ambiente com sua atividade funcional (GRAY & HEAD, 2001). Assim, medir a abundância de genes funcionais como indicativo de sua atividade pode nos ajudar a fazer uma correlação de função com dados estruturais. Desta forma, esta técnica nos permite quantificar genes de interesse envolvidos em determinados processos biológicos, independentemente do organismo responsável pela reação enzimática. Além disso, estas informações nos ajudam a descrever a relação entre fatores ambientais e a expressão de genes de interesse para compreender como esses processos são regulados (SHARMA *et al.*, 2007).

Em estudos de comunidades diazotróficas, a técnica de PCR em tempo real já foi aplicada para determinar a abundância de seqüências do gene *nifH* em ambientes marinhos e aquáticos e identificar padrões na distribuição vertical, temporal e sazonal dos filotipos deste gene (SHORT, JENKINS & ZEHR, 2004, SHORT & ZEHR, 2005, CHURCH *et al.*, 2005a, CHURCH *et al.*, 2005b). Em um outro estudo, Juraeva *et al.* (2006) desenvolveram um método para quantificar o número de cópias do gene *nifH* em plantas, avaliando a contribuição direta da comunidade de diazotróficos presentes na raiz e na parte aérea de pepino no fornecimento de nitrogênio para a planta. Wallenstein & Vilgalys (2005) também utilizaram PCR em tempo real para quantificar vários genes de importância no ciclo do nitrogênio, incluindo o gene *nifH*, em dois solos de floresta. Os solos apresentaram uma grande diferença na abundância destes genes, o que pode ser um reflexo da diferença nos processos do ciclo do nitrogênio nos solos estudados.

2 – JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

A importância dos microrganismos diazotróficos já está bem definida para a comunidade científica mundial. Recentemente vários trabalhos têm feito uso de ferramentas moleculares para o estudo de comunidades diazotróficas nos ambientes terrestres, aquáticos e marinhos. Ainda assim, a maioria dos trabalhos até hoje realizados foram feitos com técnicas dependentes de cultivo. Levando-se em consideração que aproximadamente 90% dos microrganismos do solo não foram ainda cultivados, o uso de técnicas moleculares é de fundamental importância para se avaliar a diversidade e o potencial das bactérias fixadoras de nitrogênio. Como na maioria das vezes os diazotróficos não são predominantes no solo, o uso do gene *nifH* em estudos moleculares torna-se uma excelente alternativa ao gene que codifica a molécula de 16S rRNA, que abrangeria a comunidade total dominante e não necessariamente os fixadores.

Como citado anteriormente o gênero *Paenibacillus* possui 14 espécies com estirpes capazes de fixar nitrogênio, porém relativamente pouco se sabe a respeito do papel destes microrganismos na FBN em solos brasileiros utilizados na agricultura. Estirpes, bem como seqüências de *Paenibacillus*, têm sido isoladas do solo e da rizosfera de diversas plantas. Entretanto, para o entendimento do real papel de estirpes deste gênero, é importante que haja um aprofundamento do trabalho na ecologia molecular deste grupo.

Assim, a proposta deste trabalho é avaliar a diversidade molecular de bactérias diazotróficas presentes na rizosfera de diferentes cultivares de sorgo plantadas em solo de cerrado no Brasil. As cultivares estudadas foram plantadas com concentrações contrastantes de adubo nitrogenado, para que fosse possível detectar uma possível variação nas populações, o que nos auxiliaria na avaliação de fatores que possam estar controlando a distribuição destes microrganismos neste solo usado na agricultura. Além disso, para que possamos estudar mais especificamente o gênero *Paenibacillus* como fixador de nitrogênio atmosférico, bem como seu papel benéfico na agricultura, são necessários iniciadores específicos para este gênero, com base no gene *nifH*, que também são propostos neste estudo.

3 – OBJETIVOS

- ✓ Analisar a diversidade molecular de bactérias diazotróficas (com base no gene *nifH*) presentes na rizosfera de duas cultivares experimentais de sorgo plantadas em solos com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, verificando a diversidade deste gene e identificando os principais grupos taxonômicos que possam estar sendo selecionados pela baixa quantidade de nitrogênio e assim contribuindo com o fornecimento de nitrogênio na rizosfera para o crescimento da planta.
- ✓ Analisar a estrutura da comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio (com base no gene *nifH*) e a densidade das populações (abundância do gene *nifH*) presentes na rizosfera de duas cultivares comerciais de sorgo plantadas em solos com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, verificando se a estrutura e o número de cópias do gene *nifH* variam de acordo com o teor de nitrogênio aplicado como adubo no solo.
- ✓ Desenvolver e validar iniciadores específicos para *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio com base no gene *nifH*, que permitam a utilização deste gene como um marcador molecular. Utilizar os iniciadores desenvolvidos para analisar a diversidade de populações de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio presentes na rizosfera de sorgo com baixo e alto teor de adubo nitrogenado.

4 – ETAPAS DESENVOLVIDAS

Neste trabalho foram utilizadas diferentes cultivares de sorgo. Primeiramente foram utilizadas cultivares experimentais que possuíam características contrastantes quanto à sua eficiência na produção, quando plantadas em solo com baixo teor de nitrogênio (IPA 1011 e IS 5322-C). Em uma segunda etapa, foi determinada a influência do teor de nitrogênio na comunidade de diazotróficos presentes na rizosfera de cultivares comerciais de sorgo (BRS 308 e BRS 310), amplamente cultivadas no Brasil.

Primeira etapa

Análise da diversidade e identificação dos principais grupos de bactérias diazotróficas presentes na rizosfera de duas cultivares experimentais de sorgo plantadas em solo com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, utilizando-se a estratégia de clonagem e seqüenciamento do gene *nifH*.

- ✓ Extração de DNA do solo de rizosfera das duas cultivares experimentais de sorgo (IPA 1011 e IS 5322-C) com ambos os tratamentos.
- ✓ Amplificação do DNA das amostras de rizosfera por PCR, com base em iniciadores universais para o gene *nifH*.
- ✓ Clonagem dos produtos de PCR para construção de bibliotecas do gene *nifH*.
- ✓ Seqüenciamento de clones contendo o fragmento do gene *nifH*.
- ✓ Identificação dos principais grupos taxonômicos que possam estar contribuindo com o fornecimento de nitrogênio na rizosfera fazendo uma comparação das comunidades.

Segunda etapa

Análise da diversidade molecular e quantificação do gene *nifH* de bactérias presentes na rizosfera de duas cultivares comerciais de sorgo plantadas em solo com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, através das técnicas de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e PCR em tempo real

- ✓ Extração de DNA das amostras de solo de rizosfera das duas cultivares comerciais de sorgo (BRS 308 e BRS 310) com ambos os tratamentos.
- ✓ Amplificação por PCR fazendo uso de iniciadores universais baseados no gene *nifH*
- ✓ Análise destes fragmentos pela técnica de DGGE.

- ✓ Comparação dos perfis obtidos através da construção de uma matriz de presença e ausência de bandas.
- ✓ Excisão de bandas do gel de DGGE para seqüenciamento e identificação das mesmas.
- ✓ Amplificação por PCR em tempo real fazendo uso de iniciadores universais baseados no gene *nifH* para quantificação do número de cópias deste gene nas amostras analisadas.
- ✓ Comparação dos dados obtidos.

Terceira etapa

Desenvolvimento de iniciadores específicos para *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio com base no gene *nifH*

- ✓ Extração de DNA e amplificação do gene *nifH* de estirpes das espécies de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio
- ✓ Seqüenciamento dos genes *nifH* de um representante de cada uma das espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio.
- ✓ Alinhamento das seqüências de *nifH* de *Paenibacillus* com outras espécies bacterianas fixadoras de nitrogênio cujas seqüências tenham sido depositadas no GenBank.
- ✓ Busca no alinhamento por uma região gênero-específica.
- ✓ Desenho de um par de iniciadores baseado na seqüência *nifH* consenso das espécies de *Paenibacillus*.
- ✓ Confirmação da especificidade do iniciador.

Quarta etapa

Análise da diversidade da população de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio presentes na rizosfera de sorgo plantado em solo com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, utilizando-se a estratégia de clonagem e seqüenciamento do gene *nifH*.

- ✓ Extração de DNA das amostras de solo de rizosfera de sorgo
- ✓ Amplificação PCR fazendo uso de iniciadores específicos para o gênero *Paenibacillus* baseados no gene *nifH* (desenvolvidos neste trabalho) para validação dos mesmos.
- ✓ Clonagem dos produtos de PCR para construção de bibliotecas do gene *nifH*.
- ✓ Seqüenciamento de clones contendo o fragmento do gene *nifH*.
- ✓ Identificação dos clones obtidos.

5 – MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 – Análise da diversidade e identificação dos principais grupos de bactérias diazotróficas presentes na rizosfera de duas cultivares experimentais de sorgo plantadas em solo com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, utilizando-se a estratégia de clonagem e seqüenciamento do gene *nifH*.

5.1.1 – Cultivares de sorgo e amostragem de solo

No presente estudo, foram utilizadas duas cultivares de sorgo: cultivar IPA 1011 (considerada eficiente sob estresse de nitrogênio, capaz de atingir seu máximo de crescimento em baixas concentrações de nitrogênio no solo e com produtividade de 5.490 kg/ ha) e IS 5322-C (considerada ineficiente sob estresse de nitrogênio, pois apresenta crescimento diminuído e amarelamento das folhas, sintomas característicos da falta deste nutriente, e com produtividade de 930 kg/ha). Os ensaios de campo foram conduzidos em campos experimentais da EMBRAPA – CNPMS, Centro Nacional de Pesquisas de Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, em um solo classificado como latossolo vermelho distrófico, textura argilosa (6% de areia grossa, 4% de areia fina, 12% silte e 78% argila) fase cerrado. Análises físico-químicas do solo o caracterizaram com baixo teor de matéria orgânica (3,27 dag/dm³), e pH 6,2. A área de plantio foi dividida em duas parcelas de 5m de comprimento (com espaços de 0,8 m entre as parcelas e 0,2 m entre as plantas), onde cada uma recebeu uma quantidade de nitrogênio. As parcelas foram então divididas em subparcelas que continham as diferentes cultivares. Uma parcela recebeu 12 kg/ha (N1) de nitrogênio, enquanto a outra recebeu 120 kg/ha (N2) de nitrogênio. A figura 1 está representando o esquema de plantio feito no campo.

A amostragem foi feita após a floração, aproximadamente 90 dias após o plantio, retirando-se o sistema radicular inteiro de cada planta. As raízes foram sacudidas e somente o solo bem aderido às raízes foi considerado solo rizosférico e aproveitado para os experimentos. Foi feita uma amostragem composta, ou seja, cada amostra final continha solo de rizosfera proveniente de 5 exemplares da mesma cultivar. As amostras de solo foram armazenadas em sacos plásticos estéreis, levadas do campo para o laboratório e congeladas.

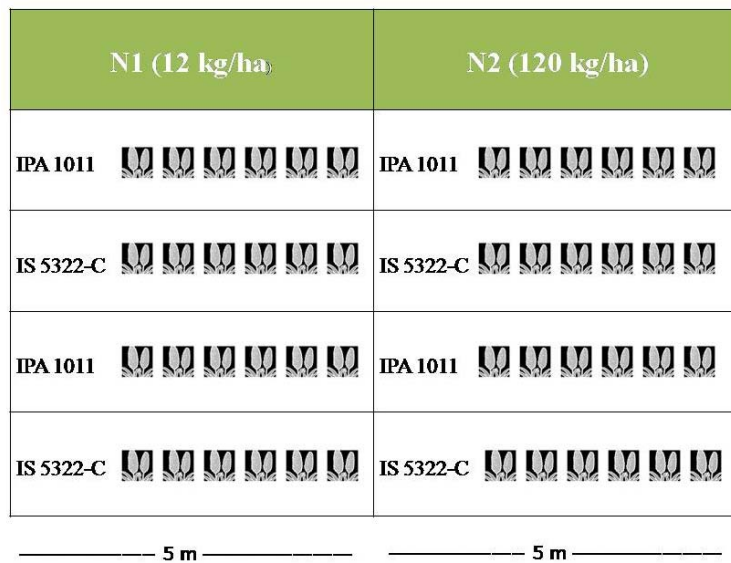


Figura 1: Esquema do plantio no campo.

5.1.2 – Extração de DNA das amostras de solo

A extração de DNA das amostras de solo rizosférico e foi realizada pelo método de lise direta a partir de 0,5g de solo em duplicata, seguindo-se o protocolo do fabricante do kit comercial “Fast DNA Spin Kit (for soil)” Bio Systems, Q Bio gene, USA. Após a extração, uma alíquota de 5 µl de cada DNA extraído foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TEB 1X a 80 Volts por 2 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados por 15 minutos com brometo de etídio (EtBr) na concentração de 2 µg/ml. O DNA foi observado no gel utilizando-se um transluminador com luz ultravioleta, para verificar a integridade do DNA.

5.1.3 – Amplificação por PCR do gene *nifH*

Para este experimento, foi feita uma reação de PCR utilizando-se os iniciadores PolF e PolR.

Iniciador	Sequencia (5' – 3')	Referência
PolF	TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC	Poly, Monrozier & Bally (2001b)
PolR	ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA	Poly, Monrozier & Bally (2001b)

Y= T/C; S= G/C; R= A/G; B= G/C/T

Cada reação foi realizada em um volume de 50 µl em tubo contendo 5µl do tampão de PCR 10X (Promega, USA), 2,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada um dos quatro dNTPs, 0,5 µM de cada iniciador, 2 U de *Taq* DNA polimerase (Promega), 1µl de DNA (50 a 100 ng), e água bidestilada estéril q.s.p. 50 µl. O ciclo aplicado foi: 1x (3 min 94°C); 30 x (1 min 94°C; 1 min 55°C; 2min 72°C); 1x (10 min 72°C); 4°C.

Os fragmentos obtidos nas reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,4% por 2 horas a 80 Volts, em tampão TEB 1X. Cinco microlitros do produto de PCR foram misturados com o corante para eletroforese na proporção do volume 2:1 (DNA:corante), e em seguida aplicados no gel. Foram incluídos nos géis padrões de tamanho de DNA linear (1 Kb DNA Ladder, Promega), bem como controles negativos (reação sem DNA). Após a eletroforese, os géis foram corados por 15 minutos com brometo de etídio (EtBr) na concentração de 2 µg/ml. O DNA foi observado no gel utilizando-se um transluminador com luz ultravioleta. O aparecimento de apenas uma banda do tamanho esperado no gel de agarose foi considerado uma reação bem sucedida.

5.1.4 – Clonagem e seqüenciamento do gene *nifH*

Os fragmentos obtidos pela amplificação por PCR foram purificados com a utilização do kit de purificação comercial “WizardTM Rapid PCR Purification System” (Promega). Posteriormente, 3 µl dos produtos purificados foram então ligados ao vetor pGEM-T easy, a 4°C durante uma noite, segundo as recomendações do fabricante do kit “pGEM-T easy Vector Systems” (Promega). Em seguida, células competentes de *Escherichia coli* JM109 foram transformadas através de eletroporação (choque de 1,8 Kvolts, 200 Ω, 25 µF), utilizando-se 70 µl de células competentes e 3 µl da ligação em uma cubeta com espaçamento de 0,1 cm. Após a transformação as células foram mantidas em meio LB por 1,5 horas a 37°C sob agitação. Uma quantidade de 100 µl de cada cultura foi semeada em placas contendo meio LB com ampicilina (100 µg/ml), nas quais foram previamente espalhados sobre a superfície 100 µl da solução de IPTG e 20 µl da solução de X-gal. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, 100 colônias brancas (contendo os insertos de *nifH*) de cada amostra foram

escolhidas randomicamente. Para a confirmação da presença do inserto nos clones, foi feita uma reação de PCR diretamente da colônia, utilizando-se os iniciadores M13f (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') e M13r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). Após a confirmação, os DNAs plasmidiais dos transformantes foram extraídos com auxílio do kit comercial “Wizard Plus SV miniprep DNA purification system” (Promega). Os DNAs plasmidiais purificados foram então submetidos à reação de PCR para seqüenciamento, utilizando-se os iniciadores M13f e M13r e seqüenciados em um seqüenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, USA).

5.1.5 – Análise das seqüências

Primeiramente foi feita uma análise de todas as seqüências obtidas (*forward* e *reverse*) utilizando-se o programa BioEdit 7.0 (HALL, 1999), e as seqüências que continham bases ambíguas não foram consideradas para as análises seguintes. Em seguida, as bases correspondentes à seqüência do vetor de clonagem foram detectadas utilizando-se a ferramenta VecScreen, encontrada no site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) e retiradas manualmente usando-se o programa BioEdit. As seqüências selecionadas para este estudo foram então comparadas com as presentes no banco de dados GenBank utilizando-se a ferramenta BLAST-N (*Basic Local Alignment Search Tool*) - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (ALTSUL *et al.*, 1990) para identificação das seqüências de *nifH* mais próximas. Para confirmar que as seqüências obtidas codificavam a proteína NifH, foi utilizada a ferramenta BLAST-X para traduzir as seqüências e compará-las como as seqüências de proteínas no banco de dados do NCBI. Após a identificação das seqüências foi calculado o índice de cobertura (C) das bibliotecas como descrito por Chelius & Triplett (2001), onde $C = 1 - n_1/N$, onde 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 do Excel foi utilizada para o cálculo

do índice de diversidade Shannon-Wiener $H' = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$ (MARGELEF, 1958) e da equitabilidade (*Evenness*), $E = H' / \ln S$ (PIELOU, 1969), onde S é o número de espécies observadas e p_i é número de clones de uma dada espécie dividida pelo número total de organismos observados. Os dados obtidos a partir da classificação das seqüências também foram utilizados para análise de componente principal (PCA) utilizando-se o programa STATISTICA 6.0. As seqüências obtidas foram depositadas no banco de dados GenBank (NCBI) com os número de acesso: EU047946 a EU048188.

5.2 – Análise da diversidade molecular e quantificação do gene *nifH* de bactérias presentes na rizosfera de duas cultivares comerciais de sorgo plantadas em solo com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, utilizando-se as técnicas de PCR-DGGE e PCR em tempo real (*Real Time PCR*).

5.2.1 – Cultivares de sorgo e amostragem de solo

Duas cultivares comerciais de sorgo bastante difundidas no Brasil foram utilizadas: BRS 308 e BRS 310, ambos com rendimento médio de sementes de 4000 kg/ha. Os ensaios de campo foram conduzidos em campos experimentais da EMBRAPA – CNPMS, Centro Nacional de Pesquisas de Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, no mesmo tipo de solo e da mesma forma como descrito no item 5.1.1. Além de amostras de solos rizosférico, amostras de solo não rizosféricos também foram tratadas com baixos e altos níveis de adubação nitrogenada e utilizadas neste estudo. A figura 2 está representando o esquema dos plantios realizados.

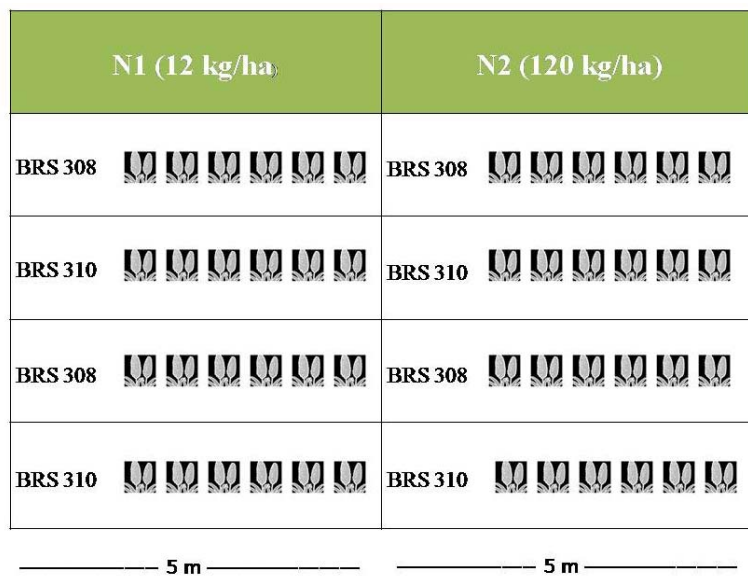


Figura 2: Esquema do plantio no campo.

5.2.2 – Extração de DNA das amostras de solo

A extração de DNA das amostras de solo rizosférico e não rizosférico foram realizadas por lise direta a partir de 0,5g de solo em triplicata, segundo a metodologia descrita por Griffiths

et al. (2000). Após a extração, uma alíquota de 5 µl de cada DNA extraído foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose 0,8% conforme descrito no item 5.1.2 para verificar a integridade do DNA.

5.2.3 – Amplificação por PCR do gene *nifH* para análise de DGGE

Para este experimento, foi feita uma reação de *nested* PCR utilizando-se primeiramente os iniciadores FGPH19 e PolR e, em uma segunda reação, os iniciadores AQER e PolF-GC, conforme descrito por Diallo *et al.* (2004).

Iniciador	Seqüência (5' – 3')	Referência
FGPH19	TAC GGC AAR GGT GGN ATH G	Simonet <i>et al.</i> (1991)
PolR	ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA	Poly, Monrozier & Bally (2001b)
AQER	GAC GAT GTA GAT YTC CTG	Poly, Monrozier & Bally (2001b)
PolF-GC	TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC	Poly, Monrozier & Bally (2001b)

R = A/G; N = A/G/C/T; H = T/C/A; Y = C/T; S = G/C.

Grampo de GC = CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCC.

Cada reação foi realizada em um volume de 30 µl em tubo contendo 5 µl do tampão de PCR 10X (Promega), 2,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada um dos quatro dNTPs, 0,5 µmol de cada iniciador, 2 U de *Taq* DNA polimerase (Promega), 1 µl de DNA (50 a 100 ng) e água bidestilada estéril q.s.p. 50 µl. Para a segunda reação, 1 µl do produto da primeira reação foi utilizado como molde. O ciclo aplicado foi: 1x (3 min 94°C); 30 x (1 min 94°C; 1 min 55°C; 2 min 72°C); 1x (10 min 72°C); 4°C. A segunda reação foi realizada nas mesmas condições, porém alterando a temperatura de anelamento para 50°C. Os fragmentos obtidos nas reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, corados e visualizados conforme descrito no item 5.1.3.

5.2.4 – Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

Os géis de gradiente desnaturante foram realizados no sistema “The Dcode Universal Mutation Detection System” (BioRad Laboratories, UK). Aliquotas dos produtos de PCR (10 a 15 µl) foram misturadas com 5 µl do corante de corrida. Esta mistura foi então aplicada no gel

de poliacrilamida a 8% (peso/vol) em tampão TAE 1X contendo um gradiente desnaturante linear (concentração do gradiente de 20-70%). Os gradientes foram formados com 8% de solução estoque de acrilamida e com as soluções a 0% e 100% de agentes desnaturantes. Os géis foram então submetidos à eletroforese a 200 Volts durante 4 hs a 60°C. Após a eletroforese, os géis foram corados com SYBR Green I (Molecular Probes, USA) durante 30 min e observados sob luz ultravioleta com auxílio de um transluminador. Os géis foram em seguida digitalizados usando o sistema de imagens Bio-Rad *Fluor MultiImager* (BioRad).

5.2.5 – Análise e comparação dos perfis de DGGE

Os géis foram então analisados utilizando-se o pacote de programas BIONUMERICS 2.5 (Applied Maths, Belgium) em um sistema semi-automatizado. Uma mistura de produtos de PCR do gene que codifica o 16S rRNA de 10 clones de amostras de solo foi adicionada a 3 canaletas em cada gel e utilizada como marcador para comparar o padrão de migração das bandas entre os diferentes géis. Foram construídas matrizes indicando a presença ou a ausência de bandas nos perfis das comunidades bacterianas de diazotróficos. A seguir essas matrizes foram submetidas a uma análise discriminante (*Partial Least Squares – Discriminant Analysis*, PLS-DA), que encontra um modelo linear com base em dados da matriz gerada e em dados fornecidos *a priori*. Neste caso, as únicas informações dadas *a priori* desta análise foram as relacionadas às réplicas do experimento, não sendo fornecida nenhuma informação sobre a expectativa dos agrupamentos das amostras.

5.2.6 – Excisão de bandas do DGGE e seqüenciamento

As bandas selecionadas foram cortadas do gel de DGGE com o auxílio de uma ponteira de micropipeta e eluídas em 50µl de água. O DNA foi incubado a 4°C por uma noite. Um microlitro do sobrenadante foi utilizado como DNA molde em uma reação de PCR utilizando-se os iniciadores PolF (sem o grampo de GC) e AQER, como descrito anteriormente. Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o kit de purificação “Wizard™ Rapid PCR Purification System” e 3 µl do produto purificado foram ligados ao vetor de clonagem pJET1.2 (Fermentas, USA) seguindo-se as recomendações dos respectivos fabricantes. Em seguida, células competentes de *Escherichia coli* JM109 foram transformadas através de eletroporação (choque de 1,8 Kvolts, 200 Ω, 25 µF), utilizando-se 70 µl de células competentes e 3 µl da ligação em uma cubeta com espaçamento de 0,1 cm. Após a transformação as células foram mantidas em

meio LB por 1,5 horas a 37°C sob agitação. Após a transformação, as células foram semeadas em placas contendo meio LB com ampicilina (100 µg/ml) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, 3 colônias de cada amostra foram escolhidas randomicamente. Para a confirmação da presença do inserto nos clones, foi feita uma reação de PCR diretamente da colônia, utilizando-se os iniciadores pJETf (5'-GCCTGAACACCATATCCATCC-3') e pJETr (5'-GCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATC-3'). Após a confirmação, os DNAs plasmidiais dos transformantes foram extraídos com auxílio do kit comercial “Wizard Plus SV miniprep DNA purification system” (Promega) e então submetidos à reação de PCR para seqüenciamento, em um seqüenciador automático ABI Prism 3100. As seqüências obtidas foram analisadas com o intuito de verificar a sua qualidade e para retirada de seqüências correspondentes ao vetor. Em seguida, estas foram comparadas com as presentes no banco de dados GenBank, como descrito anteriormente, para identificação das seqüências de *nifH* mais próximas. As seqüências obtidas foram depositadas no banco de dados GenBank (NCBI) com os número de acesso: EU750895 a EU750905, EU750907 e EU750908.

5.2.7 – Amplificação do gene *nifH* por PCR em tempo real (*Real Time PCR*)

As seqüências do gene *nifH* foram amplificadas com os iniciadores descritos por Poly, Monrozier & Bally (2001b). Foi feita uma reação de PCR em tempo real utilizando-se o equipamento LightCycler (Roche) e o fluoróforo SYBR Green I, para a quantificação da abundância total de genes *nifH*, conforme as instruções do fabricante. A reação de amplificação foi feita em um volume de 20 µl contendo 5 µl de DNA, 300 nM de cada iniciador, 9 µl de água para PCR e 4 µl de LightCycler Faststart^{plus} DNA Master SYBR Green I master mix (Roche). Todas as amplificações foram feitas em triplicata. Foram incluídas amostras de DNA padrão (a partir de um clone de *Vibrio diazotrophicus* contendo o gene *nifH*) que foram previamente utilizadas para construção da curva padrão, e água como controle negativo. O ciclo utilizado foi de 95°C por 10 min, seguido de 30-40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 55°C por 10 s, e extensão a 72°C por 15 s. Os sinais de fluorescência foram medidos a cada ciclo no final da etapa de desnaturação. Após a amplificação, foi obtida uma curva de desnaturação pelo aquecimento dos produtos a 95°C, resfriamento a 65°C e então aquecendo gradualmente até 95°C numa taxa de 0,2°C por segundo. A especificidade dos produtos gerados pela reação em tempo real foi confirmada pela curva de desnaturação e pela análise deste em gel de agarose. Uma amostra só foi considerada positiva quando mostrou uma amplificação log-linear (exponencial) na curva de fluorescência e também um pico específico (entre 85-92°C para o

gene *nifH*) na curva de desnaturação ou pela visualização de uma banda do tamanho esperado em gel de agarose a 1,5%.

5.2.8 – Construção de curvas padrão

Foram construídas curvas padrão utilizando-se triplicatas de diluições seriadas de amostras de DNA contendo uma quantidade conhecida de cópias do gene alvo (obtido de um clone contendo o gene *nifH*), conforme os procedimentos recomendadas pelo software LightCycler (Roche). A quantidade de genes alvo presente (moléculas/ μ l) foi determinada pela fórmula:

$$\frac{6.23 \times 10^{23} \text{ (moléculas/mol)} \times \text{concentração (g/}\mu\text{l)}}{MW \text{ (g/mol)}} = \text{quantidade de DNA (moléculas/}\mu\text{l)}$$

(onde MW = Número de pares de base x 660 Da)

As curvas padrão foram geradas plotando-se o valor de Ct contra o logaritmo da concentração de cada DNA padrão. Foi utilizado o equipamento LightCycler (Roche). O software do equipamento calcula automaticamente a regressão linear através dos pontos dos dados, permitindo a determinação a partir do valor de Ct (número de ciclos de PCR necessários para se alcançar o limiar) e, por interpolação, a abundância dos genes alvo em uma amostra ambiental desconhecida.

5.3 – Desenvolvimento de iniciadores específicos para *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio com base no gene *nifH* e análise da diversidade da população de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio utilizando-se a estratégia de clonagem e seqüenciamento do gene *nifH*.

5.3.1 – Cultivo e estocagem de estirpes

Todas as estirpes de *Paenibacillus* (Tabela 1) foram crescidas em caldo TBN a 32°C por 24 a 48 horas, e estocadas em tubos de penicilina lacrados, com meio sólido (TBN) contendo 1% de CaCO₃. As demais estirpes foram crescidas em meio TSB (Trypticase Soy Broth).

Tabela 1. Estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho:

Espécie	Estirpe	Referência/Origem
<i>P. polymyxa</i>	LMD 24.16 ^T	Universidade de Delft, Holanda
<i>P. peoriae</i>	HSCC 353 ^T	Montefusco <i>et al.</i> , 1993
<i>P. brasilensis</i>	172 ^T	von der Weid <i>et al.</i> , 2002
<i>P. macerans</i>	LMD 24.10 ^T	Universidade de Delft, Holanda
<i>P. graminis</i>	RSA 19 ^T	Berge <i>et al.</i> , 2002
<i>P. durus</i>	P3L5 ^T	Seldin, van Elsas & Penido, 1984
<i>P. odorifer</i>	TOD 45 ^T	Berge <i>et al.</i> , 2002
<i>P. borealis</i>	KK 19 ^T	Elo <i>et al.</i> , 2001
<i>P. sabinae</i>	DSM 17841 ^T	Ma <i>et al.</i> , 2007a
<i>P. zanthoxyli</i>	DSM 18202 ^T	Ma, Zahng & Chen, 2007b
<i>P. campinasensis</i>	KCTC 0364BP ^T	Yoon <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus licheniformis</i>	T6-3	LAB062, IMPPG – UFRJ
<i>Azospirillum brasilense</i>	Sp7	EMBRAPA-CNPMS
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Z67	EMBRAPA-CNPMS
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	PAL5	Prof. Orlando B. Martins, UFRJ

5.3.2 – Extração de DNA genômico de estirpes em cultura pura

O DNA genômico das estirpes de *Paenibacillus* e das demais bactérias utilizadas neste estudo foi extraído utilizando-se o método de fenol/clorofórmio como descrito por Seldin & Dubnau (1985). As preparações de DNA foram dosadas em espectrofotômetro a 260 nm através do aparelho Gene Quant (Pharmacia, USA).

5.3.3 – Amplificação por PCR do gene *nifH*

O gene *nifH* das estirpes de *Paenibacillus* utilizadas para este estudo foi amplificado, clonado e sequenciado conforme os itens 5.1.3 e 5.1.4.

5.3.4 – Desenho dos iniciadores

As seqüências de *nifH* provenientes de espécies de *Paenibacillus* obtidas neste trabalho ou anteriormente depositadas no GenBank foram reunidas em um arquivo FASTA. A este

arquivo foram adicionadas seqüências oriundas de bactérias fixadoras de nitrogênio pertencentes a outros gêneros, cujas seqüências estavam depositados no GenBank. Todas as seqüências foram então alinhadas com auxílio do software ClustalX 1.83 (THOMPSON *et al.*, 1997). Após o alinhamento das seqüências, foi feita uma busca por uma região ou seqüência encontrada apenas nas espécies de *Paenibacillus* e não nos outros organismos analisados. Foram então desenhados dois iniciadores com base na seqüência consenso dessa região encontrada nos *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio que receberam a denominação de nifHPAENf (5'-TKA TYC TGA ACA CGA AAG-3') e nifHPAENr (5'-CTC RCG GAT TGG CAT TGC G-3') correspondente às posições 143 e 408 respectivamente, em referência a seqüência do gene *nifH* de *Azotobacter vinelandii* (M20568). Estes iniciadores foram submetidos a uma busca por seqüências homólogas no GenBank, através do programa BLAST-N (www.ncbi.nih.nlm.gov/BLAST) e somente seqüências de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio foram encontradas nos primeiros *hits*.

5.3.5 – Confirmação da especificidade e validação dos iniciadores nifHPAENf / nifHPAENr

As espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio, assim como espécies de outros gêneros bacterianos foram testadas para se confirmar a especificidade dos iniciadores nifHPAEN. Para isso, os DNAs de 10 espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio - *P. polymyxa* (LMD 24.16), *P. brasilensis* (172), *P. macerans* (LMD 24.10), *P. durus* (P3L5), *P. graminis* (RSA 19), *P. borealis* (KK 19), *P. odorifer* (TOD45) e *P. peoriae* (HSCC 353), *P. sabinae* (DSM 17841) e *P. zanthoxyli* (DSM 18202) - de 3 outras espécies fixadoras de nitrogênio - *Azospirillum brasilense* (Sp7), *Herbaspirillum seropedicae* (Z67) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) - das espécies não fixadoras de nitrogênio *Bacillus licheniformis* (T6-3) e *P. campinasensis* (KCTC 0364BP) foram utilizados na reação de PCR. As condições de amplificação por PCR para culturas puras foram as mesmas descritas no item 5.1.3 (POLY, MONROZIER & BALLY, 2001b), alterando-se apenas a temperatura de anelamento para 50°C e mantendo as demais condições.

Os iniciadores também foram testados frente a amostras de DNA de solo, utilizando-se amostras de DNA de solo de rizosfera de sorgo. Neste caso as amplificações foram realizadas através de um sistema de *nested* PCR, que consistiu de uma primeira amplificação com os iniciadores PolF e PolR descritos por Poly, Monrozier & Bally (2001b) conforme descrito no item 5.1.3. Em seguida, 1 µl desta primeira reação foi utilizado como molde para a segunda reação com os iniciadores nifHPAENf e nifHPAENr. Foram utilizados controles negativos (sem

DNA) para todas as reações de PCR, e após a reação de PCR os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, corados e visualizados conforme descrito no item 5.1.3, para confirmação do tamanho do produto (280pb).

5.3.6 – Clonagem e seqüenciamento dos produtos de PCR com os iniciadores nifHPAENf e nifHPAENr e análise das seqüências obtidas

Após a confirmação do tamanho do produto esperado, os produtos de PCR gerados com o novo par de iniciadores a partir de amostras de DNA de rizosfera foram clonados e seqüenciados da mesma forma como descrito no item 5.1.4. As seqüências obtidas foram analisadas e identificadas conforme descrito no item 5.1.5. Em seguida as seqüências foram alinhadas e agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs), que são definidas com base na distância genética entre as seqüências. Embora não exista um valor de *cut-off* determinado para definir uma UTO com base em seqüências de genes funcionais, neste trabalho foi escolhido 95% de similaridade para fins de comparação entre as seqüências de genes *nifH* das bibliotecas. O alinhamento foi feito utilizando-se o programa ClustalX 1.83 (THOMPSON *et al.*, 1997), e foi construída uma matriz de distância com base neste alinhamento através do programa dnadist contido no pacote de programas PHYLIP 3.6 (FELSENSTEIN, 1989). Em seguida foi utilizado o programa DOTUR (SCHLOSS & HANDELSMAN, 2005), onde foram definidas as unidades taxonômicas operacionais (UTOs) (com 5% de dissimilaridade), e calculadas as curvas de rarefação com base na frequência com que cada UTO é encontrada. Neste mesmo programa também foram calculados o índice de diversidade de Shannon-Weaver e a estimativa da riqueza de Chao1.

5.4 – Meios de cultura, soluções e tampões

5.4.1 – Meios de cultura

Sempre que necessário, os meios de cultura foram solidificados pela adição de ágar na concentração de 1,2%.

TSB (*Trypticase Soy Broth*, Dífco)

TSB 6 g

NaOH 2N	0,4 ml
Água destilada q.s.p.	200 ml
pH 7,3	

LB (*Luria-Bertani Broth*, SCHLEIF & WENSINK, 1981)

Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	5 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml
pH 7,2	

TBN (SELDIN & PENIDO, 1986)

Glucose	10 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
Extrato de levedura	1 g
Tiamina-HCl	0,001 g
Biotina	0,001 g
Solução de micronutrientes	1 ml
NaOH 2N	2 ml
Azul de bromotimol	0,005 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml
pH 7,4	

OBS: Após a autoclavação a 121° C por 15 min foi adicionado ao meio uma solução de K₂HPO₄ 8% na proporção de 1%.

5.4.2 – Tampões

Tampão TEB

Tris “tris (hidroximetil) amino metano”	89 mM
EDTA “etilenodiaminotetraacetato”	2,5 mM
H ₃ BO ₃	89 mM

Tampão TAE 50X

Trisma Base (Sigma)	60,5 g
Ácido acético glacial	14,28 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	25 ml
Água bidestilada estéril q.s.p.	250 ml

OBS: Após o preparo, as soluções foram autoclavadas por 20 minutos a 121°C e estocadas à temperatura ambiente.

5.4.3 – Soluções

Solução corante de corrida para eletroforese de DNA em gel de agarose

Glicerol	50 %
EDTA	20 mM, pH 7,5
Azul de bromofenol	0,05 %
Xileno cianol	0,05 %

Solução corante Dcode para visualização do gradiente no DGGE

Azul de bromofenol	0,05 g
Xileno cianol	0,05 g
Solução tampão TAE 1x	10 ml

Solução corante de corrida para gel de DGGE

Solução de azul de bomofenol (2%)	0,25 ml
Solução de xileno cianol (2%)	0,25 ml
Glicerol	7 ml
Água bidestilada estéril q.s.p.	10 ml

Solução de acrilamida 40%

Acrilamida	38,93 g
Bis-acrilamida	1,07 g
Água bidestilada q.s.p.	100 ml

OBS: Após o preparo esta solução foi filtrada em membrana Millipore com poros de 0,45 µm e estocada a 4°C.

Solução (0%) sem agentes desnaturantes (gel 8% de acrilamida)

Solução de acrilamida 40%	20 ml
Tampão TAE 50X	2 ml
Água bidestilada q.s.p.	100 ml

OBS: Após o preparo, esta solução foi filtrada em membrana Millipore com poros de 0,45 µm e estocada a 4°C no escuro (frasco âmbar ou coberto por papel alumínio).

Solução 100% de desnaturantes (gel 8% de acrilamida)

Solução de acrilamida 40%	20 ml
Tampão TAE 50X	2 ml
Formamida deionizada	40 ml
Uréia	42 g
Água bidestilada q.s.p.	100 ml

OBS: Após o preparo, esta solução foi filtrada em membrana Millipore com poros de 0,45 µm e estocada a 4°C no escuro (frasco âmbar ou coberto por papel alumínio).

Solução persulfato de amônio a 10% (APS)

Persulfato de amônio	0,1 g
Água destilada	1 ml

OBS: Após o preparo, esta solução foi estocada a -20°C.

Solução de micronutrientes (JURGENSEN & DAVEY, 1971)

H ₃ BO ₃	2,86 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,22 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,81 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,08 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Solução de IPTG

IPTG	1,2 g
Água destilada q.s.p.	50 ml

OBS: Após o preparo, esta solução foi filtrada em membrana Millipore com poros de 0,45 µm

6 – RESULTADOS

6.1 – Análise da diversidade e identificação dos principais grupos de bactérias diazotróficas presentes na rizosfera de duas cultivares experimentais de sorgo plantadas em solo com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, utilizando-se a estratégia de clonagem e posterior seqüenciamento do gene *nifH*.

A partir do DNA extraído em duplicata das amostras de solo de rizosfera das cultivares de sorgo IPA 1011 (eficiente) e IS 5322-C (ineficiente) plantadas com baixo (12 kg/ha = - N) e alto (120 kg/ha = + N) teor de nitrogênio e subsequente amplificação por PCR destas quatro amostras, foram obtidos fragmentos de 360 pb correspondentes ao gene *nifH*. Os produtos de PCR de cada réplica de amostra foram misturados e clonados como uma amostra única. Foram construídas quatro bibliotecas (IPA 1011 -N, IPA 1011 +N, IS 5322-C -N e IS 5322-C +N) com 96 clones cada uma, totalizando 384 clones seqüenciados. Entretanto, somente 245 apresentaram seqüências de qualidade e foram considerados para análises posteriores (56, 59, 69 e 61 clones, respectivamente). As seqüências selecionadas para análise foram então comparadas com as existentes no banco de dados GenBank, utilizando-se a ferramenta BLAST-N. Todos as seqüências foram identificadas como seqüências do gene *nifH* (Tabelas 2 a 5).

A distribuição filogenética dos clones com base no gene *nifH* foi bastante homogênea entre as quatro amostras analisadas. As seqüências agruparam-se com vários grupos taxonômicos incluindo: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Gamaproteobacteria* (Tabelas 2 a 5). No entanto, quando foi considerado apenas o primeiro *hit* no BLAST-N, a maior parte dos clones (57%) foi relacionada com seqüências de bactérias não cultivadas. O restante dos clones se agrupou a seqüências de bactérias cultiváveis distribuídas em 6 ordens: Rhizobiales (26%), Burkholderiales (12,2%), Bacillales (1,6%), Sphingomonadales (1,6%), Rhodospirillales (1,2%) e Enterobacteriales (menos de 1%) (Figura 3).

Como o número de clones relacionados a seqüências não cultivadas era muito grande, foi considerado também o primeiro *hit* do BLAST-N correspondente a uma seqüência proveniente de uma bactéria cultivada. As tabelas 2 a 5 mostram a distribuição dos clones nas quatro bibliotecas obtidas. Em todas as bibliotecas foram encontrados clones afiliados a *Azohydromonas* spp., *Ideonella* sp., *Rhizobium etli* e *Bradyrhizobium* sp., demonstrando uma alta abundância de *Alphaproteobacteria*, especialmente *Rhizobium etli* e *Bradyrhizobium* sp.

Analisando cada uma das quatro bibliotecas, foi possível determinar a influência da cultivar e/ou da quantidade de adubo nitrogenado aplicado nas populações que poderiam estar contribuindo para o fornecimento de nitrogênio na rizosfera destas cultivares de sorgo. Primeiramente, foi possível perceber que a biblioteca obtida a partir da cultivar eficiente IPA 1011 com baixo teor de nitrogênio (E – N) apresentou uma porcentagem maior de *Alphaproteobacteria* do que a biblioteca obtida da mesma cultivar com altos teores de nitrogênio (E + N) (Tabelas 2 e 3). Foram encontradas seqüências relacionadas a *Delftia tsuruhatensis* na rizosfera das duas cultivares plantadas com alto teor de nitrogênio (Tabelas 3 e 5), enquanto clones relacionados a *Methylocystis* sp. foram detectados somente em plantas cultivadas com baixos níveis de nitrogênio (Tabelas 2 e 4). As bibliotecas obtidas das amostras de cultivares plantadas com baixo teor de nitrogênio apresentaram 30% mais clones afiliados a *Bradyrhizobium* sp. do que as obtidas de amostras com alto teor de fertilizante. Além disso, seqüências afiliadas a *Azospirillum* spp. e *Sinorhizobium* sp. só puderam ser detectadas nas bibliotecas obtidas a partir de I – N e E + N, respectivamente, enquanto que seqüências de *Pelomonas saccharophila* e *Xanthobacter flavus* foram detectadas em todas as bibliotecas com exceção da E + N (Tabelas 2 a 5). Por fim, clones relacionados à espécie *Paenibacillus durus* somente puderam ser encontrados nas bibliotecas da cultivar ineficiente plantada tanto com altos como com baixos teores de fertilizante nitrogênio (Tabelas 4 e 5).

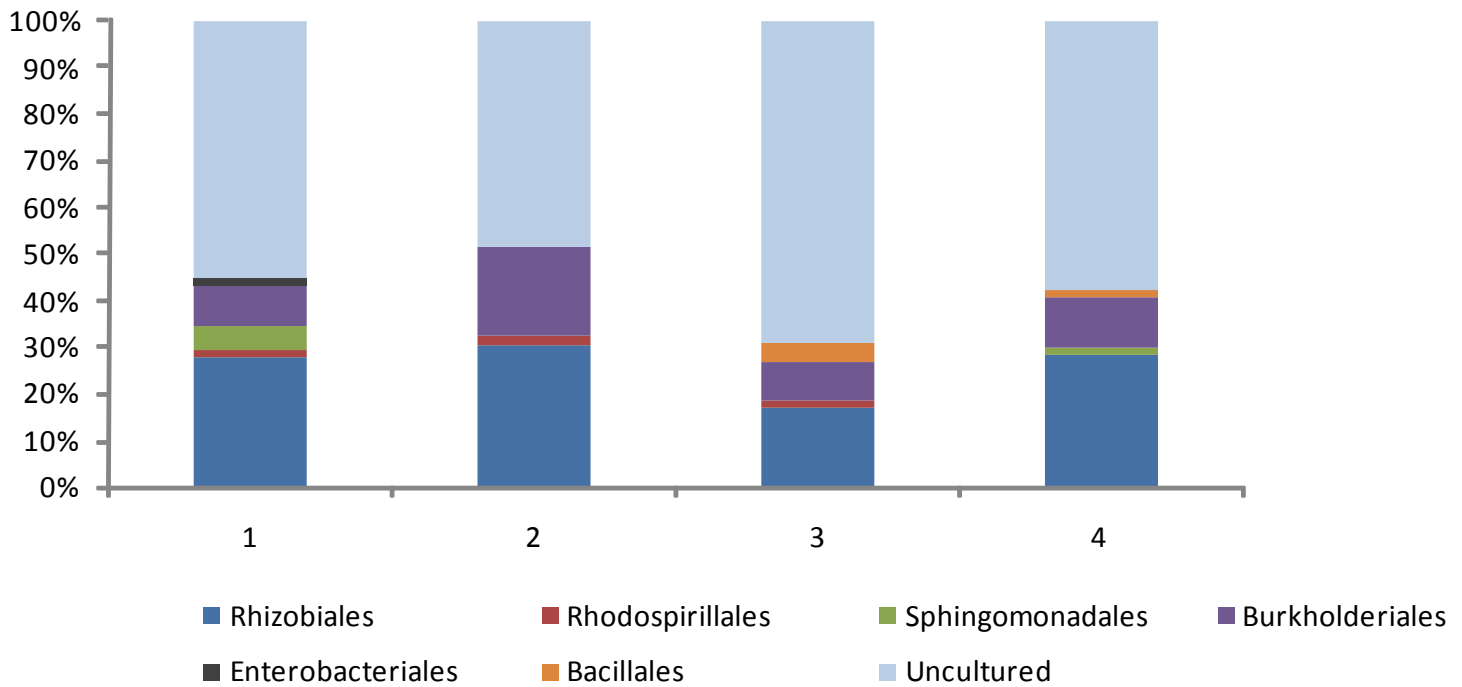


Figura 3. Distribuição das porcentagens de famílias dos clones do gene *nifH* obtidos de cada uma das quatro bibliotecas com base na identificação feita pelo BLAST-N. 1 = cultivar eficiente IPA 1011 com baixo teor de nitrogênio (E – N) ; 2 = cultivar eficiente IPA 1011 com alto teor de nitrogênio (E + N); 3 = cultivar ineficiente IS 5322-C com baixo teor de nitrogênio (I – N); 4 = cultivar ineficiente IS 5322-C com alto teor de nitrogênio (I + N).

Tabela 2. Identificação das seqüências do gene *nifH* obtidas da rizosfera do cultivar IPA 1011 (eficiente) plantado com baixo teor de nitrogênio (E – N) feita pelo NCBI BlastN (primeiro *hit* e a seqüência mais próxima de uma bactéria cultivada)

Seqüências (56 clones)	Primeiro hit (> 98%)	Primeiro hit (cultivável)	% identidade	Posição filogenética ^a
IPA01, IPA37, IPA54, IPA57	<i>Azohydromonas australica</i> AB188121	<i>Azohydromonas australica</i>		β; Burkholderiales
IPA04, IPA07, IPA18	<i>Rhizobium etli</i> DQ058415	<i>Rhizobium etli</i>		α; Rhizobiales
IPA05, IPA06, IPA08, IPA13, IPA17, IPA21, IPA28, IPA39, IPA42, IPA44, IPA53, IPA56	<i>Bradyrhizobium sp.</i> AF484629	<i>Bradyrhizobium sp.</i>		α; Rhizobiales
IPA 22	<i>Azospirillum lipoferum</i> AY786992	<i>Azospirillum lipoferum</i>		α; Rhodospirillales
IPA 30	<i>Klebsiella pneumoniae</i> AF303353	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		γ; Enterobacteriales
IPA 31	<i>Azohydromonas lata</i> AB188122	<i>Azohydromonas lata</i>		β; Burkholderiales
IPA 41, IPA 47, IPA 49	<i>Sphingomonas azotifigens</i> AB217474	<i>Sphingomonas azotifigens</i>		α; Sphingomonadales
IPA 58	<i>Pelomonas saccharophila</i> AB188120	<i>Pelomonas saccharophila</i>		β; Burkholderiales
IPA02, IPA12, IPA14, IPA15, IPA16, IPA20, IPA33, IPA40, IPA50, IPA59	Uncultured bacterium clone AJ716331	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	94%	α; Rhizobiales
IPA03	Uncultured bacterium clone AJ716257	<i>Azospirillum brasilense</i>	90%	α; Rhodospirillales
IPA09, IPA24	Uncultured bacterium clone DQ304835	<i>Azohydromonas australica</i>	96%	β; Burkholderiales
IPA10	Uncultured bacterium clone AY768681	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	88%	α; Rhizobiales
IPA11, IPA19, IPA27	Uncultured bacterium clone AY787580	<i>Azohydromonas australica</i>	92%	β; Burkholderiales
IPA32	Uncultured bacterium clone DQ304827	<i>Pelomonas saccharophila</i>	93%	β; Burkholderiales
IPA34	Uncultured bacterium clone AY159603	<i>Rhizobium etli</i>	98%	α; Rhizobiales
IPA35	Uncultured bacterium clone AY787583	<i>Sphingomonas azotifigens</i>	90%	α; Sphingomonadales
IPA36	Uncultured bacterium clone AY787572	<i>Methylocystis sp.</i>	91%	α; Rhizobiales
IPA38, IPA51, IPA55	Uncultured bacterium clone AY196448	<i>Pelomonas saccharophila</i>	94%	β; Burkholderiales
IPA43	Uncultured bacterium clone AJ716230	<i>Xanthobacter flavus</i>	93%	α; Rhizobiales
IPA 45	Uncultured bacterium clone AJ716354	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	91%	α; Rhizobiales
IPA46	Uncultured bacterium clone AY787563	<i>Ideonella sp.</i>	95%	β; Burkholderiales
IPA25, IPA48, IPA52	Uncultured bacterium clone DQ481039	<i>Pelomonas saccharophila</i>	93%	β; Burkholderiales

^a α, Alphaproteobacteria; β, Betaproteobacteria; γ, Gammaproteobacteria

Tabela 3. Identificação das seqüências do gene *nifH* obtidas da rizosfera do cultivar IPA 1011 (eficiente) plantado com alto teor de nitrogênio (E + N) feita pelo NCBI BlastN (primeiro *hit* e a seqüência mais próxima de uma bactéria cultivada).

Seqüências (59 clones)	Primeiro hit (> 98%)	Primeiro hit (cultivável)	% identidade	Posição filogenética ^a
IPA60, IPA78, IPA80, IPA87, IPA88, IPA90, IPA92, IPA101, IPA106, IPA117	<i>Rhizobium etli</i> DQ058415	<i>Rhizobium etli</i>		α ; Rhizobiales
IPA63, IPA77, IPA82, IPA 93, IPA 103, IPA119	<i>Delftia tsuruhatensis</i> AY544164	<i>Delftia tsuruhatensis</i>		β ; Burkholderiales
IPA 64, IPA 86, IPA100	<i>Herbaspirillum</i> sp. AB196476	<i>Herbaspirillum</i> sp.		β ; Burkholderiales
IPA 67, IPA73, IPA89, IPA95, IPA98, IPA105	<i>Bradyrhizobium</i> sp. AF484644	<i>Bradyrhizobium</i> sp.		α ; Rhizobiales
IPA76	<i>Azospirillum lipoferum</i> AY786992	<i>Azospirillum lipoferum</i>		α ; Rhodospirillales
IPA81	<i>Sinorhizobium</i> sp. AJ505315	<i>Sinorhizobium</i> sp.		α ; Rhizobiales
IPA99	<i>Azohydromonas lata</i> AB188122	<i>Azohydromonas lata</i>		β ; Burkholderiales
IPA115	<i>Xanthobacter flavus</i> AY221812	<i>Xanthobacter flavus</i>		α ; Rhizobiales
IPA96, IPA116	<i>Azohydromonas australica</i> AB188121	<i>Azohydromonas australica</i>		β ; Burkholderiales
IPA61, IPA62, IPA66, IPA75, IPA83, IPA84, IPA113	Uncultured bacterium clone AJ716278	<i>Bradyrhizobium</i> sp	94%	α ; Rhizobiales
IPA65, IPA110	Uncultured bacterium clone AY159603	<i>Rhizobium etli</i>	98%	α ; Rhizobiales
IPA68, IPA69, IPA71, IPA91	Uncultured bacterium clone AJ716351	<i>Bradyrhizobium</i> sp	92%	α ; Rhizobiales
IPA70, IPA111	Uncultured bacterium clone DQ512904	<i>Sinorhizobium</i> sp.	94%	α ; Rhizobiales
IPA72, IPA74, IPA85, IPA107, IPA108	Uncultured bacterium clone AY787580	<i>Ideonella</i> sp.	95%	β ; Burkholderiales
IPA94	Uncultured bacterium clone AY196449	<i>Sinorhizobium fredii</i>	82%	α ; Rhizobiales
IPA97, IPA112	Uncultured bacterium clone AB208295	<i>Halorhodospira halophila</i>	86%	γ ; Chromatiales
IPA102, IPA104, IPA109	Uncultured bacterium clone AY196456	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	91%	β ; Burkholderiales
IPA114	Uncultured bacterium clone AY787555	<i>Azohydromonas australica</i>	94%	β ; Burkholderiales
IPA 118	Uncultured bacterium clone DQ425918	<i>Azospirillum lipoferum</i>	99%	α ; Rhodospirillales

^a α , Alphaproteobacteria; β , Betaproteobacteria; γ , Gammaproteobacteria

Tabela 4. Identificação das seqüências do gene *nifH* obtidas da rizosfera do cultivar IS 5322-C (ineficiente) plantado com baixo teor de nitrogênio (I – N) feita pelo NCBI BlastN (primeiro *hit* e a seqüência mais próxima de uma bactéria cultivada).

Seqüências (69 clones)	Primeiro hit (> 98%)	Primeiro hit (cultivável)	% identidade	Posição filogenética ^a
IS01, IS11, IS14, IS19, IS21, IS25, IS33, IS43, IS54	<i>Bradyrhizobium sp.</i> AF484629	<i>Bradyrhizobium sp.</i>		α ; Rhizobiales
IS03	<i>Rhizobium etli</i> DQ058415	<i>Rhizobium etli</i>		α ; Rhizobiales
IS12	<i>Rhizobium sp.</i> M16710	<i>Rhizobium sp.</i>		α ; Rhizobiales
IS32, IS36, IS62	<i>Azohydromonas australica</i> AB188121	<i>Azohydromonas australica</i>		β ; Burkholderiales
IS37, IS65, IS68	<i>Paenibacillus durus</i> AY221826	<i>Paenibacillus durus</i>		B; Paenibacillaceae
IS45	<i>Azospirillum lipoferum</i> AY786992	<i>Azospirillum lipoferum</i>		α ; Rhodospirillales
IS51, IS57	<i>Azohydromonas lata</i> AB188122	<i>Azohydromonas lata</i>		β ; Burkholderiales
IS64	<i>Xanthobacter flavus</i> AY221812	<i>Xanthobacter flavus</i>		α ; Rhizobiales
IS04, IS06, IS07, IS08, IS09, IS15, IS16, IS23, IS24, IS28, IS29, IS38, IS42, IS47, IS53, IS61, IS69	Uncultured bacterium clone AJ716351	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	94%	α ; Rhizobiales
IS05, IS18, IS22, IS27, IS39, IS46, IS55, IS63, IS70	Uncultured bacterium clone AY787580	<i>Ideonella sp.</i>	95%	β ; Burkholderiales
IS10, IS48	Uncultured bacterium clone DQ520554	<i>Azohydromonas australica</i>	95%	β ; Burkholderiales
IS13	Uncultured bacterium clone AJ716348	<i>Halorhodospira halophila</i>	89%	γ ; Chromatiales
IS17, IS67	Uncultured bacterium clone DQ304835	<i>Methylosinus trichosporium</i>	90%	α ; Rhizobiales
IS20, IS59	Uncultured bacterium clone AY196449	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	90%	β ; Burkholderiales
IS26	Uncultured bacterium clone DQ304827	<i>Pelomonas saccharophila</i>	95%	β ; Burkholderiales
IS30	Uncultured bacterium clone DQ098208	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	90%	α ; Rhizobiales
IS31, IS34, IS56	Uncultured bacterium clone DQ481039	<i>Sinorhizobium sp.</i>	91%	α ; Rhizobiales
IS35, IS40, IS41	Uncultured bacterium clone AY768681	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	90%	α ; Rhizobiales

IS44	Uncultured bacterium clone AJ716396	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	91%	α ; Rhizobiales
IS49, IS52	Uncultured bacterium clone AY196450	<i>Pelomonas saccharophila</i>	91%	β ; Burkholderiales
IS50, IS58, IS60	Uncultured bacterium clone AF389760	<i>Azospirillum lipoferum</i>	92%	α ; Rhodospirillales
IS66	Uncultured bacterium clone AY787548	<i>Methylocystis sp</i>	89%	α ; Rhizobiales

^a α , *Alphaproteobacteria*; β , *Betaproteobacteria*; γ , *Gammaproteobacteria*; *B*, *Bacilli*

Tabela 5. Identificação das seqüências do gene *nifH* obtidas da rizosfera do cultivar IS 5322-C (ineficiente) plantado com baixo teor de nitrogênio (I + N) feita pelo NCBI BlastN (primeiro *hit* e a seqüência mais próxima de uma bactéria cultivada).

Seqüências (61 clones)	Primeiro hit (> 98%)	Primeiro hit (cultivável)	% identidade	Posição filogenética ^a
IS74	<i>Rhizobium etli</i> DQ058415	<i>Rhizobium etli</i>		α; Rhizobiales
IS75, IS93	<i>Azohydromonas lata</i> AB188122	<i>Azohydromonas lata</i>		β; Burkholderiales
IS77, IS103, IS109	<i>Xanthobacter flavus</i> AY221812	<i>Xanthobacter flavus</i>		α; Rhizobiales
IS78, IS132	<i>Pelomonas saccharophila</i> AB188120	<i>Pelomonas saccharophila</i>		β; Burkholderiales
IS79, IS80, IS84, IS85, IS86, IS88, IS89, IS101, IS104, IS105, IS111, IS114, IS118, IS120	<i>Bradyrhizobium sp.</i> AF484629	<i>Bradyrhizobium sp.</i>		α; Rhizobiales
IS92	<i>Delftia tsuruhatensis</i> AY544164	<i>Delftia tsuruhatensis</i>		β; Burkholderiales
IS100	<i>Sphingomonas azotifigens</i> AB217474	<i>Sphingomonas azotifigens</i>		α; Sphingomonadales
IS102, IS117	<i>Azohydromonas australica</i> AB188121	<i>Azohydromonas australica</i>		β; Burkholderiales
IS123	<i>Paenibacillus durus</i> AJ299453	<i>Paenibacillus durus</i>		B; Paenibacillaceae
IS71	Uncultured bacterium clone AJ716235	<i>Anabaena sp.</i>	90%	Cyanob; Nostocales
IS72, IS81, IS91, IS113, IS116, IS126, IS129, IS130	Uncultured bacterium clone AY787580	<i>Ideonella sp.</i>	95%	β.; Burkholderiales
IS73, IS76, IS94, IS96, IS106, IS108, IS119	Uncultured bacterium clone DQ520554	<i>Sinorhizobium sp.</i>	92%	α; Rhizobiales
IS83	Uncultured bacterium clone DQ304835	<i>Azohydromonas australica</i>	95%	β; Burkholderiales
IS87, IS90, IS97, IS115, IS124, IS125, IS127	Uncultured bacterium clone AY196456	<i>Pelomonas saccharophila</i>	94%	β; Burkholderiales
IS95, IS98, IS107, IS110, IS112, IS121	Uncultured bacterium clone AJ716393	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	93%	α; Rhizobiales
IS122	Uncultured bacterium clone DQ520557	<i>Azohydromonas australica</i>	97%	β; Burkholderiales
IS128	Uncultured bacterium clone AY787583	<i>Sphingomonas azotifigens</i>	92%	α; Sphingomonadales
IS130	Uncultured bacterium clone AY829702	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	98%	γ; Xanthomonadales
IS133	Uncultured bacterium clone AJ716360	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	89%	α; Rhizobiales

^a α, Alphaproteobacteria; β, Betaproteobacteria; γ, Gammaproteobacteria; B, Bacilli

Após a análise das seqüências de *nifH* obtidas, foram realizados testes estatísticos com base na distribuição destas seqüências obtidas para inferir índices de cobertura, diversidade e equitabilidade de cada biblioteca. Para verificar se o número de clones de cada biblioteca estava realmente refletindo a diversidade das amostras, foi calculado o índice de cobertura de acordo com Chelius & Triplett (2001). As quatro bibliotecas obtidas neste estudo cobriram de 91,8% (I + N) a 98,3% (E + N) da diversidade total (Tabela 6), considerando a identificação feita pelo BLAST-N (Tabelas 2 a 5). Também foi calculado o índice de diversidade Shannon-Wiener de cada biblioteca e este variou entre 1,73 e 2,09 correspondendo aos valores observados nas bibliotecas obtidas da cultivar eficiente plantada com baixo e alto teor de nitrogênio (E – N e E + N), respectivamente. O mesmo valor de 1,99 foi observado nas bibliotecas obtidas da cultivar ineficiente submetida aos dois tratamentos. Além disso, os valores de equitabilidade, que indicam a distribuição de indivíduos entre as espécies, foram menores nas bibliotecas obtidas a partir das amostras com baixo teor de nitrogênio (E –N e I –N). Nas amostras submetidas a altos níveis de nitrogênio (E+N e I+N), os valores foram de 0,87 e 0,8, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Análise estatística das bibliotecas de clones

Cultivares/nível de fertilização nitrogenada^a	Shannon-Wiener	Equitabilidade (<i>Evenness</i>)	Cobertura
E – N	1,73	0,75	92,9%
E + N	2,09	0,87	98,3%
I – N	1,99	0,75	94,2%
I + N	1,99	0,80	91,8%

^a E (cultivar IPA 1011) – N = cultivar eficiente plantado com baixo teor de nitrogênio (12 kg/ha), E + N = cultivar eficiente plantado com alto teor de nitrogênio (120 kg/ha), I (cultivar IS 5322-C) – N = cultivar ineficiente plantado com baixo teor de nitrogênio (12 kg/ha), I + N = cultivar ineficiente plantado com alto teor de nitrogênio (120 kg/ha).

Os dados das bibliotecas também foram submetidos a uma análise de componentes principais (PCA), na tentativa de avaliar o efeito das diferentes cultivares de sorgo e do teor de nitrogênio aplicado como adubo na comunidade diazotrófica presente nas rizosferas. Para

esta análise foi considerado o primeiro *hit* do BLAST-N correspondente a uma estirpe cultivável em cada biblioteca. Três fatores representaram 100% da variância (fator 1 = 39,1%, fator 2 = 34,4% e fator 3 = 26,5%) e na representação tridimensional da PCA (Figura 4) pode ser observado que as amostras da cultivar considerada eficiente (IPA 1011) se diferenciam das da cultivar ineficiente (IS 5322-C). Entretanto, foi o nível de nitrogênio aplicado que teve a maior influência na variância (Figura 4).

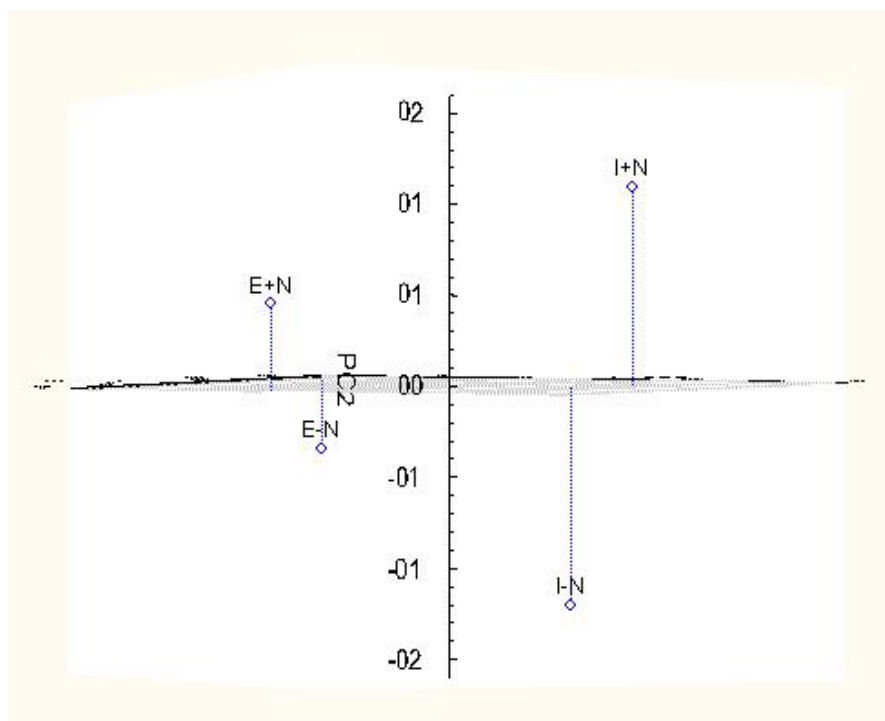


Figura 4. Gráfico da Análise de Componentes Principais (PCA) feita a partir das seqüências obtidas das quatro bibliotecas de clones. Somente foi considerado o primeiro *hit* no BLAST-N com uma bactéria cultivável. E (cultivar IPA 1011) – N = cultivar eficiente plantado com baixo teor de nitrogênio (12 kg/ha); E + N = cultivar eficiente plantado com alto teor de nitrogênio (120 kg/ha); I (cultivar IS 5322-C) – N = cultivar ineficiente plantado com baixo teor de nitrogênio (12 kg/ha); I + N = cultivar ineficiente plantado com alto teor de nitrogênio (120 kg/ha).

6.2 – Análise da diversidade molecular e quantificação do gene *nifH* de bactérias presentes na rizosfera de duas cultivares comerciais de sorgo plantadas em solo com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, utilizando-se as técnicas de PCR-DGGE e PCR em tempo real (*Real Time PCR*).

6.2.1 – Análise dos perfis de DGGE

O DNA extraído em triplicata das amostras de solo não rizosférico (NR) e da rizosfera das cultivares comerciais de sorgo BRS 308 e BRS 310 tratadas com baixo (12 kg/ha = N1) e alto (120 kg/ha = N2) teor de nitrogênio foi amplificado através de uma reação de *nested* PCR (FGPH19/ PolR e AQER/ PolF-GC), gerando fragmentos de 320 pb do gene *nifH*. Estes foram submetidos à eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) gerando perfis reprodutíveis (com apenas pequenas diferenças) entre as triplicatas das amostras de rizosfera de sorgo e de solo não rizosférico. Os perfis mostraram diferentes padrões de bandas entre as amostras analisadas (Figura 5) e um total de 17 bandas com diferentes posições foi utilizado para a análise discriminante (PLS-DA). Em geral, uma maior diversidade de fragmentos do gene *nifH* (bandas) foi encontrada no solo rizosférico da cultivar BRS 308 do que na cultivar BRS 310. Além disso, a comunidade diazotrófica de ambas as cultivares parece ser influenciada negativamente pela aplicação de altos teores de nitrogênio, já que a riqueza das bandas foi reduzida nestas amostras (Figura 5).

A figura 6 mostra a melhor configuração dos perfis de DGGE após a análise discriminante. As amostras de rizosfera e de solo puderam ser divididas em 3 grupos. Um grupo contendo as amostras da cultivar BRS 308 plantada com altos níveis de nitrogênio, outro contendo as amostras da cultivar BRS 308 plantada com baixos níveis de nitrogênio junto com as da cultivar BRS 310 plantada com ambos os níveis de nitrogênio, e um terceiro grupo contendo as amostras de solo não rizosférico com baixo e alto teor de nitrogênio. Estes resultados sugerem que o nível de nitrogênio aplicado exerce uma influência sobre a comunidade de fixadores de nitrogênio presentes na rizosfera da cultivar BRS 308, mas não sobre a da cultivar BRS 310 e do solo não rizosférico. Além disso, a comunidade de diazotróficos presentes na cultivar BRS 308 parece ser mais heterogênea do que a presente na cultivar BRS 310, indicando que a cultivar de sorgo pode influenciar na seleção de populações específicas com potencial para fixação de nitrogênio.

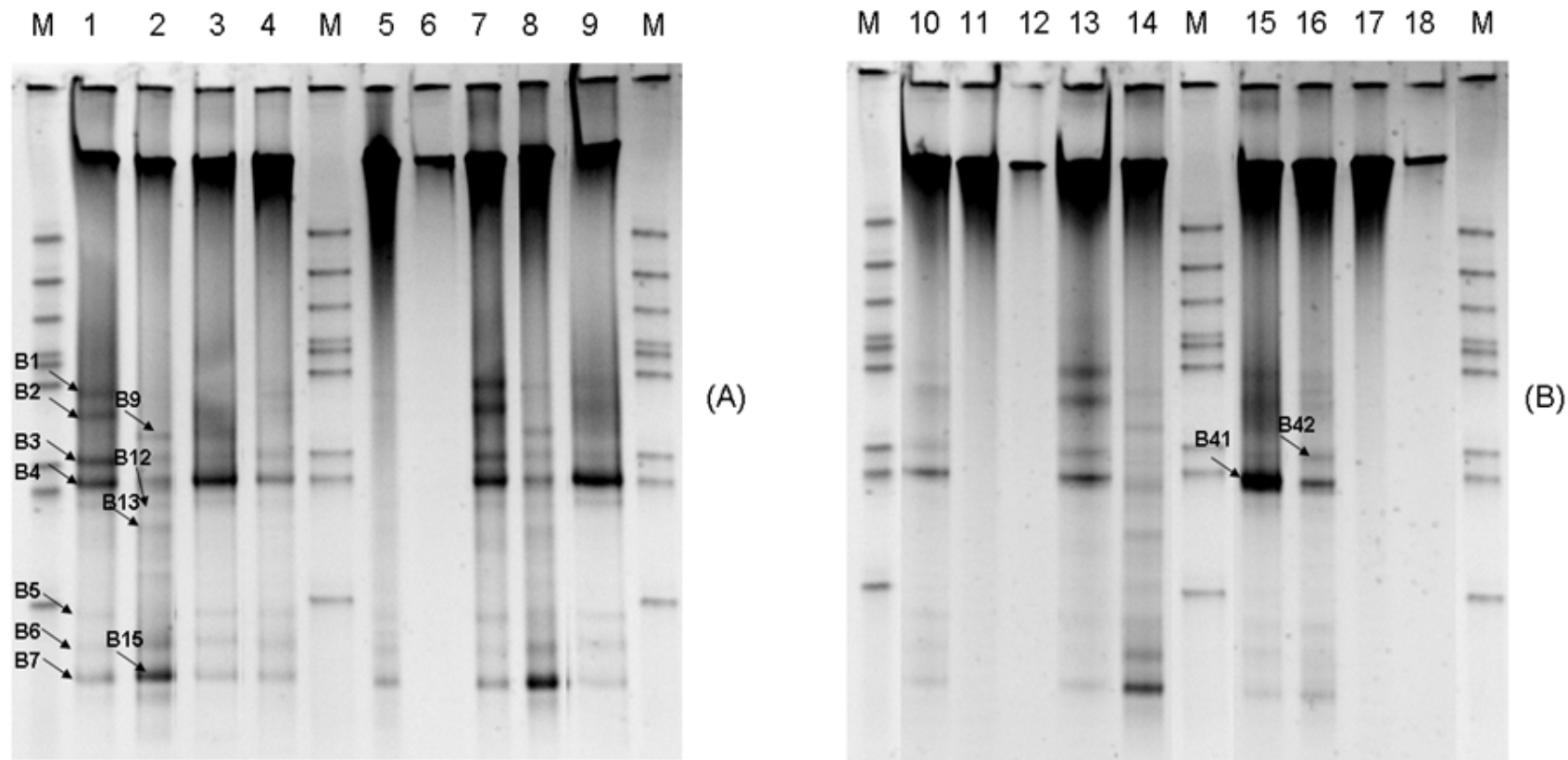


Figura 5: Perfil de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) dos fragmentos do gene *nifH* amplificados do DNA do solo da rizosfera dos cultivares BRS 308 e BRS 310 plantados em solo de Cerrado tratados com baixo e alto teor de nitrogênio e amostras de solo não rizosférico. As linhas correspondem A: (1) BRS 308 N1 A1, (2) BRS 308 N2 A1, (3) BRS 310 N1 A1, (4) BRS 310 N2 A1, (5) NR N1:1, (6) NR N2:1, (7) BRS 308 N1 A2, (8) BRS 308 N2 A2, (9) BRS 310 N1 A2; B: (10) BRS 310 N2 A2, (11) NR N1:2, (12) NR N2:2, (13) BRS 308 N1 A3, (14) BRS 308 N2 A3, (15) BRS 310 N1 A3, (16) BRS 310 N2 A3, (17) NR N1:3, (18) NR N2:3. M corresponde aos marcadores, N1 representa baixo teor de nitrogênio (12 kg/ha) e N2 representa alto teor de nitrogênio (120 kg/ha); A1, A2 e A3 representam as réplicas. As setas indicam as bandas que foram extraídas do gel, reamplificadas e seqüenciadas.

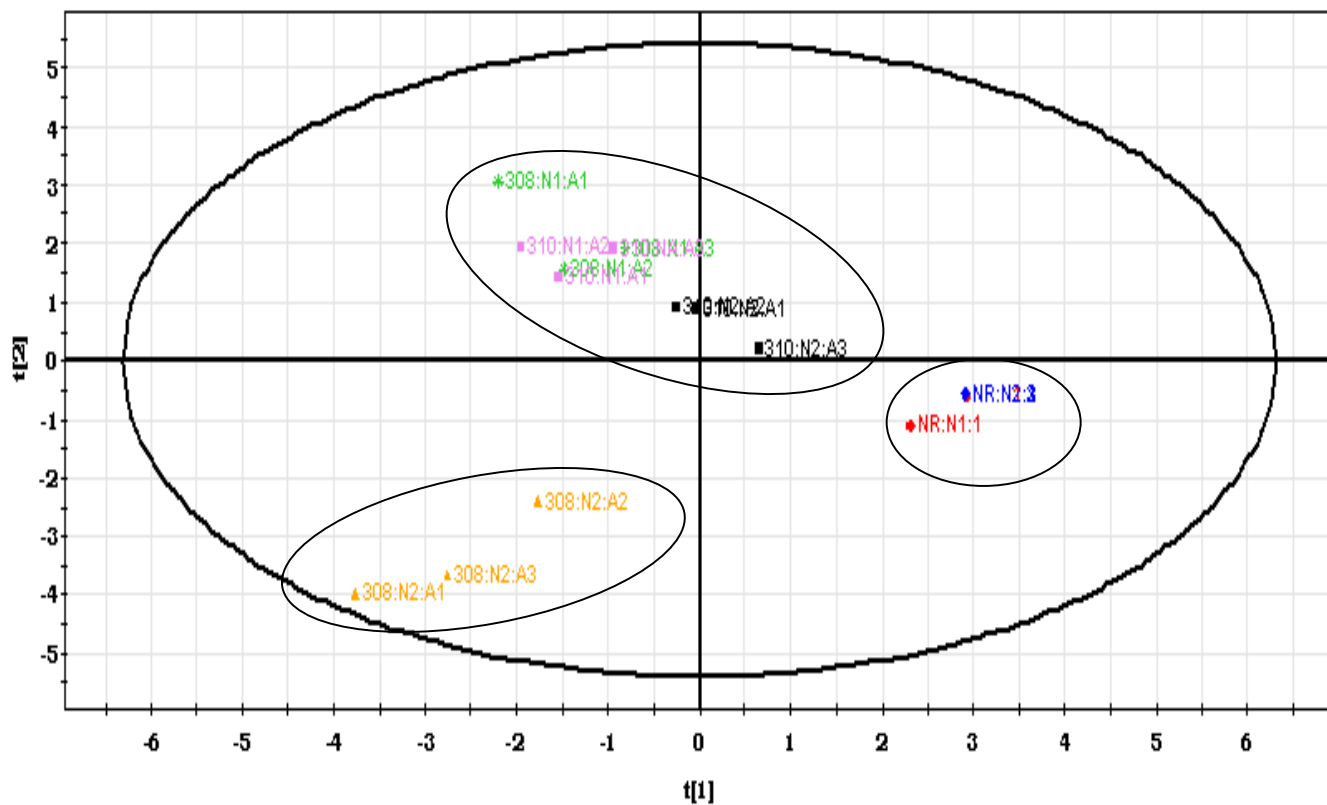


Figura 6: Análise discriminante (PLS-DA) das amostras de rizosfera dos cultivares BRS 308, BRS 310 plantados em solo de Cerrado e tratados com baixo e alto teor de nitrogênio e amostras de solo não rizosférico (NR). N1 representa baixo teor de nitrogênio (12 kg/ha) e N2 representa alto teor de nitrogênio (120 kg/ha); A1, A2 e A3 representam as réplicas.

6.2.2 – Análise das seqüências das bandas extraídas dos géis de DGGE

Como os perfis de DGGE permitem a identificação presuntiva de bandas, 13 bandas (indicadas na Figura 5) foram extraídas do gel, reamplificadas, clonadas e seqüenciadas. A análise das seqüências no BLAST-N revelou que a maioria delas (10 = 76,9%) eram relacionadas a seqüências do gene *nifH* de bactérias não cultivadas, também isoladas da rizosfera de sorgo, enquanto as demais eram próximas a *Klebsiella pneumoniae* (duas seqüências) e *Azohydromonas lata* (Tabela 7). Com o objetivo de minimizar o número de clones relacionados a organismos não cultivados, também foi considerado o primeiro *hit* do BLAST-N correspondente a uma seqüência de bactéria cultivada. Foram encontrados clones do gene *nifH* afiliados a *Mesorhizobium loti*, *Azohydromonas australica*, *Delftia tsuruhatensis*, *Bradyrhizobium* sp. e *Azospirillum brasilense* (Tabela 7), mostrando que alguns grupos taxonômicos, incluindo membros das *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*, puderam ser identificados como fixadores de nitrogênio em potencial nas amostras analisadas.

Tabela 7: Identificação das seqüências do gene *nifH* obtidas das bandas dos géis de DGGE feita pelo NCBI BLAST-N (primeiro *hit* e a seqüência mais próxima de uma bactéria cultivada).

Banda	Primeiro hit	% identidade	Primeiro hit (cultivável)	% identidade	Posição filogenética ^a
Banda 01	Uncultured bacterium clone IS110 EU048166.1	98%	<i>Mesorhizobium loti</i> AB367742.1	96%	α ; Rhizobiales
Banda 02	Uncultured bacterium clone IPA74 EU048016.1	93%	<i>Azohydromonas australica</i> AB188121.1	88%	β ; Burkholderiales
Banda 03	Uncultured bacterium clone IS110 EU048166.1	97%	<i>Mesorhizobium loti</i> AB367742.1	94%	α ; Rhizobiales
Banda 04	<i>Klebsiella pneumoniae</i> AY242355.1	96%		-	γ ; Enterobacteriales
Banda 05	<i>Azohydromonas lata</i> AB188122.1	98%		-	β ; Burkholderiales
Banda 06	Uncultured bacterium clone IS98 EU048155.1	92%	<i>Mesorhizobium loti</i> AB367742.1	90%	α ; Rhizobiales
Banda 07	Uncultured bacterium clone IS110 EU048166.1	96%	<i>Mesorhizobium loti</i> AB367742.1	94%	α ; Rhizobiales
Banda 09	<i>Klebsiella pneumoniae</i> AY242355.1	98%		-	γ ; Enterobacteriales
Banda 12	Uncultured bacterium clone IS92 EU048149.1	99%	<i>Delftia tsuruhatensis</i> AY544164.1	98%	β ; Burkholderiales
Banda 13	Uncultured bacterium clone IS41 EU048099.1	98%	<i>Bradyrhizobium sp.</i> AB079620.1	92%	α ; Rhizobiales
Banda 15	Uncultured bacterium clone DQ995905.1	94%	<i>Azospirillum brasilense</i>	91%	α ; Rhodospirillales
Banda 41	Uncultured bacterium clone IS110 EU048166.1	97%	<i>Mesorhizobium loti</i> AB367742.1	94%	α ; Rhizobiales
Banda 42	Uncultured bacterium clone IPA69 EU048011.1	98%	<i>Mesorhizobium loti</i> AB367742.1	94%	α ; Rhizobiales

^a α , *Alphaproteobacteria*; β , *Betaproteobacteria*; γ , *Gammaproteobacteria*

6.2.3 – Quantificação do gene *nifH* por PCR em Tempo Real (*Real time PCR*).

Com o objetivo de tentar determinar alterações na densidade de diazotróficos nas amostras estudadas em resposta ao teor de nitrogênio aplicado e à cultivar plantada, foi desenvolvido um sistema de PCR em tempo real com base no gene *nifH*, medindo-se a abundância do número de cópias deste gene nas diferentes amostras.

Todas as reações de PCR em tempo real foram realizadas e medidas em triplicata, calculando-se também os desvios padrões. As análises foram bastante reprodutíveis e o desvio padrão pequeno. A abundância do gene *nifH* variou de $2,4 \times 10^5$ a $1,3 \times 10^7$ cópias por grama de solo e o desvio padrão variou de $\pm 3,86 \times 10^4$ a $1,25 \times 10^6$ (Figura 7). O número de genes *nifH* detectados no solo da rizosfera das duas cultivares plantadas com diferentes níveis de fertilizante nitrogenado variou bastante. Além disso, as populações de diazotróficos apresentaram-se em maior número no solo rizosférico de ambas as cultivares do que no solo não rizosférico. As amostras provenientes da cultivar BRS 308 foram as que apresentaram a maior densidade de genes *nifH*, seguidas pelas amostras da cultivar BRS 310 e pelas amostras do solo não rizosférico, que apresentaram uma abundância muito baixa deste gene. Estes dados sugerem que o tipo da cultivar influencia a densidade das populações de diazotróficos.

A quantidade de adubo nitrogenado aplicado também mostrou ter influência na densidade da população fixadora de nitrogênio. A abundância de genes *nifH* diminuiu significativamente tanto na cultivar BRS 308 quanto na cultivar BRS 310, nas amostras em que um alto teor de nitrogênio foi aplicado, mostrando que independente da cultivar utilizada o número de cópias do gene *nifH* é sempre maior nas amostras com baixo teor de nitrogênio. Entretanto, esta tendência não pode ser observada nos solos não rizosféricos, onde a abundância do gene *nifH* foi muito parecida, independentemente do nível de fertilizante aplicado.

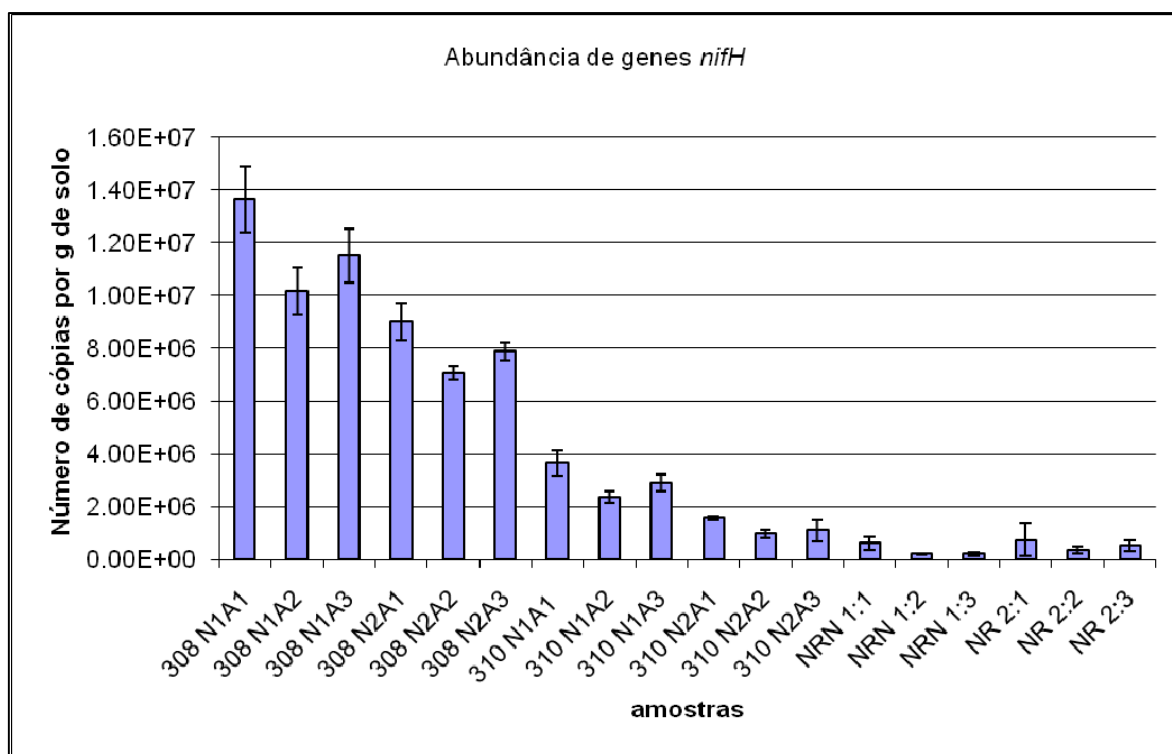


Figura 7: Quantificação do número de cópias do gene *nifH* nas amostras de rizosfera dos cultivares BRS 308, BRS 310 plantados em solo de Cerrado e tratados com baixo e alto teor de nitrogênio e nas amostras de solo não rizosférico (NR). N1 representa baixo teor de nitrogênio (12 kg/ha) e N2 representa alto teor de nitrogênio (120 kg/ha); A1, A2 e A3 representam as réplicas.

6.3 – Desenvolvimento de iniciadores específicos para *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio com base no gene *nifH* e análise da diversidade da população de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio utilizando-se a estratégia de clonagem e seqüenciamento do gene *nifH*.

6.3.1 – Desenho dos iniciadores *nifHPAENf* e *nifHPAENr* e análise da sua especificidade em culturas puras

Para o desenvolvimento de iniciadores específicos para as espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio, primeiramente foi feita uma busca no banco de dados NCBI de

todas as seqüências do gene *nifH* de organismos deste gênero. Como algumas espécies fixadoras não possuíam ainda sua seqüência do gene *nifH* depositada no banco de dados, o DNA destas foi extraído, amplificado com iniciadores universais para o gene *nifH* (POLY, MONROZIER & BALLY, 2001b) e seqüenciado. Este foi o caso das espécies *P. brasilensis* e *P. borealis* que tiveram suas seqüências depositadas neste estudo com os números de acesso EU294253 e EU294254, respectivamente. Após a obtenção das seqüências do gene *nifH* das estirpes-tipo de 9 espécies *Paenibacillus*, foi feita uma busca por seqüências de outras bactérias fixadoras de nitrogênio pertencentes a diversos grupos taxonômicos freqüentemente descritos na literatura, como *Clostridium pasteurianum* (X07473), *Clostridium acetobutylicum* (AE001437), *Klebsiella pneumoniae* (X13303), *Sinorhizobium meliloti* (AE006469), *Rhizobium etli* (AF484653), *Herbaspirillum seropedicae* (Z54207), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (AF030414), *Azotoabacter vinelandii* (M11579), *Azospirillum brasilense* (M64344), *Azoarcus* sp. (AF200742), *Bradyrhizobium japonicum* (AF322012), *Heliobacterium gestii* (AB112406) e *Geobacter sulfurreducens* (AE017180). Todas as seqüências obtidas foram então alinhadas e em seguida foi feita uma busca por uma região específica, que fosse encontrada apenas nas espécies de *Paenibacillus* e não nos outros organismos analisados. Duas regiões foram então escolhidas como base para os iniciadores *forward* (nifHPAENf) e *reverse* (nifHPAENr), específicos para as espécies do gênero *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio. Entre as seqüências de *Paenibacillus* analisadas foram encontradas algumas divergências entre as bases da região selecionada, e por isso foram incluídas algumas bases degeneradas nos iniciadores: nifHPAENf (5'-TKA TYC TGA ACA CGA AAG - 3'), onde K= A/C e Y= C/T, com Tm variando de 48 a 52 °C, %GC de 8,9% a 34 a 44% e nifHPAENr (5'-CTC RCG GAT TGG CAT TGC G - 3'), onde R= A/G, com Tm entre 60 e 62 °C e %GC entre 57 e 60%. Algumas diferenças foram observadas entre os iniciadores e as seqüências de *Paenibacillus*, entretanto, a especificidade dos iniciadores não foi afetada, já que quando estes foram submetidos a uma análise com a ferramenta BLAST-N em busca de seqüências homólogas, somente seqüências de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio foram encontrados nos primeiros *hits*.

6.3.2 – Confirmação da especificidade dos iniciadores nifHPAENf / nifHPAENr em culturas puras

A especificidade dos iniciadores foi testada amplificando-se amostras de DNA de cultura pura obtidas de 10 espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio, 3 espécies fixadoras de nitrogênio pertencentes a outros gêneros bacterianos e 2 espécies não fixadoras de nitrogênio (Tabela 1). Após a amplificação com os novos iniciadores, um produto de aproximadamente 280 pb, conforme o esperado, foi observado nas 10 espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio, enquanto que nas 3 espécies fixadoras de outros gêneros e nas 2 não fixadoras este produto não foi detectado (Figura 8).

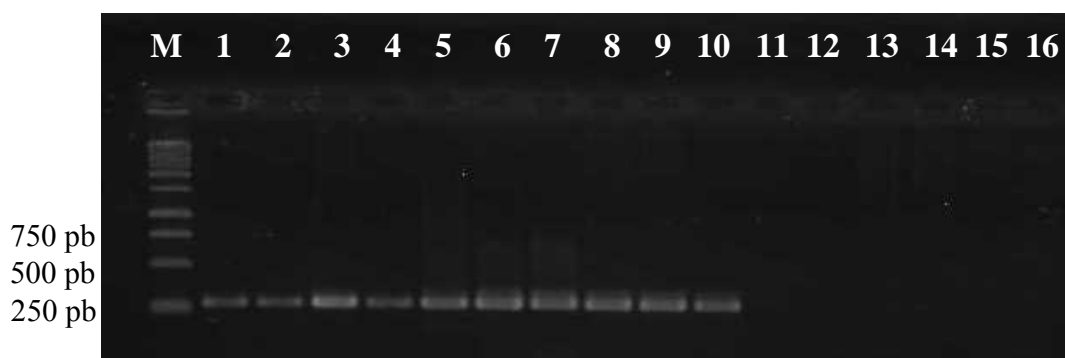


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com os iniciadores nifHPAENf / nifHPAENr. M representa o marcador de peso molecular (1 Kb ladder), 1 - *P. polymyxa* (LMD 24.16^T), 2 - *P. macerans* (LMD 24.10^T), 3 - *P. peoriae* (HSCC 353^T), 4 - *P. durus* (P3L5^T), 5 - *P. graminis* (RSA19^T), 6 - *P. odorifer* (TOD45^T), 7 - *P. borealis* (KK19^T), 8 - *P. brasilensis* (PB172^T), 9 - *P. sabinae* (DSM7841^T), 10 - *P. zanthoxyli* (DSM 18202^T), 11 - *P. campinasensis* (KCTC 0364BP^T), 12 - *Bacillus licheniformis* (T6-3), 13 - *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5), 14 - *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), 15 - *Azospirillum brasilense* (Sp7), 16 - Controle negativo.

6.3.3 – Bibliotecas de seqüências de *nifH* de *Paenibacillus* a partir de amostras de solo de rizosfera

Para validar os novos iniciadores específicos para *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio com base no gene *nifH* em amostras ambientais, foram construídas bibliotecas de seqüências deste gene a partir de amostras de DNA de solo de rizosfera de sorgo da cultivar BRS 308 plantada com baixo e alto teor de nitrogênio. Sendo assim, seria possível validar o sistema e analisar a diversidade de populações de *Paenibacillus* no ambiente estudado. Foram obtidos produtos de PCR com os iniciadores nifHPAENf e nifHPAENr a partir do DNA da rizosfera da cultivar BRS 308 plantada com baixo e alto teor de nitrogênio. Estes produtos foram então clonados dando origem a duas bibliotecas, uma de rizosfera com baixo teor de nitrogênio BRS 308N1 (93 clones) e outra com alto teor de nitrogênio BRS 308N2 (94 clones). Os 187 clones foram seqüenciados, analisados e identificados com a ferramenta BLAST-N. Os resultados mostraram que todas as seqüências obtidas das duas amostras eram relacionadas com o gene *nifH* de *Paenibacillus*, demonstrando a grande especificidade do sistema. Considerando-se apenas o primeiro *hit* do BLAST-N, os clones obtidos da rizosfera com baixo teor de nitrogênio (N1) foram relacionados às espécies *P. durus* (83,9%), *P. zanthoxyli* (1,1%), *P. macerans* (1,1%), *P. graminis* (2,2%), *P. forsythiae* (2,2%), *P. borealis* (1,1%), *Paenibacillus* sp. JT91 (4,3%) e a um clone de bactéria não cultivada IS123 (4,3%), apresentando níveis de similaridade variando entre 86 e 99%. Já os clones da biblioteca construída a partir da rizosfera com alto teor de nitrogênio (N2) foram relacionados às espécies *P. durus* (72,3%), *P. zanthoxyli* (19,1%), *P. macerans* (6,4%) e a um clone de bactéria não cultivada IS123 (2,1%) com valores de similaridade variando entre 86 e 98% (Figura 9). Em ambas as bibliotecas é possível verificar a dominância de seqüências relacionadas à espécie *P. durus*.

Para determinar se a amostragem de clones obtidos em cada biblioteca era representativa, foi feita uma curva de rarefação para cada biblioteca, com base nas UTOs definidas por dois níveis de similaridade (0,03 e 0,05) (Figura 10). Na biblioteca da amostra BRS 308N1 (Figura 10A), as curvas aparentam estar iniciando a sua estabilização, cobrindo bem a diversidade de seqüências da comunidade na amostra, utilizando-se 95 e 97% de

identidade entre as seqüências (Figura 10A). Já na biblioteca da amostra BRS 308N2 (Figura 10B) esta tendência não é tão clara, já que as curvas não aparentam estar atingindo um platô. Neste caso, o número de clones amostrados parece ter sido insuficiente para demonstrar a diversidade total das seqüências do gene *nifH* nesta biblioteca.

Considerando-se agora o número de UTOs encontradas, este foi 14 na biblioteca BRS 308N1 e 60 na biblioteca BRS 308N2. O índice de diversidade de Shannon foi calculado com base nas seqüências obtidas, e mostrou que a diversidade da biblioteca com baixo teor de nitrogênio ($H' = 1,88$) era menor do que a da biblioteca com alto teor de nitrogênio ($H' = 2,96$). Os valores dos índices de riqueza de Chao1 foram bem maiores na biblioteca com alto teor de nitrogênio (109) do que na com baixo teor de nitrogênio (35) (Tabela 8). Estes resultados mostram que a diversidade de seqüências (variação na ordem das bases) de *nifH* de *Paenibacillus* foi maior na biblioteca da amostra com alto teor de nitrogênio BRS 308N2 do que na com baixo teor de nitrogênio BRS 308N1.

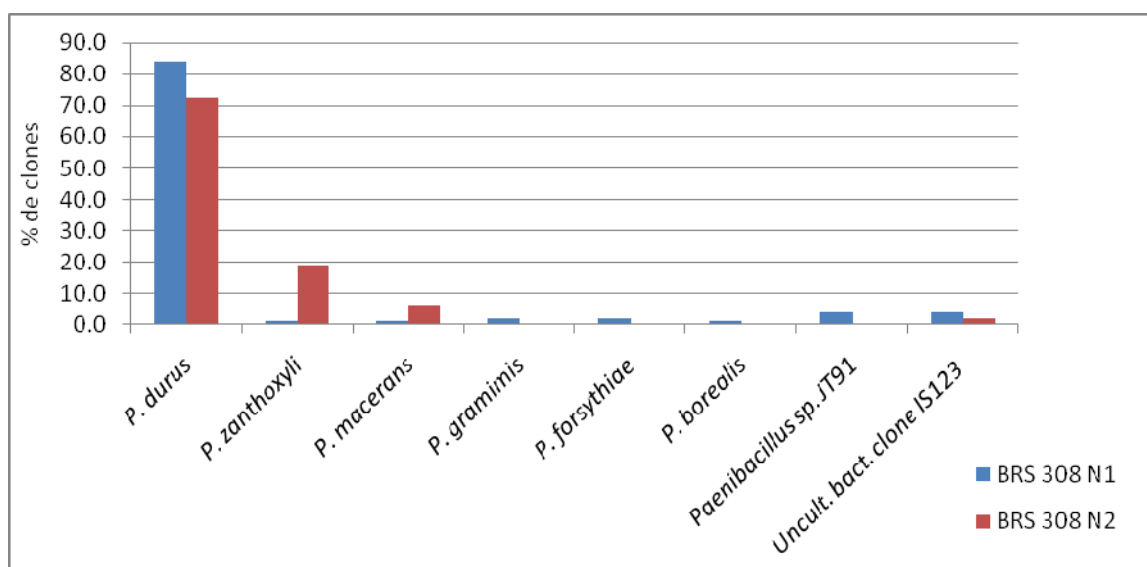
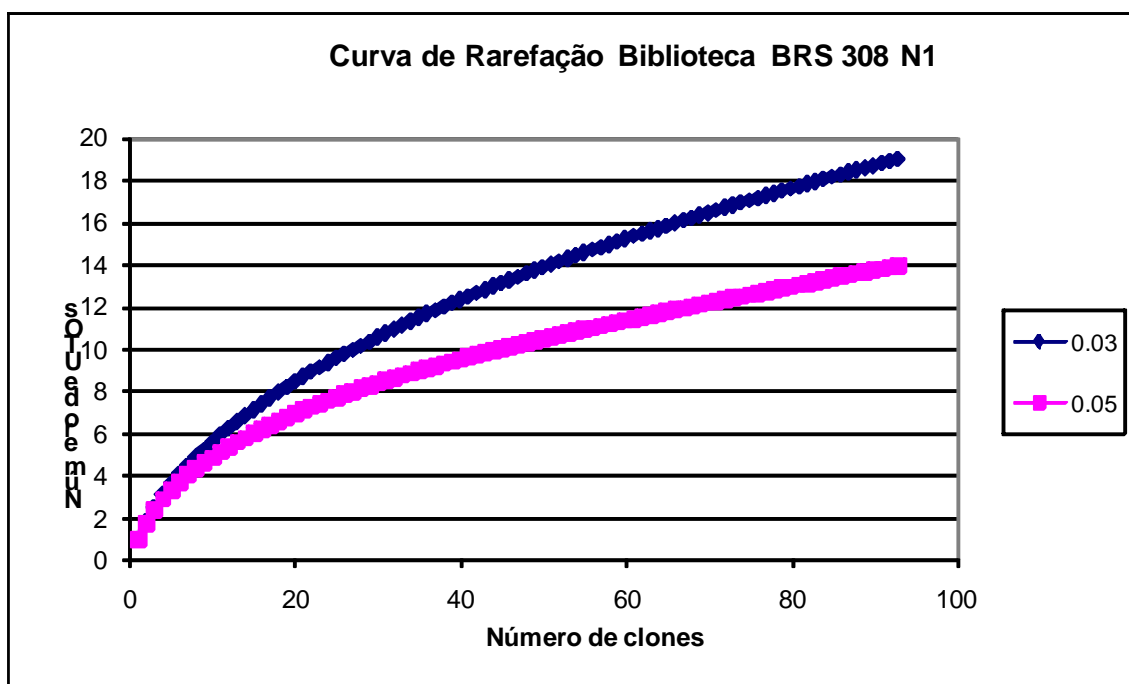


Figura 9: Histograma mostrando os clones obtidos dos solos de rizosfera do cultivar BRS 308 tratado com baixo (93 clones) e alto (94 clones) teor de nitrogênio. A identificação foi realizada através da análise de BLAST-N do GenBank, considerando-se o primeiro *hit* obtido. N1 representa baixo teor de nitrogênio (12 kg/ha) e N2 representa alto teor de nitrogênio (120 kg/ha).

A



B

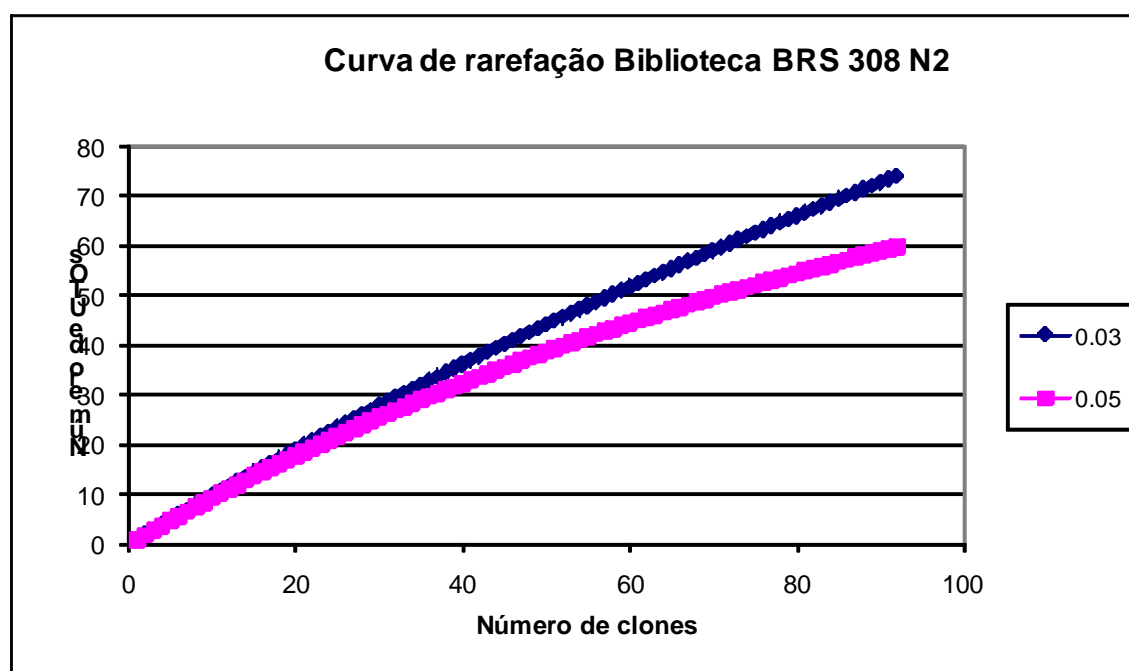


Figura 10: Curva de rarefação com diferentes índices de desimilaridade para a definição de UTOs das bibliotecas obtidas com amostras de DNA de solo da rizosfera do cultivar BRS 308 com baixo teor de nitrogênio (A) e do cultivar BRS 308 com alto teor de nitrogênio (B), utilizando-se os iniciadores nifHPENf e nifHPAENr.

	Número de clones	Número de UTOs	Shannon-Weaver	Estimador Chao1 ^a
BRS 308 N1	93	14	1,88	35 (19,12 a 100,12)
BRS 308 N2	94	60	2,96	109 (81,91 a 171,38)

Tabela 8: Número de clones, UTOs definidas (valor de *cut-off* = 0,05), índices de diversidade (Shannon-Weaver) e riqueza (Chao1) estimados para as bibliotecas de seqüências do gene *nifH* obtidas do cultivar BRS 308 com baixo teor de nitrogênio (N1) e do cultivar BRS 308 com alto teor de nitrogênio (N2), utilizando-se os iniciadores *nifHPENf* e *nifHPAENr*. ^a Valores mínimos e máximos calculados em um intervalo de confiança de 95%.

7 – DISCUSSÃO

7.1 – Análise da diversidade e identificação dos principais grupos de bactérias diazotróficas presentes na rizosfera de duas cultivares experimentais de sorgo plantadas em solo com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, utilizando-se a estratégia de clonagem e seqüenciamento do gene *nifH*.

Neste estudo, foram utilizadas cultivares de sorgo selecionadas a partir de um estudo realizado pela EMBRAPA Milho e Sorgo (CNPMS) em Sete Lagoas, MG, onde diferentes cultivares de sorgo foram avaliadas quanto a sua capacidade produtiva, quando plantadas em solo de cerrado contendo baixa quantidade de adubo nitrogenado. Das 400 cultivares estudadas durante dois anos, 100 foram selecionadas e novamente avaliadas nas mesmas condições anteriores. Destas, somente 24 cultivares foram consideradas “eficientes” em baixas concentrações de nitrogênio, isto é, atingiram o máximo de seu crescimento e não apresentaram nenhum sintoma característico de falta de nitrogênio (por exemplo, amarelamento das folhas). As demais foram consideradas “ineficientes”, pois necessitavam a adição de altas concentrações de adubo nitrogenado para o seu bom

crescimento. Todos estes ensaios foram conduzidos em solo de cerrado pela sua importância para a região, por ser amplamente utilizado na agricultura e por constituir cerca de 20% dos solos brasileiros (DIANESE, SANTOS & FURLANETO, 1994).

A comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio presentes na rizosfera de duas destas cultivares de sorgo selecionadas pelo CNPMS - IPA 1011 e IS 5322-C (eficiente e ineficiente, respectivamente, na ausência de nitrogênio no solo) - plantadas em solo de cerrado contendo baixos (12kg/ha = - N) e altos (120kg/ha = + N) teores de nitrogênio foi analisada com base no gene *nifH*. Este gene foi clonado gerando quatro bibliotecas de clones. A identificação e a análise das seqüências obtidas forneceram uma visão geral da diversidade das populações de diazotróficos, permitindo a identificação dos principais grupos taxonômicos que possam estar sendo selecionados pela baixa quantidade de nitrogênio aplicado e/ou pela cultivar, e contribuindo assim com o fornecimento de nitrogênio para o crescimento da planta. O gene *nifH* foi escolhido pois este vem sendo amplamente utilizado para se estudar e descrever populações de diazotróficos em diferentes ecossistemas, inclusive no solo e na rizosfera de plantas (HAMELIN *et al.*, 2002, REITER *et al.*, 2003, DIALLO *et al.*, 2004, DESLIPPE & EGGER, 2006, IZQUIERDO & NÜSSLEIN, 2006, ZHANG *et al.*, 2006, WARTIAINEN *et al.*, 2008). Atualmente existem mais de 16 mil seqüências relacionadas a este gene depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Junho de 2008). Este é um dos maiores bancos de seqüências não ribossômicas que reúne dados de organismos cultiváveis e não cultiváveis. Além disso, por se tratar de um gene funcional, uma correlação entre estrutura e função da comunidade bacteriana pode ser feita em estudos ecológicos.

Das 245 seqüências de clones obtidas a partir das quatro bibliotecas, 57% mostraram-se relacionadas com seqüências de bactérias não cultivadas, enquanto que as demais estavam distribuídas nas ordens: Rhizobiales, Burkholderiales, Bacillales, Sphingomonadales, Rhodospirillales e Enterobacteriales (Figura 3). Filogeneticamente, o gene *nifH* pode ser dividido em 4 grupos (*clusters*) que contém 49 subgrupos diferentes. Destes, 22 são formados somente por representantes não cultiváveis e vários outros subgrupos contém um ou poucos membros cultiváveis (ZEHR *et al.*, 2003). Diversos trabalhos já relataram o isolamento de seqüências provenientes de diferentes tipos de ambiente, inclusive o solo, correspondendo a diversos diazotróficos ainda não identificados

e muitas vezes os diazotróficos não cultivados podem ser organismos fixadores de nitrogênio dominantes em determinados solos (UEDA *et al.*, 1995, WIDMER *et al.*, 1999, PICENO & LOVELL, 2000, POLY, MONROZIER & BALLY, 2001b, TAN, HUREK & REINHOLD-HUREK, 2003, ZEHR *et al.*, 2003, BÜRGMANN *et al.*, 2005). Analisando a fixação do nitrogênio *in situ* de diazotróficos de vida livre no solo através da técnica de $^{15}\text{N}_2$ DNA-SIP, Buckley *et al.* (2007) detectaram que a maioria das seqüências analisadas correspondia a fixadores não cultivados. Esta tendência também pode ser observada em diversos estudos de diversidade do gene *nifH* em solos tropicais, temperados, árticos e do Tibete, onde a maioria dos clones obtidos era relacionada a seqüências de fixadores não cultivados (DESLIPPE & EGGER, 2006, IZQUIERDO & NÜSSLEIN, 2006, ZHANG *et al.*, 2006). Estes fatos indicam que estas seqüências encontradas em grande quantidade na rizosfera das duas cultivares com ambos os tratamentos podem representar um grupo novo e ainda não explorado de fixadores não cultivados que podem estar contribuindo para o fornecimento de nitrogênio no solo.

Devido ao grande número de seqüências correlacionadas a organismos não cultivados, optou-se por considerar também o primeiro *hit* do BLAST-N correspondente a uma seqüência de bactéria cultivada. Em todas as bibliotecas foram encontrados clones relacionados a *Azohydromonas* spp., *Ideonella* sp., *Rhizobium etli* e *Bradyrhizobium* sp. Este resultado está de acordo com o obtido por Roesch *et al.* (2007), em bibliotecas obtidas a partir de solo, rizosfera e raiz de milho, onde também foram encontrados clones relacionados a estas espécies. A alta abundância de genes *nifH* de *Alphaproteobacteria* (principalmente dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*) encontrada nas bibliotecas pode ser explicada pela prática de rotação de cultura com plantas leguminosas (como a soja), nos locais onde foi realizado o plantio. Apesar de ser considerada uma espécie simbiote, estirpes de *Rhizobium* são capazes de colonizar raízes de diversas plantas não-leguminosas como arroz, milho e trigo (YANNI *et al.*, 1997, GUTIÉRREZ-ZAMORA & MARTÍNEZ-ROMERO, 2001) e já foram utilizadas em experimentos de inoculação, na forma de consórcio com outros diazotróficos, em sorgo (SAINIA, BHANDARIB & TARAFDAR, 2004). Algumas espécies de *Bradyrhizobium* também já foram observadas como ativas na fixação de nitrogênio em arroz (CHAINTREUIL *et al.*, 2000).

Após a análise das quatro bibliotecas, foi possível detectarmos algumas diferenças nas composições de fixadores de nitrogênio de cada uma. Em relação à cultivar eficiente (IPA 1011), os baixos teores de nitrogênio podem ter favorecido as populações de *Alphaproteobacteria*. Foi encontrada uma porcentagem maior deste grupo na biblioteca obtida a partir desta cultivar com baixo teor de nitrogênio (E – N), do que na obtida da mesma cultivar com altos teores de nitrogênio (E + N) (Tabelas 2 e 3). Este fato sugere que talvez este grupo possa estar contribuindo para a eficiência da cultivar em baixas doses de adubo nitrogenado. A mesma tendência pôde ser observada para clones afiliados a *Bradyrhizobium* sp. que foram 30% mais abundantes nas rizosferas da cultivar ineficiente (IS 5322-C) com baixo teor de nitrogênio. Sequências relacionadas a *Delftia tsuruhatensis*, que foram encontradas na rizosfera das duas cultivares plantadas com alto teor de nitrogênio (Tabelas 3 e 5), já foram isoladas da rizosfera de arroz e descritas como promotoras do crescimento de plantas devido a sua capacidade de fixar o nitrogênio e de produzir substâncias antimicrobianas contra diversos patógenos de plantas (HAN *et al.*, 2005). Clones relacionados a *Methylocystis* sp. parecem ter sido afetados pela presença de altas concentrações de nitrogênio, já que foram detectados somente em plantas cultivadas com baixos níveis de nitrogênio (Tabelas 2 e 4). Mohanty *et al.* (2006) já demonstraram que em solo de floresta e em de cultivo de arroz, espécies de *Methylocystis* foram afetadas pela fertilização aplicada. Para determinadas seqüências não foi possível traçar uma correlação entre a cultivar e/ou o teor de nitrogênio aplicado, como no caso de seqüências de *Azospirillum* spp. e *Sinorhizobium* sp., que só foram detectadas nas bibliotecas obtidas a partir de I – N e E + N, respectivamente. Sequências de *Pelomonas saccharophila* e *Xanthobacter flavus*, bactérias já isoladas de solo e rizosfera de arroz, respectivamente (REDING, HARTEL & WIEGEL, 1991, XIE & YOKOTA, 2005) foram detectadas em todas as bibliotecas com exceção da E + N (Tabelas 2 a 5). Por fim, clones relacionados à espécie *Paenibacillus durus* somente foram encontrados nas bibliotecas da cultivar ineficiente com ambos os tratamentos (Tabelas 4 e 5). Esta espécie é capaz de colonizar a rizosfera de diversas plantas não-leguminosas (BÜRGMANN *et al.*, 2005), além de influenciar o crescimento e a saúde de plantas produzindo fitormônios, quitinases, proteases e substâncias antimicrobianas, solubilizando o fosfato e fixando nitrogênio, inclusive na presença de nitrato (MAVINGUI & HEULIN, 1994, SELDIN *et al.*, 1998).

Considerando-se a identificação das seqüências pelo BLAST-N, os testes estatísticos realizados mostraram que foram alcançados bons índices de cobertura em todas as bibliotecas, 91,8% (I + N) a 98,3% (E + N), o que dá maior confiabilidade aos dados. A análise de componentes principais (PCA) é um método estatístico que concentra a variabilidade de grandes conjuntos de dados em um único conjunto menor de variáveis chamadas componentes principais, facilitando assim a interpretação das relações existentes entre os dados observados (MUMFORD *et al.*, 2007). Na tentativa de avaliar o efeito das cultivares eficiente e ineficiente de sorgo, e do teor de nitrogênio aplicado como adubo na comunidade diazotrófica presente nas rizosferas, a PCA mostrou que as amostras da cultivar considerada eficiente (IPA 1011) se diferenciam das da cultivar ineficiente (IS 5322-C), porém o nível de nitrogênio aplicado teve maior efeito na variância das espécies potencialmente diazotróficas (Figura 4). Resultados similares foram descritos por Carelli *et al.* (2000) em cultivares de alfafa e populações de *Sinorhizobium*. Já Coelho *et al.* (2007) observaram que populações de *Paenibacillus* eram mais afetadas pela cultivar do que pelo teor de nitrogênio aplicado. Entretanto, considerando que o presente estudo foi baseado em amplificações por PCR de amostras de DNA e não de RNA, não foi possível confirmar se os genes *nifH* estão sendo realmente expressos. Assim, seriam necessários estudos com base em testes de redução de acetileno e de expressão de genes *nifH* para investigar se a enzima nitrogenase destes diazotróficos está realmente ativa na rizosfera das cultivares de sorgo, e assim contribuindo para o fornecimento de nitrogênio no solo.

Estudos de diversidade de genes funcionais realizados a partir de amostras de mRNA seguidos de uma reação de RT-PCR, podem fornecer informações mais precisas sobre a atividade das populações estudadas pois, em tese, estas estariam metabolicamente ativas e o gene em estudo, de fato, sendo expresso. Knauth *et al.* (2005) verificaram que a aplicação de fertilizante nitrogenado promoveu uma pequena alteração na população fixadora de nitrogênio presente na raiz de diferentes cultivares de arroz plantados em um mesmo local. Entretanto, esta alteração só foi clara nos perfis de T-RFLP oriundos de amostras de cDNA, enquanto pouca ou nenhuma diferença foi encontrada nas amostras de DNA. Em contrapartida, analisando a estrutura da comunidade de diazotróficos em campos de cultivo de arroz, Wartainen *et al.* (2008) observaram que os perfis de DGGE gerados a partir de cDNA foram muito parecidos com os gerados a partir de DNA. Entretanto, neste

caso as populações não haviam sido submetidas a nenhum estímulo externo não natural. Sendo assim, estudos com base no mRNA podem fornecer informações mais precisas sobre a atuação de microrganismos, bem como seu papel no solo e na rizosfera de plantas, principalmente em resposta a diferentes estímulos e fatores externos como adubação, tipo de solo, cultivar da planta e estresse hídrico (GIRVAN *et al.*, 2003, TAN, HUREK & REINHOLD-HUREK, 2003).

7.2 – Análise da diversidade molecular e quantificação do gene *nifH* de bactérias presentes na rizosfera de duas cultivares comerciais de sorgo plantadas em solo com baixo e alto teor de adubo nitrogenado, utilizando-se as técnicas de PCR-DGGE e PCR em tempo real (*Real Time PCR*).

A estrutura da comunidade de fixadores de nitrogênio presentes na rizosfera de duas cultivares comerciais de sorgo (BRS 308 e BRS 310) tratadas com baixos (12 kg/ha = N1) e altos (120 kg/ha = N2) teores de nitrogênio foi analisada através da técnica de PCR-DGGE com base no gene *nifH*. Para obtenção dos produtos de PCR do gene *nifH* para a análise de DGGE foi feita uma primeira tentativa utilizando-se os iniciadores PolF e PolF (POLY, MONROZIER & BALLY, 2001b) acrescido de um grampo de GC, entretanto os resultados não foram satisfatórios. Foi necessária uma reação de *nested* PCR utilizando-se os iniciadores (FGPH19/ PolR e AQER/ PolF-GC). Uma possível explicação para a necessidade de um *nested* PCR seria o baixo número de diazotróficos na amostra. Algumas vezes o número de fixadores de nitrogênio é muito baixo quando comparado a outros grupos presentes em amostras de solo, como descrito por Diallo *et al.* (2004) para as árvores de leguminosas *Balanites aegyptiaca* e *Acacia tortilis* ssp. *raddiana*. Em experimentos de bibliotecas de clones de 16S rDNA realizados em amostras de solo de floresta, aproximadamente 5% dos clones foram identificados como diazotróficos (WIDMER *et al.*, 1999, MERGEL *et al.*, 2001). Embora os diazotróficos sejam altamente adaptados às condições físicas e químicas do solo, estas bactérias raramente são dominantes em ecossistemas terrestres (TATE, 1995).

Foi observado através dos perfis gerados pela análise de DGGE que as amostras de solo não rizosférico tinham um número bem menor de bandas do que as amostras

provenientes de solo rizosférico. Este fato se deve provavelmente à intensa atividade microbiana ao redor de raízes de planta, conforme o sugerido por Bowen & Rovira (1991). A análise discriminante feita com base nos perfis de DGGE indica que o teor de nitrogênio aplicado (12 e 120 kg/ha) não afetou o *pool* de seqüências do gene *nifH* das amostras da cultivar BRS 310 e do solo não rizosférico, já que cada uma apresentou um padrão muito similar com ambos tratamentos (Figura 6). Em contrapartida, as amostras da cultivar BRS 308 foram bastante influenciadas pelo tratamento com nitrogênio, já que os padrões de agrupamento foram bem diferentes para amostras tratadas com alto teor de nitrogênio. Estes resultados sugerem que a estrutura da comunidade das cultivares BRS 308 e BRS 310 não seja a mesma e que seus componentes respondam de maneira diferente ao tratamento com nitrogênio.

Os resultados encontrados enfatizam a importância da escolha da cultivar na seleção de populações fixadoras de nitrogênio que venham a coexistir na rizosfera e na seleção de estirpes a serem utilizadas como inoculantes em sorgo. A importância da escolha da cultivar também foi demonstrada na associação entre cultivares de milho e populações de *Azospirillum* (GARCIA DE SALOMONE *et al.*, 1996) e entre cultivares de alfafa e populações de *Sinorhizobium* (CARELLI *et al.*, 2000). Com base em análises de DGGE, foi demonstrado que as cultivares de sorgo também influenciam as populações de *Paenibacillus* (COELHO *et al.*, 2007). Embora já tenha sido descrito que a aplicação de fertilizantes nitrogenados inibe a redução de acetileno na rizosfera de sorgo e outros cereais (VAN BERKUM & SLOGER, 1983), que tem efeitos negativos na população fixadora de nitrogênio (TANAKA *et al.*, 2006) e reduz a biomassa microbiana no solo (O'DONNELL *et al.*, 2001), estudos recentes a respeito deste efeito na população microbiana do solo são contraditórios (KNAUTH *et al.*, 2005). Em um estudo realizado com amostras de raiz e solo de rizosfera de milho, as populações de fixadores de nitrogênio não sofreram alterações quando tratadas com fertilizantes nitrogenados (ROESCH *et al.*, 2006). Além disso, também foi demonstrada uma estabilidade na população de diazotróficos na rizosfera de *Spartina alterniflora* após a adição de fertilizantes nitrogenados (BAGWELL & LOVELL, 2000, PICENO & LOVELL, 2000). Também já foi descrito que algumas espécies de diazotróficos de vida livre são capazes de expressar o gene *nifH* mesmo na presença de altas concentrações de nitrato (TEIXEIRA *et al.*, 2008). Neste contexto, Sainia,

Bhandarib & Tarafdar (2004) demonstraram que a biomassa de C, N e P microbiana na rizosfera de *Sorghum bicolor* foi significativamente maior quando foi utilizada uma combinação de *Azospirillum brasilense* ou *Rhizobium*, *Bacillus megaterium* e *Glomus fasciculatum*. Além disso, a produção máxima foi alcançada quando foi aplicada 50% da quantidade recomendada de fertilizante, mostrando a necessidade e o uso de nitrogênio concomitante com a inoculação de diazotróficos.

A análise de DGGE permite a extração de bandas do gel para seqüenciamento do fragmento de DNA permitindo a identificação do mesmo mediante a comparação com seqüências disponíveis nos bancos de dados. Neste estudo, a análise de seqüências foi limitada a 13 bandas de DGGE e revelou que a maioria era relacionada a clones de bactérias não cultivadas, *alpha*, *beta* e *gammaproteobacteria* (Tabela 7). Este resultado está de acordo com o encontrado na análise das bibliotecas de clones do gene *nifH* obtidas da rizosfera das cultivares experimentais (eficiente e ineficiente) de sorgo plantadas com alto e baixo teor de nitrogênio onde, assim como ocorreu para a cultivar BRS 308, a concentração de nitrogênio influenciou a composição da comunidade de diazotróficos. Além disso, também foi detectada uma alta porcentagem de seqüências relacionadas a clones de bactérias não cultivadas, confirmando a tendência observada na análise anterior e em outros estudos de ecologia microbiana que sugerem o papel importante dos organismos não cultivados (DESLIPPE & EGGER, 2006, IZQUIERDO & NÜSSLEIN, 2006, BUCKLEY *et al.*, 2007, WARTIAINEN *et al.*, 2008).

Através da técnica de PCR em tempo real foi possível quantificar a abundância do gene *nifH* nas duas cultivares de sorgo sob baixo e alto nível de fertilizante nitrogenado. A abundância do gene *nifH* foi muito maior na cultivar BRS 308 do que na BRS 310 e no solo não rizosférico, sugerindo que existem diferenças na comunidade de fixadores de nitrogênios que, como dito anteriormente, têm um importante papel no ciclo do nitrogênio e em solos de agricultura (Figura 7). Estes resultados indicam que a escolha da cultivar tem influência sob a densidade das populações de diazotróficos, o que corrobora os dados obtidos na análise por DGGE. Nesta análise também foi observada a influência da cultivar no comportamento da estrutura da comunidade dos potenciais fixadores de nitrogênio. Além disso, estes dados poderiam sugerir a ocorrência de uma taxa maior de fixação de nitrogênio na cultivar BRS 308. Entretanto, isto não pode ser confirmado já que não foram

feitos testes de redução de acetileno diretamente nos solos estudados. Uma possível explicação para as diferenças existentes entre as populações das cultivares seria uma variação na composição e na concentração dos exudatos liberados pelas raízes das plantas, como sugerido por Bürgmann *et al.* (2005).

Neste estudo houve uma diminuição na abundância do gene *nifH* nos solos rizosféricos de ambas as cultivares tratadas com alto teor de nitrogênio. Como mencionado anteriormente, estudos sobre os efeitos da aplicação de fertilizante nitrogenado são contraditórios, pois apesar de mostrarem que o nitrogênio inibe a redução de acetileno na rizosfera, tem efeito negativo sob a população de diazotróficos e reduz a biomassa microbiana no solo (VAN BERKUM & SLOGER, 1983, O'DONNELL *et al.*, 2001, TANAKA *et al.*, 2006). Outros autores demonstraram uma estabilidade das populações de diazotróficos, a capacidade de certas bactérias em expressar o gene *nifH* na presença de nitrato e até a melhora da produtividade e na biomassa microbiana, quando baixas quantidades de nitrogênio foi aplicado junto com bioinoculantes (BAGWELL & LOVELL, 2000, PICENO & LOVELL, 2000, SAINIA, BHANDARIB & TARAFDAR, 2004, ROESCH *et al.*, 2006, TEIXEIRA *et al.*, 2008). Neste contexto, um estudo demonstrou que a abundância relativa do gene *nifH* na parte aérea de pepino não foi afetada pela aplicação de nitrogênio. Já nas amostras de raiz de pepino, a abundância de genes *nifH* aumentou após a aplicação de nitrogênio (JURAEVA *et al.*, 2006).

No presente estudo, o número de cópias do gene *nifH* nos solos não rizosférico foi muito similar independentemente do nível de nitrogênio aplicado, onde uma baixa densidade de diazotróficos foi detectada. Esta observação poderia ser justificada pela menor atividade microbiana nestas amostras.

Como o processo de fixação biológica do nitrogênio não foi quantificado, as informações apresentadas neste estudo podem ser consideradas de caráter especulativo. Entretanto, como já citado anteriormente, alguns estudos mostram que padrões de análises feitas com mRNA são muito semelhantes às feitas com DNA (TAN, HUREK & REINHOLD-HUREK, 2003, WARTIAINEN *et al.*, 2008).

7.4 – Desenvolvimento de iniciadores específicos para *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio com base no gene *nifH* e análise da diversidade da população de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio utilizando-se a estratégia de clonagem e seqüenciamento do gene *nifH*.

Quando o gênero *Paenibacillus* foi descrito por Ash *et al.*(1993), este possuía apenas três espécies com estirpes capazes de fixar o nitrogênio atmosférico. Atualmente existem 14 espécies deste gênero descritas como fixadoras de nitrogênio e/ou que possuem o gene *nifH* no seu genoma. Destas 14, 6 foram descritas nos últimos 3 anos. Estes dados só confirmam a importância deste gênero e o aumento do interesse nas suas estirpes que, além de fixarem o nitrogênio atmosférico, muitas vezes possuem outras características importantes para a promoção do crescimento das plantas como produção de substâncias antimicrobianas, sideróforos e ácido indol acético (CHANWAY, HOLL & TURKINGTON, 1988, ROSADO & SELDIN, 1993, VON DER WEID *et al.*, 2003). Entretanto, os estudos moleculares (utilizando-se métodos independentes de cultivo) destes microrganismos, bem como seu papel ecológico no ambiente e em solos de agricultura, era limitado.

Shida *et al.* (1997) desenvolveram um par de iniciadores específicos para o gênero *Paenibacillus* com base no gene que codifica o 16S rRNA (gene *rrs*), que posteriormente foi adaptado por Silva *et al.* (2003) para ser utilizado em análise de DGGE. Até o ano de 2001, alguns iniciadores para o gene *nifH* estavam descritos na literatura (ZEHR & MACREYNOLDS, 1989, SIMONET *et al.*, 1991, UEDA *et al.*, 1995, OHKUMA *et al.*, 1996, WIDMER *et al.*, 1999), entretanto a maioria deles ou era muito específico para um determinado gênero ou acabava tendo uma amplificação preferencial para bactérias Gram-negativas. Em 1998, Rosado *et al.* desenvolveram um sistema de PCR-DGGE utilizando iniciadores específicos para a espécie *P. durus* com base no gene *nifH*, porém a análise era restrita a esta espécie. Três anos depois, Poly, Monrozier & Bally (2001b) testaram vários iniciadores para gene *nifH* em diferentes gêneros bacterianos conhecidos como fixadores de nitrogênio e sugeriram um novo par de iniciadores para se estimar a diversidade de diazotróficos através do gene *nifH*. Este par de iniciadores mostrou ser bastante eficiente na amplificação do gene *nifH* de uma gama de bactérias diazotróficas filogeneticamente

diferentes. A partir deste trabalho, estes iniciadores passaram a ser utilizados em diversos estudos de diversidade de diazotróficos (DIALLO *et al.*, 2004, HÉRY *et al.*, 2005, ROESCH *et al.*, 2006, BIN *et al.*, 2007, WARTIAINEN *et al.*, 2008).

No presente estudo, um dos objetivos era desenvolver um par de iniciadores com base no gene *nifH* que abrangesse todas as espécies de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio no ambiente, permitindo estudos com base na amplificação de ácidos nucléicos diretamente de amostras ambientais e que viessem a contribuir para o conhecimento da diversidade e do papel deste grupo no ambiente. Foi desenhado um par de iniciadores específicos para amplificar parte do gene *nifH* de *Paenibacillus* com base nas seqüências das espécies deste gênero fixadoras de nitrogênio. A especificidade dos iniciadores foi confirmada com testes de amplificação de amostras de DNA de cultura pura e de solo rizosférico. Em ambos os casos, foram amplificadas somente seqüências de *Paenibacillus*. Das 14 espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio, 4 (*P. forsythiae*, *P. donghaensis*, *P. wynnii* e *P. massiliensis*) não foram testadas neste estudo. Apesar da espécie *P. massiliensis* ter sido descrita em 2004 (ROUX & RAOULT, 2004), apenas no ano de 2006 esta foi descrita como possuidora do gene *nifH* (ZHAO, XIE & CHEN, 2006). *P. forsythiae* e *P. donghaensis* são espécies que foram descritas muito recentemente (MA & CHEN, 2008, CHOI *et al.*, 2008). No presente trabalho, clones relacionados à espécie *P. forsythiae* foram detectados na biblioteca da cultivar BRS 308 tratada com baixo teor de nitrogênio. A espécie *P. wynnii* também não pode ser testada, entretanto a seqüência do gene *nifH* da estirpe-tipo desta espécie apresentou 81% de similaridade com as seqüências de *P. durus*, *P. graminis* e *P. macerans*, que foram detectadas nas bibliotecas geradas. Acreditamos, portanto, que se *P. wynnii* estivesse presente nas rizosferas testadas, seqüências relacionadas a esta espécie poderiam ser detectadas utilizando-se os iniciadores descritos.

Além dos dados obtidos com os DNAs de cultura pura, a especificidade do sistema também foi confirmada com DNAs de amostras de solo de rizosera de sorgo (BRS 308) com baixo e alto nível de nitrogênio (Figura 8 e 9). Com base na identificação feita pelo BLAST-N, todos os clones gerados nas duas bibliotecas foram relacionados a seqüências de *Paenibacillus*, inclusive os relacionados ao clone de bactéria não cultivada IS123, já que este clone apresentou mais de 98% de similaridade com *P. durus*. Foi possível observarmos uma forte dominância de seqüências relacionadas a estirpes de *P. durus* nas duas

bibliotecas. Aparentemente, a diversidade das bibliotecas parece ser relativamente baixa, o que pode ter ocorrido devido à dominância de espécies de *P. durus*, *P. zanthoxyli* e *P. macerans*, que foram as mais freqüentemente encontradas. Esta teoria pode ser reforçada pelo fato de todos os clones relacionadas ao gênero *Paenibacillus* encontrados na análise de bibliotecas do gene *nifH* da rizosfera das cultivares experimentais de sorgo (IPA 1011 e IS 5322-C) eram relacionados a espécie *P. durus* (Tabelas 4 e 5).

A análise das bibliotecas realizada a partir dos valores determinados para as UTOs, considerando o valor de similaridade de 0,05, demonstrou que havia uma maior diversidade e uma maior riqueza de seqüências na biblioteca com alto teor de nitrogênio (BRS 308N2) do que nas com baixo teor de nitrogênio (BRS 310N1). Estes resultados corroboram o encontrado nas bibliotecas do gene *nifH* da rizosfera das cultivares experimentais de sorgo (IPA 1011 e IS 5322-C), onde os maiores índices de diversidade foram encontrados nas amostras que continham alto teor de nitrogênio (Tabela 6).

O sucesso da utilização dos iniciadores nifHPAEN, na análise da diversidade de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio, vai depender da qualidade e quantidade de DNA alvo na reação de PCR. Os métodos de extração de DNA de cultura pura (Seldin & Dubnau, 1985) e de solo de rizosfera (kit comercial “Fast DNA Spin Kit (for soil)” Q Bio gene, USA) forneceram quantidades suficientes para a amplificação por PCR das populações de *Paenibacillus*. Entretanto, uma reação de *nested* PCR foi necessária para amostras de solo, já que esta abordagem aumenta a sensibilidade do método. O uso de reações de *nested* PCR tem se mostrado necessário e eficiente na detecção de comunidades bacterianas em amostras de solo onde as populações alvo estão muitas vezes presentes em baixo número já que aumenta a especificidade e a sensibilidade da reação (DIALLO *et al.*, 2004, ROESCH *et al.*, 2007, WARTIAINEN *et al.*, 2008). O mesmo se aplica para ambientes com altas concentrações de matéria orgânica que pode afetar a reação de PCR pela presença de possíveis inibidores (SALES, DE SOUZA & VAN ELSAS, 2002).

8 – CONCLUSÕES

- ✓ Nas quatro bibliotecas contendo seqüências do gene *nifH* foi encontrado um elevado número de seqüências relacionadas a clones de bactérias não cultivadas, sugerindo a importância destes microrganismos no ecossistema estudado.
- ✓ O grupo das *Alphaproteobacteria* pode estar contribuindo para a eficiência da cultivar eficiente IPA 1011, caracterizada como eficiente, merecendo atenção para futuros estudos, principalmente como bioinoculante.
- ✓ A quantidade de nitrogênio aplicada demonstrou ser o fator que mais influencia a comunidade de fixadores de nitrogênio no habitat estudado.
- ✓ A estrutura da comunidade dos diazotróficos presentes na rizosfera da cultivar BRS 308 foi afetada pelas diferentes quantidades de nitrogênio aplicado (12 e 120 kg/ha), enquanto na cultivar BRS 310 e no solo não rizosférico esta tendência não foi observada.
- ✓ A densidade do gene *nifH* das populações de possíveis diazotróficos na rizosfera das cultivares BRS 308 e BRS 310 foi afetada pelos altos níveis de nitrogênio aplicado, porém esta tendência não foi observada nas amostras do solo não rizosférico. Além disso, a cultivar BRS 308 apresentou uma maior abundância de cópias do gene *nifH* em relação à cultivar BRS 310.
- ✓ Os novos iniciadores *nifHPAENf* e *nifHPAENr* foram utilizados para construir duas bibliotecas de clones do gene *nifH* de *Paenibacillus* a partir da rizosfera de sorgo com baixo e alto teor de nitrogênio e, o seqüenciamento e a análise dos clones revelou uma dominância da espécie *P. durus* e uma maior diversidade de seqüências na amostra com alto teor de nitrogênio.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHOUAK, W., NORMAND, P. & HEULIN, T. **Comparative phylogeny of *rrs* and *nifH* genes in the *Bacillaceae***. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 961-967, 1999.
- AKKERMANS, A.D.L., VAN ELSAS, J.D & DE BRUIJN, F.J. (eds) **Molecular Microbial Ecology Manual**. Kluwer academic publishers, The Netherlands, 1995.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J. **Basic local alignment search tool**. J. Mol. Biol. 215,403-410, 1990.
- ASH, C., FARROW, J.A.E., WALLBANKS, S. & COLLINS, M.D. **Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit-ribosomal RNA sequences**. Lett. Appl. Microbiol. 13, 202-206, 1991.
- ASH, C., PRIEST, F.G. & COLLINS, M.D. **Molecular identification of RNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test**. Antonie van Leeuwenhoek 64, 253-260, 1993.
- BAGWELL, C.E. & LOVELL, C.R., **Persistence of selected *Spartina alterniflora* rhizoplane diazotrophs exposed to natural and manipulated environmental variability**. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4625-4633, 2000.
- BALLY, R., THOMAS-BAUZON, D., HEULIN, T.H., BALANDREAU, J., RICHARD, C. & DE LEY, J. **Determination of the most frequent N₂ fixing bacteria in rice rhizosphere**. Can. J. Microbiol. 29, 881-887, 1983.
- BASHAN, Y. & LEVANONY, H. **Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture**. Can. J. Microbiol. 36, 591-608, 1990.
- BELIMOV, A. A., KUNAKOVA, A. M., KOZHEMIKOV, A. P., STEPANOK, V. V. & YUDKIN, L. Y. **Effect of associative bacteria on barley grown on heavy metal contaminated soil**. In: Proceedings of the International Symposium on Agro-environmental issues and future strategies: Towards the 21st Century. Faisalabad, Pakistan, May 25-30, 1998.
- BERGE, O. GUINEBRETIERE, M.H., ACHOUAK, W., NORMAND, P., & HEULIN, T. ***Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food**. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 607-616, 2002.
- BIN, C., SI-PING, Z., LI-JUAN, Z., ZHI-MIN, L., YA-NA, S. & WEI-WEN, Z. **Genetic diversity analysis of diazotrophs in the rice rhizosphere**. Chinese J. Agr. Biotech. 4, 253-258, 2007.
- BISWAS, J.C., LADHA, J.K., DAZZO, F.B., YANNI, Y.G. & ROLFE, B.G. **Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice**. Agron. J. 92, 880-886, 2000.
- BOON, N., WINDT, W., VERTRAETE, W., TOP, E.M. **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 Microbiol. Ecol. 39, 101-112, 2002.
- BOWEN, G. D. & ROVIRA, A. D. *In: Plant roots: the hidden half* (Waisel, Y., Eschel, A. & Kafkafi, U., eds), pp. 349-388, Marcel Dekker, New York, 1991.
- BRIGLIA, M., EGGEN, R.I.L., DE VOS, W.M. & VAN ELSAS, J.D. **Rapid and sensitive method for the detection of *Mycobacterium chlorophenicum* PCP-1 in soil based on 16S rRNA gene-targeted PCR**. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1478-1480, 1996.
- BUCKLEY, D.H., HUANGYUTITHAM, V., HSU, S. F. & NELSON, T.A. **Stable isotope probing with ¹⁵N₂ reveals novel noncultivated diazotrophs in soil**. Appl. Environ. Microbiol. 73, 3196-3204, 2007.
- BÜRGMANN, H., MEIER, S., BUNGE, M., WIDMER, F. & ZEYER, J. **Effects of root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community**. Environ. Microbiol. 7, 1711-1724, 2005
- BÜRGMANN, H., WIDMER, F., VON SIGLER, W. & ZEYER, J. **New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil**. Appl. Environ. Microbiol. 70, 240-247, 2004.
- CARELLI, M., GNOCCHI, S., FRANCELLI, S., MENGONI, A., PAFFETTI, D., SCOTTI, C. & BAZZICALUPO, M. **Genetic diversity and dynamics of *Sinorhizobium meliloti* populations nodulating different alfalfa cultivars in Italian soils**. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4785-4789, 2000.

- CHARENTREUIL, C., GIRAUD, E., PRIN, Y., LORQUIN, J., BÂ, A., GILLIS, M., DE LAJUDIE, P. & DREYFUS, B. **Photosynthetic Bradyrhizobia are natural entophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata***. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5437-5447, 2000.
- CHANWAY, C.P. **Differential response of western hemlock from low and high elevations to inoculation with plant growth promoting *Bacillus polymyxa***. *Soil. Biol. Biochem.* 27, 767-775, 1995.
- CHANWAY, C.P., HOLL, F.B. & TURKINGTON, R. **Genotypic coadaptation in plant growth promotion of forage species by *Bacillus polymyxa***. *Plant Soil.* 106, 281-284, 1988.
- CHELIUS, M.K. & TRIPLETT, E.W. **The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays***. *Microbial Ecol.* 41, 252-263, 2001.
- CHEN, Y.-B., DOMINIC, B., MELLON, M.T., & ZEHR, J.P. **Circadian rhythm of nitrogenase gene expression in the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. Strain IMS 101**. *J. Bacteriol.* 180, 3598-3605, 1998.
- CHET, I & CHERNIN, L. **Biocontrol, microbial agents in soil**. In: Bitton, G. (ed.). *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Willey & Sons Inc., New York, USA, pp. 45-465, 2002.
- CHIARINI, L., BEVIVINO, A., TABACCHIONI, S., DALMASTRI, C., **Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula**. *Soil Biol. Biochem.* 30, 81-87, 1998.
- CHO, K.M., HONG, S.Y., LEE, S.M., KIM, Y.H., KAHNG, G.G., LIM, Y.P., KIM, H. & YUN, H.D. **Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens**. *Microb. Ecol.* 54, 341-351, 2007.
- CHOI, J.H., IM, W.T., YOO, J.S., LEE, S.M., MOON, D.S., KIM, H.J., RHEE, S.K. & ROH, D.H. ***Paenibacillus donghaensis* sp. nov., a xylan-degrading and nitrogen-fixing bacterium isolated from East Sea sediment**. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 189-193, 2008.
- CHURCH, M.J., JENKINS, B.D., KARL, D.M. & ZEHR, J.P. **Vertical distributions of nitrogen-fixing phylotypes at Stn ALOHA in the oligotrophic North Pacific Ocean**. *Aquat. Microb. Ecol.* 38, 3-14, 2005a
- CHURCH, M.J., SHORT, C.M., JENKINS, B.D., KARL, D.M. & ZEHR, J.P. **Temporal patterns of nitrogenase gene (*nifH*) expression in the oligotrophic north pacific ocean**. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5362-5370, 2005b.
- COELHO, M.R.R., DA MOTA, F.F., CARNEIRO, N.P., MARRIEL, I.E., PAIVA, E., ROSADO, A.S. & SELDIN, L. **Diversity of *Paenibacillus* spp. In the rhizosphere of four sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars sown with two contrasting levels of nitrogen fertilizer assessed by *rpo*-based PCR-DGGE and sequencing analysis**. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 753-760, 2007.
- COELHO, M.R.R., VON DER WEID, I., ZAHNER, V. & SELDIN, L. **Characterization of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of part of genes encoding 16S DNA and 23S DNA and by multilocus enzyme electrophoresis**. *FEMS Microbiol. Lett.* 222, 243-250, 2003.
- COLLINS, M.D., LAWSON, P.A., WILLENS, A., CORDOBA, J.J., FERNANDEZ-GUARAYZABAL, J. GARCIA, P., CAI, J., HIPPE, H. & FARROW, J.A.E. **The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations**. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 812-826, 1994.
- DE FREITAS, J.R. & GERMIDA, J.J. **Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat**. *Can. J. Microbiol.* 36, 265-272, 1990.
- DE VOS, P. & TRUPER, H.G. **“Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology. IX th International (IUMS) Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Minutes of the meetings, 14, 15 and 18 August, 1999, Sydney, Australia.”** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 2239-2244, 2000.
- DESLIPPE, J.R. & EGGER, K.N. **Molecular diversity of *nifH* genes from bacteria associated with high arctic dwarf shrubs**. *Microb. Ecol.* 51, 516-525, 2006.
- DI CELLO, F., BEVIVINO, A., CHIARINI, L., FANI, R., PAFFETTI, D., TABACCHIONI, S. & DALMASTRI, C. **Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages**. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4485-4493, 1997.
- DIALLO, D.M., WILLEMS, A., VLOEMANS, N., COUSIN, S., VANDEKERCKHOVE, T. T., DE LAJUDIE, P., NEYRA, M., VYVERMAN, W., GILLIS, M. & VAN DER GUCHT, K. **Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N₂-fixing bacterial**

- diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal.** *Environ. Microbiol.* 6, 400-415, 2004.
- DIANESE, J.C., SANTOS, L.T.P. & FURLANETO, C. **New *Meliola* species on *Salacia rassifolia*.** *Fitopatol. Bras.* 19: 314, 1994.
- DIXON, R. & KAHN, D. **Genetic regulation of biological nitrogen fixation.** *Nature Rev.* 2, 621-631, 2004.
- DOBËREINER, J. & PEDROSA, F. **Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants.** Science Tech Publishers, Madison, Wisconsin, 1987.
- ELO, S., SUOMINEN, I., KAMPFER, P., JUHANOJA, J., SALKINOJA-SALONEN, M. & HAAHTELA, K. ***Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 535-545, 2001.
- ENKH-AMGALAN, J., KAWASAKI, H. & SEKI, T. ***NifH* and *NifD* sequences of heliobacteria: a new lineage in the nitrogenase phylogeny.** *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 73-79, 2005.
- FAGES, J. & ARSAC, J.F. **Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria.** *Plant Soil* 137, 87-90, 1991.
- FAGES, J. ***Azospirillum* inoculants and field experiments.** In: Okon, Y. (ed.), *Azospirillum-Plant associations.* CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 87-110, 1994.
- FEENEY, D.S., CRAWFORD, J.W., DANIELL, T., HALLET, P.D., NUNAN, N., RITZ, K., RIVERS, M. & YOUNG, M. **Three-dimensional microorganization of the soil-root-microbe system.** *Microb. Ecol.* 52, 151-158, 2006.
- FELSENSTEIN, J. **PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2).** *Cladistics* 5, 164-166, 1989.
- FORGATY, W.M. (ed). **Microbial enzymes and biotechnology.** Applied Science Publishers, Essex, England, 1983.
- FORTES, T.O., ALVIANO, D.S., TUPINAMBÁ, G., PADRÓN, T.S., ANTONIOLLI, A.R., ALVIANO, C.S. & SELDIN, L. **Production of an antimicrobial substance against *Cryptococcus neoformans* by *Paenibacillus brasiliensis* Sa3 isolated from the rhizosphere of *Kalanchoe brasiliensis*.** *Microbiol. Res.* 163, 200-207, 2008.
- GALLOWAY, J.N., TOWNSEND, A.R., ERISMAN, J.W., BEKUNDA, M., CAI, Z., FRENEY, J.R., MARTINELLI, L.A., SEITZINGER, S.P. & SUTTON, M.A. **Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions.** *Science* 320, 889-892, 2008.
- GARCIA DE SALAMONE, I., DÖBEREINER, J., URQUIAGA, S. & BODDEY, R. M. **Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype association as evaluated by ¹⁵N isotope dilution technique.** *Biol. Fertil. Soils* 23, 249-256, 1996.
- GIRVAN, M. S., BULLIMORE, J., PRETTY, J. N., OSBORN, A. M. & BALL, A. S. **Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils.** *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1800-1809, 2003.
- GLICK, B.R. **The enhancement of plant growth by free-living bacteria.** *Can. J. Microbiol.* 41, 109-117, 1995.
- GOUZOU, L., BURTIN, G., PHILIPPY, R., BARTOLI, F. & HEULIN, T. **Effect of inoculation with *Bacillus polymyxa* on soil aggregation in the wheat rhizosphere: preliminary examination.** *Geoderma* 56, 479-491, 1993.
- GRAY, E.J. & SMITH, D.L. **Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes.** *Soil Biol. Biochem.*, 37, 395-412, 2005.
- GRAY, N.D. & HEAD, I.M. **Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria.** *Environ. Microbiol.* 3: 481-492, 2001.
- GRIFFITHS, R.I., WHITELEY, A.S., O'DONNELL, A.G., BAILEY, M.J. **Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition.** *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5488-5491, 2000.
- GUTIERREZ-ZAMORA, M.L. & MARTINEZ-ROMERO, E. **Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.).** *J. Biotechnol.* 91, 117-126, 2001.
- HALL, T.A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98, 1999.
- HALSALL, D.M. & GIBSON, A.H. **Cellulose decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Cellulomonas gelida* and *Azospirillum* species or *Bacillus macerans*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1021-1026, 1985.
- HAMELIN, J., FROMIN, N., TARNAWSKI, S., TEYSSIER-CUVELLE, S. & ARAGNO, M. ***nifH* gene**

- diversity in the bacterial community associated with rhizosphere of *Molinia coerulea*, an oligonitrophilic perennial grass.** Environ. Microbiol. 8, 477-481, 2002.
- HAN, J., SUN, L., DONG, X., CAI, Z., SUN, X., YANG, H., WANG, Y. & SONG, W. **Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens.** Syst. Appl. Microbiol. 28, 66-76, 2005.
- HENNEKKE, H., KALUZA, K., THONY, B., FUHRMANN, M., LUDWIG, W. & STACKEBRANDT, E. 1985. Concurrent evolution of nitrogenase genes and 16S rRNA in *Rhizobium* species and other nitrogen-fixing bacteria. Arch. Microbiol. 142, 342-348.
- HÉRY, M., PHILIPPOT, L., MÉRIAUX, E., POLY, F., LE ROUX, X & NAVARRO, E. **Nickel mine spoils revegetation attempts: effect of pioneer plants on two functional bacterial communities involved in the N-cycle.** Environ. Microbiol. 7, 486-498, 2005.
- HEUER, H. & SMALLA, K. **Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities.** In: Modern Soil Microbiology (VAN ELSAS, J.D., WELLINGTON, E.M.H., TREVORS, J. eds.) pp. 353-373. Marcel Dekker, New York, 1997.
- HIROTA, Y., FUJI, T., SANO, Y. & IYAMA, S. **Nitrogen fixation in the rhizosphere of rice.** Nature (London) 276, 416-417, 1978.
- HOLL, F.B. & CHANWAY, C.P. **Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*.** Can. J. Microbiol. 30, 303-308, 1992.
- HOLL, F.B., CHANWAY, C.P., TURKINGTON, R. & RADLEY, R.A. **Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*.** Soil. Biol. Biochem. 20, 19-24, 1988.
- HUGENHOLTZ, P. & PACE, N.R. **Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach.** Trends Biotechnol. 14, 190-197, 1996.
- IZQUIERDO, J.A. & NÜSSLEIN, K. **Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments.** Microb. Ecol. 51, 441-452, 2006.
- JURAEVA, D., GEORGE, E., DAVRANOV, K. AND RUPPEL, S.. **Detection and quantification of the *nifH* gene in shoot and root of cucumber plants.** Can. J. Microbiol. 52: 731-739, 2006.
- JURGENSEN, M.F. & DAVEY, C.B. **Nonsymbiotic nitrogen-fixing microorganisms in forest and tundra soils.** Plant Soil 34, 341-356, 1971.
- KANUNGO, P.K., KAMAKRISHNAN, B. & RAO, V.R. **Placement effects of organic sources on nitrogenase activity and nitrogen-fixing bacteria in flooded rice soils.** Biol. Fertil. Soils. 25, 103-108, 1997.
- KENNEDY, A.C. & SMITH, K.L. **Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils.** Plant Soil 170, 75-86, 1995.
- KHAMMAS, K.M. & KAISER, P. **Pectin decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Azospirillum* and *Bacillus* species.** Can. J. Microbiol. 38, 794-797, 1992.
- KIM, K., ZHANG, Y.P., & ROBERTS, G.P. **Correlation of activity regulation and substrate recognition of the ADP-ribosyltransferase that regulates nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*.** J. Bacteriol. 181, 1698-1702, 1999.
- KLOPPER, J.W. & BEAUCHAMP, C.J. **A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria.** Can. J. Microbiol. 38, 1219-1232, 1992.
- KLOPPER, J.W. & SCHOTH, M.N. **Plant growth promoting rhizobacteria on radishes.** In: "Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria". P. 879-882. Angers, France, 1978.
- KLOPPER, J.W., SCHOTH, M.N. & MILLER, T. D. **Effects of rhizosphere colonization by plant-growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield.** Phytopathology 70, 1078-1082, 1980.
- KNAUTH, S., HUREK, T., BRAR, D. & REINHOLD-HUREK, B. **Influence of different *Oryza* cultivars on expression of *nifH* gene pools in roots of rice.** Environ. Microbiol. 7, 1725-1733, 2005.
- LEWIS, W. M.; SAUNDERS, J. F.; CRUMPAKER, D. W. & BRENDENCKE, C. M. **Eutrophication and land use, Lake Dillon, Colorado.** Ecological Studies, New York, v.46, p.202, 1984.
- LOGAN, N.A., HEYNDRICK, M., BERKELEY, R.C.W. & DE VOS, P. ***Paenibacillus azotofixans***

- (Seldin *et al.*, 1984) Ash *et al.* 1995 does not have priority over *Paenibacillus durum* (Smith & Cato, 1974) Collins *et al.* 1994: request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 325-326, 1998.
- LOVELL, C.R., FRIEZ, M.J., LONGSHORE, J.W. & BAGWELL, C.E. **Recovery and phylogenetic analysis of *nifH* from diazotrophic bacteria associated with dead aboveground biomass of *Spartina alterniflora*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5308-5314, 2001.
- LOVELL, C.R., PICENO, Y.M., QUATTRO, J.M. & BAGWELL, C.E. **Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3814-3822, 2000.
- LUGTENBERG, B.J.J., CHIN-A-WOENG, T.F.C. & BLOEMBERG, G.V. **Microbe-plant interactions: principles and mechanisms.** *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 373-383, 2002.
- LUGTENBERG, B.J.J., de WEGER, L.A. & BENNET, J.W. **Microbial stimulation of plant growth and protection from disease.** *Curr. Opin. Biotechnol.* 2, 457-464, 1991.
- LYNCH, S.M. **Beneficial interactions between microorganisms and roots.** *Biotechnol. Adv.* 8, 335-346, 1990.
- MA, Y., XIA, Z., LIU, X. & CHEN, S. ***Paenibacillus sabinae* sp. nov., a nitrogenfixing species isolated from the rhizosphere soils of shrubs.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 6-11, 2007a.
- MA, Y., ZHANG, J. & CHEN, S. ***Paenibacillus zanthoxyli* sp. nov., a novel nitrogenfixing species isolated from the rhizosphere of *Zanthoxylum simulans*.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 873-877, 2007b.
- MA, Y.C. & CHEN, S.F. ***Paenibacillus forsythiae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of *Forsythia mira*.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 319-323, 2008.
- MARGELEF, D.R. **Information theory in ecology.** *Gen. Syst.* 3, 36-71, 1958.
- MAVINGUI, P. & HEULIN, T. **In vitro chitinase antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane populations of *Bacillus polymyxa*.** *Soil Biol. Biochem.* 26, 801-803, 1994.
- MELO, I.S. & VALADARES, M.V.I. **Métodos de extração de DNA e sua aplicação em estudos genéticos e ecológicos.** *Em: Ecologia Microbiana* (Melo, I.S. & Azevedo, J.L. eds), pp.187-204. Embrapa, Brasil, 1998.
- MERGEL, A., SCHMITZ, O., MALLMANN, T., AND BOTHE, H. **Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil.** *FEMS Microbiol. Ecol.* 36, 33-42, 2001.
- MOHANTY, S.R., BODELIER, P.L., FLORIS, V. & CONRAD, R. **Differential effects of nitrogenous fertilizers on methane-consuming microbes in rice field and forest soils.** *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1364-1354, 2006.
- MONTEFUSCO A., NAKAMURA L.K. & LABEDA D.P. ***Bacillus peoriae* sp. nov.** *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 388-390, 1993.
- MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.A. **Os organismos do solo.** *Em: Microbiologia e bioquímica do solo.* (Moreira, F.M.S. & Siqueira, J.A. eds). Editora UFPA, Lavras, MG, Brasil, 2002.
- MOTA, F.F., GOMES, E. A., PAIVA, E. & SELDIN, L. **Assessment of the diversity of *Paenibacillus* species by a novel *rpoB*-based PCR-DGGE method.** *FEMS Microbiol. Ecol.* 52, 317-328, 2005.
- MOTA, F.F., NÓBREGA, A, MARRIEL, I.E., PAIVA, E. & SELDIN, L. **Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of four maize genotypes plantes in Cerrado soil.** *Appl. Soil. Ecol.* 20, 119-132, 2002.
- MUMFORD, K.G., MACGREGOS, J.F., DICKSON, S.E. & FRAPPA, R.H. **Multivariate analysis of ground water and soil data from a waste disposal site.** *Ground Water Monit. Rem.* 27, 92-102, 2007.
- MUYZER, G. & SMALLA, K. **Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology.** *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 127-141, 1998.
- MUYZER, G., BRINKHOFF, T., NÜBEL, U., SANTEGOEDS, C., SCHÄFER, H. & WAWER, C. **Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology.** *In: Molecular Microbial Ecology Manual* (Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D.; de Bruijn, F.J. eds). Section 3.4.4, pp.1-27. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1998.
- MUYZER, G., DE WAAL, E. C. & UITTERLINDEN, A G. **Profiling of complex microbial population by denature gradient gel eletrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.** *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700, 1993.
- MYERS R., FISCHER S., LERMAN L. & MANIATIS T. **Nearly all single base substitutions in DNA**

- fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 13, 3131-3145, 1985.
- NIETO, K.F. & FRANKENBERGER, W.T. **Biosynthesis of cytokinins by *Azotobacter chroococcum*.** *Soil Biol. Biochem.* 21, 967-972, 1989.
- O'DONNELL, A.G., SEASMAN, M., MACRAE, A., WAITE, I. & DAVIES, J.T. **Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils.** *Plant Soil.* 232, - 135-145, 2001.
- O'NEIL, G.A., CHANWAY, C.P., AXELROOD, P.E., RADLEY, R.A. & HOLL, F.B. **An assessment of spruce growth response specificity after inoculation with coexistent rhizosphere bacteria.** *Can. J. Bot.* 70, 2347-2353, 1992.
- O'SULLIVAN, D.J. & O'GARA, F. **Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens.** *Microbiol. Rev.* 56, 662-676, 1992.
- OGRAM, A., SAYLER, G.S. & BARKAY, T.J. **The extraction and purification of microbial DNA from sediments.** *J. Microbiol. Methods.* 7, 57-67, 1987.
- OHKUMA, M., NODA, S., USAMI, R., HORIKOSHI, K. & KUDO, T., **Diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic intestinal microflora of the termite *Reticulitermes speratus*.** *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2747-2752, 1996.
- OLIVEIRA, A.L.M., CANUTO, E.L., URQUIAGA, S., REIS, V.M. & BALDANI, J.I. **Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria.** *Plant Soil* 284, 23-32, 2006.
- PEOPLES, M. B. & CRASWELL, E. T. **Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture.** *Plant Soil* 141, 13-39, 1992.
- PETERSEN, D.J., SRINIVASAN, M. & CHANWAY, C.P. ***Bacillus polymyxa* stimulates increased *Rhizobium etli* populations and nodulation when co-resident in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris*.** *FEMS Microbiol. Lett.* 142, 271-276, 1996.
- PICENO, Y.M., LOVELL, C.R. **Stability in natural bacterial communities: I. Nutrient addition effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition.** *Microb. Ecol.* 39, 32-40, 2000.
- PICENO, Y.M., NOBLE, P.A. & LOVELL, C.R. **Spatial and temporal assessment of diazotroph assemblage composition in vegetated salt marsh sediments using denaturing gradient gel electrophoresis analysis.** *Microb. Ecol.* 38, 157-167, 1999.
- PILEOU, E.C. **Association tests versus homogeneity tests: Their use in subdividing quadrats into groups.** *Vegetation* 18, 4-18, 1969.
- POLY, F., MONROZIER, L.J. & BALLY, R. **Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil.** *Res. Microbiol.* 152, 95-103, 2001b.
- POLY, F., RANJARD, L. NAZARET, S., GOURBIÈRE, F. & MONROZIER, L.J. **Comparison of *nifH* gene pools in soil and soil microenvironments with contrasting properties.** *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2255-2262, 2001a.
- PRIEST, F.G.. **Systematics and ecology of *Bacillus*.** In: *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics. (eds) SONENSHEIN, A.L., HOCH, J.A. & LOSICK, R. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993
- REDING, H.K., HARTEL, P.G. & WIEGEL, J. **Effect of *Xanthobacter*, isolated and characterized from rice roots, on growth of wetland rice.** *Plant Soil* 131, 221-229, 1991.
- REED, M.L.E. & GLICK, B.R. **Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria.** *Antonie van Leeuwenhoek* 86, 1-25, 2004.
- REITER, B., BÜRGMANN, H., BURG, K. & SESSITSCH, A. **Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato.** *Can. J. Microbiol.* 49, 549-555, 2003.
- RODRIGUEZ-DIAZ, M., LEBBE, L., RODELAS, B., HEYRMAN, J., DE VOS, P. & LOGAN, N.A. ***Paenibacillus wynnii* sp. nov., a novel species harbouring the *nifH* gene, isolated from Alexander Island, Antarctica.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 2093-2099, 2005.
- ROESCH, L.F.W., CAMARGO, F.A.O., BENTO, F.M. & TRIPLETT, E.W. **Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize and stem of field-grown maize.** *Plant Soil* 302, 91-104, 2007.
- ROESCH, L.F.W., OLIVARES, F.L., PASSAGLIA, L.M.P., SELBACH, P.A., SACCOL DE SA, E.L., & OLIVERIA DE CAMARGO, F.A., **Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen supply.** *World J. Microbiol. Biotechnol.*

- 22, 967974, 2006.
- ROSADO, A. S. & DUARTE, G. F. **Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana.** *Em: Genética e melhoramento de microrganismos.* Mello, I.S., Valadares-Ingliš, M. C., Nass, L. L. & Valois, A. C. C. (ed). P. 97-128. Ed. USP, São Paulo, 2002.
- ROSADO, A.S. & SELDIN, L. **Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa*.** *World J. Microbial. Biotechnol.* 9, 521-528, 1993.
- ROSADO, A.S., AZEVEDO, F.S., CRUZ, D.W.G. & SELDIN, L. **Phenotypic and genetic diversity of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane or rhizosphere of different grasses.** *J. Appl. Microbiol.* 84, 216-226, 1998a.
- ROSADO, A.S., DUARTE, G.F., SELDIN, L. & VAN ELSAS, J. D. **Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments.** *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2770-2779, 1998b.
- ROSADO, A.S., DUARTE, G.F., SELDIN, L. & VAN ELSAS, J.D. **Molecular Microbial Ecology: a minireview.** *Rev. Microbiol.* 28: 135-147, 1997a.
- ROSADO, A.S., VAN ELSAS, J.D. & SELDIN, L. **Reclassification of *Paenibacillus durum* (formerly *Clostridium durum* Smith and Cato 1974) Collins *et al.* 1994 as a member of the species *P. azotofixans* (formerly *Bacillus azotofixans* Seldin *et al.* 1984) Ash *et al.* (1994).** *Int. J. Syst. Bacteriol* 47, 569-572, 1997b.
- ROUX, V. & RAOULT, D. ***Paenibacillus massiliensis* sp. nov., *Paenibacillus sanguinis* sp. nov. and *Paenibacillus timonensis* sp. nov., isolated from blood cultures.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1049-1054, 2004.
- RUAS, D.G.G., GARCIA, J.C. & TEIXEIRA, N.M. **Origem e importância do sorgo para o Brasil.** *Em: Circular técnica número 1, Recomendações técnicas para o cultivo do sorgo.* Pp.1-3, EMBRAPA, CNPMS, Sete Lagoas, Brasil, 1988.
- RUBIO, L.M. & LUDDEN, P.W. **Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle.** *J. Bacteriol.* 187, 405-414, 2005.
- SAIKI, R. K., GELFAUD, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. **Primer-detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science* 239, 487-494, 1988.
- SAINIA, V. K., BHANDARIB, S. C. & TARAFDAR, J. C. **Comparison of crop yield, soil microbial C, N and P, N-fixation, nodulation and mycorrhizal infection in inoculated and non-inoculated sorghum and chickpea crops.** *Field Crops Res.* 89, 39-47, 2004.
- SALLES, J.F., DE SOUZA, F.A. & VAN ELSAS, J.D. **Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples.** *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1595-1603, 2002.
- SCHLEIF R.F. & WENSINK P.C. **Practical methods in molecular biology.** Springer-Verlag, New York, 1981.
- SCHLOSS, P.D. & HANDELSMAN, J. **Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness.** *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1501-1506, 2005.
- SELDIN, L. & DUBNAU, D. **DNA homology among *Bacillus polymyxa*, *Bacillus azotofixans* and other nitrogen fixing *Bacillus* strains.** *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 151-154, 1985.
- SELDIN, L. & PENIDO, E. C. G. **Identification of *Bacillus azotofixans* using API tests.** *Antonie van Leeuwenhoek.* 52, 403-409, 1986.
- SELDIN, L., BASTOS, M. C. F. & PENIDO, E. G.C. **Identification of *Bacillus azotofixans* nitrogen fixation genes using heterologous *nif* probes.** *In: Nitrogen fixation with non-legumes.* F.A. Skinner *et al.* (eds) p. 179-187. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1989.
- SELDIN, L., ROSADO, A.S., CRUZ, D.W., NOBREGA, A., VAN ELSAS, J.D. & PAIVA, E. **Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils.** *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3860-3868, 1998.
- SELDIN, L., VAN ELSAS, J.D. & PENIDO, E.G.C.. ***Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from brazilian soils and grass roots.** *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 451-456, 1984.
- SELIM, S., NEGREL, J., GOVAERTS, C., GIANINAZZI, S. & VAN TUINEN, D. **Isolation and partial characterization of antagonistic peptides produced by *Paenibacillus* sp. strain B2**

- isolated from the sorghum mycorrhizosphere.** Appl. Environ. Microbiol. 71, 6501-6507, 2005.
- SHARMA, S., RADL, V., HAI, B., KLOOS, K., FUKA, M., ENGEL, M., SCHAUSS, K. & SCHLOTTER, M. **Quantification of functional genes from procaryotes in soil by PCR.** J. Microbiol. Methods. 68, 445-452, 2007.
- SHEFFIELD, V.C., COX, D.R. & MYERS, R.M. **Attachment of a 40bp G+C rich sequence (GC-Clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 232-236, 1989.
- SHIDA, O., TAKAGI, H., KADOWAKI, K., NAKAMURA, L. K. & KOMAGATA, K. **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*.** Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 289-298, 1997.
- SHISHIDO, M. & CHANWAY, C.P. **Colonization and growth of outplanted spruce seedlings pre-inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria in the greenhouse.** Can. J. For. Res. 30, 848-854, 2000.
- SHISHIDO, M., LOEB, B.M. & CHANWAY, C.P. **External and internal root colonization of lodgepole pine seedlings by two growth promoting *Bacillus* strains originated from different root microsites.** Can. J. Microbiol. 41, 703-713, 1995.
- SHORT, S. M. & ZEHR, J. P. **Quantitative analysis of *nifH* genes and transcripts from aquatic environments.** Methods Enzymol. 397, 380-394, 2005.
- SHORT, S.M., JENKINS, B.D. & ZEHR, J.P. **Spatial and temporal distribution of two diazotrophic bacteria in the Chesapeake Bay.** Appl. Environ. Microbiol. 70, 2186-2192, 2004.
- SILVA, K. R. A., SALLES, J. F., SELDIN, L. & VAN ELSAS, J. D. **Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere.** J. Microbiol. Methods. 54, 213-231, 2003.
- SIMONET, P., GROJEAN, M.C., MISRA, A.K., NAZARET, S., COURNOYER, B., AND NORMAND, P. ***Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction.** Appl. Environ. Microbiol. 57, 3278-3286, 1991.
- SIQUEIRA, J.A & FRANCO, A. A. (eds.) **Biotecnologia do solo, Fundamentos e Perspectivas.** FAEPE/ABEAS/MEC/ESAL, DF, Brasília, 1988.
- SMALLA, K., CRESWELL, L.C., MENDONÇA-HAGLER, L.C., WOLTERS, A. & VAN ELSAS, J.D. **Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification.** J. Appl. Bacteriol. 74, 78-85, 1993.
- SMITH, L.D.S. & CATO, E.P. ***Clostridium durum*, sp. nov., the predominant organism in a sediment core from the Black Sea.** Can. J. Microbiol. 20, 1393-1397, 1974.
- SPAINK, H.P., KONDOROSI, A. & HOOYKAAS, P.J.J. **The *Rhizobiaceae*: Molecular biology of model plant associate bacteria.** Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1998.
- TAN, Z., HUREK, T. & REINHOLD-HUREK, B. **Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in root of rice.** Environ. Microbiol. 5, 1009-1015, 2003.
- TANAKA, H., KYAW, K.M., TOYOTA, K., MOTOBAYASHI, T., **Influence of application of rice straw, farmyard manure, and municipal biowastes on nitrogen fixation, soil microbial biomass N, and mineral N in a model paddy microcosm.** Biol. Fertil. Soils 42, 501-505, 2006.
- TATE, R.L. **Nitrogen fixation.** In The Gateway to Soil Nitrogen Cycling. TATE, R.L. (ed.). John Wiley and Sons, pp. 283-306, 1995.
- TEIXEIRA, R.L.F., VON DE WEID, I., SELDIN, L & ROSADO, A.S. **Differential expression of *nifH* and *anfH* genes in *Paenibacillus durus* analysed by reverse transcriptase-PCR and denaturing gradient gel electrophoresis.** Lett. Appl. Microbiol. 46, 344-349, 2008.
- THOMPSON J.D., GIBSON T.J., PLEWNIAK F., JEANMOUGIN F. & HIGGINS D.G. **The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** Nucleic Acids Research 24, 4876-4882, 1997.
- TIMMUSK, S., GRANTCHAROVA, N. & WAGNER, E.G. ***Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms.** Appl. Environ. Microbiol. 71, 7292-7300, 2005.
- TOLJANDER, J.F., ARTURSSON, V., PAUL, L.R., JANSSON, J.K. & FINLAY, R.D. **Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species.** FEMS Microbiol. Lett. 254, 34-40, 2006.
- TRIPLETT, E.W. **Prokaryotic nitrogen fixation – a model system for the analysis of a biological**

- process.** Horizon Scientific Press, Norfolk, UK, 800pp. 2000.
- TRIPLETT, E.W., ROBERT, G.P., LUDDEN, P.W. & HANDELSMAN, J. **What's new in nitrogen fixation.** ASM News. 55, 15-21, 1989.
- TRUPER, H.G. ***Paenibacillus durus* (Collins et al. 1974, formerly *Clostridium durum*, Smith & Cato, 1974) has priority over *Paenibacillus azotofixans* (Seldin et al., 1984).** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 931, 2003.
- UEDA, T., SUGA, Y., YAHIRO, N. & MATSUGUCHI, T. **Genetic diversity of N₂-fixing bacteria associated with rice roots by molecular evolutionary analysis of a *nifD* library.** Can. J. Microbiol. 41, 235-240, 1995.
- VAN BERKUM, P. & BOHLOOL, B.B. **Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses.** Microbiol. Rev. 44, 491-517, 1980.
- VAN BERKUM, P. & SLOGER, C. **Interaction of combined nitrogen with the expression of root-associated nitrogenase-activity in grasses and with the development of N₂-fixation in soybean (*Glicine max* L. Merr.)** Plant Physiol. 72, 741-745, 1983.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A, BARDGETT, R.D. & VAN STRAALLEN, N.M. **The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems.** Ecol. Lett., 11, 296-310, 2008.
- VAN ELSAS, J.D. & HEIJNEN **Methods for the introduction of bacteria into soil: a review.** Biol Fertil. Soils. 10, 127-133, 1990.
- VAN ELSAS, J.D. & VAN OVERBEEK, L.S. **Bacterial responses to soil stimuli.** In: Starvation in bacteria. Kjellenberg, S. (ed) P.55-79. Plenum Press, N.Y., 1993.
- VAN VEEN, J.A., VAN OVERBEEK, L.S. & VAN ELSAS, J.D. **Fate and activity of microorganisms introduced into soil.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 121-135, 1997.
- VANDAMME, P., GORIS, J., CHEN, W., DE VOS, P. & WILLEMS, A. ***Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes.** Syst. Appl. Microbiol. 25, 507-512, 2002.
- VOLLÚ, R.E., FOGEL, R., SANTOS, S.C.C., MOTA, F.F. & SELDIN, L. **Evaluation of the diversity of cyclodextrin-producing *Paenibacillus graminis* strains by different molecular methods.** J. Microbiol. 44, 591-599, 2006.
- VOLLÚ, R.E., SANTOS, S.C.C. & SELDIN, L. **16S rDNA targeted PCR for the detection of *Paenibacillus macerans*.** Lett. Appl. Microbiol. 37, 415-420, 2003.
- VON DER WEID, I., ALVIANO, D.S., SANTOS, A.L.S., SOARES, R.M.A., ALVIANO, C.S. & SELDIN, L. **Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi.** J. Appl. Microbiol. 95, 1152-1160, 2003.
- VON DER WEID, I., ARTURSON, V., SELDIN, L & JANSSON, J K. **Antifungal and root surface colonization properties od GFP-tagged *Paenibacillus brasilensis* 177.** World J. Microbiol. & Biotechnol. 21, 1591-1597, 2005.
- VON DER WEID, I., DUARTE, G.F., VAN ELSAS, J.D. & SELDIN, L. ***Paenibacillus brasilensis* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 2147-2153, 2002.
- VON DER WEID, I., PAIVA, E., NOBREGA, A., VAN ELSAS, J.D. & SELDIN, L. **Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in Cerrado soil.** Res. Microbiol. 151, 369-381, 2000.
- WALLENSTEIN, M.D. & VILGALYS, R.J. **Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soils.** Pedobiologia 49, 665-672, 2005.
- WARTIAINEN, I., ERIKSSON, T., ZHENG, W. & RASMUSSEN, U. **Variation in the active diazotrophic community in rice paddy - *nifH* PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil.** Appl. Soil Ecol. 39, 65-75, 2008.
- WIDMER, F., SHAFFER, B. T., PORTEOUS, L. A. & SEIDLER, R. J. **Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at Douglas fir forest site in the Oregon cascade mountain range.** Appl. Environ. Microbiol. 65, 374-380, 1999.
- WISE, M.G., Mc ARTHUR, V., WHEAT, C. & SHIMKETS, L.J. **Temporal variation in genetic diversity and structure of a lotic population of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*.** Appl. Environ. Microbiol. 62, 1558-1562, 1996.
- XIE, C. & YOKOTA, A. **Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599^T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., *Azohydromonas***

- australiana* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 2419-2425, 2005.
- YANNI, Y.G., RIZK, R.Y., CORICH, V., SQUARTINI, A., NINKE, K., PHILIP-HOLLING, S., WORTH, S., ORGAMBIDE, G., DE BRUIJN, F., STOLTZFUS, J., BUCKLEY, D., SCHMIDT, T.M., MATEOS, P.F., LADHA, J.K. & DAZZO, F.B. **Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth.** Plant Soil 194, 99-114, 1997.
- YOON, J-H, YIM, D.K., LEE, J-S., SHINK, K-S., SATO, H.H., LEE, S.T., PARK, Y.K. & PARK, Y-H. ***Paenibacillus campinasensis* sp. nov., a cyclodextrin-producing isolated in Brazil.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 48, 833-837, 1998.
- YOSHIDA, T. & ARCANJAS, R.R. **The fixation of nitrogen in the rice rhizosphere.** Soil Biol. Biochem. 5, 153-155, 1973.
- YOUNG, J. P. W. **Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms**, p. 43-86. In: G. Stacey, R. H. Burris, and H.J. Evans (ed), Biological nitrogen fixation. Chapman and Hall, New York, N.Y., 1992.
- ZAADY, E. & PEREVOLTSKY, A. **Enhancement of growth and establishment of oak seedlings (*Quercus ithaburensis* Decaisne) by inoculation with *Azospirillum brasilense*.** For. Ecol. Manage. 72, 81-83, 1995.
- ZEHR, J. P., JENKINS, B. D., SHORT, S. M. & STEWARD, G. F. **Nitrogenase genes diversity and microbial community structure: a cross-system comparison.** Environ. Microbiol. 5 (7), 539-554, 2003.
- ZEHR, J.P. & MACREYNOLDS L.A., **Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine Cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*.** Appl. Environ. Microbiol. 55, 2526-2552, 1989.
- ZHANG, Y., LI, D., WANG, H., XIAO, Q. & LIU, X. **Molecular diversity of nitrogen-fixing bacteria from the Tibetan Plateau, China.** FEMS Microbiol. Lett. 260, 134-142, 2006.
- ZHAO, H., XIE, B & CHEN, S. **Cloning and sequencing of *nifBHDKENX* genes of *Paenibacillus massiliensis* T7 and its *nif* promoter analysis.** Sci. China C. Life Sci. 49, 115-122, 2006.

Trabalhos gerados durante o desenvolvimento desta tese

ANEXO I

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](#)