

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS A
PLANTAS DE MILHO CULTIVADAS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

Luiz Fernando Wurdig Roesch
(Tese de Doutorado)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS A
PLANTAS DE MILHO CULTIVADAS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

LUIZ FERNANDO WURDIG ROESCH
Engenheiro Agrônomo (UFRGS)
Mestre em Ciência do Solo (UFRGS)

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do
Grau de Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil
Fevereiro de 2007

Ao meu avô Arnaldo (*in memoriam*)

À minha esposa Ana Cláudia

À minha mãe Erica e às minhas irmãs Ana Cristina e Eliane

AGRADECIMENTOS

À Ana Cláudia pelo amor, paciência e dedicação.

À minha mãe e minhas irmãs pelo afeto e carinho.

Ao professor Flávio A. O. Camargo, pelo apoio incondicional, orientação, confiança e amizade.

Aos professores Enilson L. Saccol de Sá, Eric W. Triplett, Luciane Passaglia e Roberta R. Fulthorpe pelos ensinamentos e sugestões.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela oportunidade de realização do Doutorado.

Ao Departamento de Microbiologia e Ciência Celular da Universidade da Flórida pela utilização dos laboratórios.

Aos colegas de curso e amigos de laboratório pela amizade e acolhida.

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS A PLANTAS DE MILHO CULTIVADAS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL¹

Autor: Luiz Fernando Wurdig Roesch

Orientador: Flávio A. de Oliveira Camargo

Resumo

Bactérias diazotróficas podem promover o crescimento do milho por meio da fixação biológica do nitrogênio (FBN) ou pela produção de fitohormônios. Devido a tendência mundial de redução do uso de fertilizantes sintéticos na agricultura, existe um grande interesse em caracterizar a diversidade destes microrganismos para que seu potencial seja melhor explorado. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade bacteriana sob três aspectos: a) diversidade de bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho; b) diversidade total da comunidade microbiana do solo; c) comprovar o potencial das bactérias diazotróficas em promover o crescimento das plantas. A detecção da diversidade das bactérias diazotróficas, foi baseada na amplificação e no seqüenciamento do gene *nifH* isolado de amostras ambientais. Para a detecção da diversidade bacteriana total do solo, fragmentos do gene ribossomal do 16S foram amplificados e seqüenciados a partir do DNA bacteriano extraído diretamente do solo. Bactérias diazotróficas foram isoladas e testadas quanto a FBN e a produção de fitohormônios. As análises dos genes *nifH* indicaram que a associação das bactérias diazotróficas com plantas de milho pode sofrer influência do ambiente. O solo da rizosfera apresentou maior diversidade de bactérias diazotróficas em relação às raízes e ao colmo do milho. Com relação a riqueza das bactérias totais do solo, foram encontradas até 6.543 espécies bacterianas por grama de solo, sendo este valor muito menor do que supunha a literatura. Embora a diversidade das bactérias diazotróficas e das bactérias totais tenha sido elevada nas amostras utilizadas, detectou-se a presença de gêneros dominantes em todas as comunidades avaliadas. Os isolados bacterianos obtidos demonstraram possuir potencial para aumentar a produtividade das plantas e podem ser considerados como promissores para inoculação em plantas nas condições edafoclimáticas do Estado do Rio Grande do Sul.

¹ Tese de Doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brasil (143p.) – Fevereiro 2007. Trabalho realizado com apoio financeiro da CAPES e CNPq.

DIVERSITY OF DIAZOTROPHIC BACTERIA ASSOCIATED WITH MAIZE GROWN IN RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL¹

Author: Luiz Fernando Wurdig Roesch

Advisor: Flávio A. de Oliveira Camargo

ABSTRACT

Diazotrophic bacteria are capable of promoting the growth of maize by biological nitrogen fixation (BNF) or by plant hormone production. Since decreasing the use of synthetic fertilizers in agriculture is a worldwide necessity, there is a great interest in characterizing bacterial diversity to better explore their potential. The aim of this work was evaluate: a) the diazotrophic bacterial diversity associated with maize; b) The total bacterial diversity of soil; c) show the potential of diazotrophic bacterial as plant growth promoting To evaluate the diversity of nitrogen fixing bacteria in various ecosystems, universal primers were used to amplify the *nifH* gene by culture-independent means. The total bacterial diversity was assessed by amplification and sequencing of the 16S ribosomal gene using the DNA extracted from soil. Dizotrophic bacterium were isolated and tested for BNF and plant hormone production. The *nifH* gene analysis indicated that diazotrophic bacterial diversity can be environment controlled. The rhizosphere soil presented greater diazotrophic diversity than the roots and stem of maize. According to the analysis of the 16S gene fragments amplified from soil samples, it was found 6,543 bacterial species in one gram of soil which is smaller than supposed by the actual researches. Although diazotrophic bacterial diversity and the total bacterial diversity had been large in all samples used, we detected the presence of some dominant genera in all communities evaluated. The diazotrophic bacterial isolates shown to be able to increase plant growth in the Rio Grande do Sul climatic conditions.

¹ Doctoral thesis in Soil Science. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brasil (143p.) – February 2007. Research supported by CAPES and CNPq.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 01 |
| 2. CAPÍTULO I – BIODIVERSIDADE DAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS | 03 |
| 2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 04 |
| 2.1.2 Principais grupos bacterianos fixadores de nitrogênio | 05 |
| 2.1.3 Biodiversidade de bactérias diazotróficas do solo | 11 |
| 2.1.4 Biodiversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a gramíneas | 14 |
| 2.1.5 Biodiversidade de bactérias diazotróficas associadas ao milho | 19 |
| 2.2 CONCLUSÕES | 21 |
| 2.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 22 |
| 3. CAPÍTULO II – DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A PLANTAS DE MILHO EM DIFERENTES REGIÕES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL | 32 |
| 3.1 RESUMO | 33 |
| 3.2 INTRODUÇÃO | 34 |
| 3.3 MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| 3.3.1 Amostragem e preparação das amostras | 36 |
| 3.3.2 Extração do DNA microbiano | 39 |
| 3.3.3 Amplificação do gene <i>nifH</i> | 39 |
| 3.3.4 Análise do polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) | 40 |
| 3.3.5 Clonagem e seqüenciamento do gene <i>nifH</i> | 41 |
| 3.3.6 Análise de suficiência amostral, diversidade de espécies e | |

| | |
|--|-----------|
| filogenia | 41 |
| 3.3.7 Cálculo da diversidade genética | 43 |
| 3.3.8 Número de acesso das seqüências de nucleotídeos | 44 |
| 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 45 |
| 3.4.1 Análise de agrupamento baseada no polimorfismo dos fragmentos de restrição dos genes <i>nifH</i> | 46 |
| 3.4.2 Análise da suficiência amostral | 46 |
| 3.4.3 Diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas associadas ao milho | 49 |
| 3.4.4 Identificação das bactérias diazotróficas endofíticas associadas ao milho | 53 |
| 3.5 CONCLUSÕES | 58 |
| 3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 59 |
| 4. CAPÍTULO III – DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA INTERFACE SOLO-RAÍZ-COLMO DE PLANTAS DE MILHO | 66 |
| 4.1 RESUMO | 67 |
| 4.2 INTRODUÇÃO | 68 |
| 4.3 MATERIAL E MÉTODOS | 71 |
| 4.3.1 Amostragem e extração do DNA microbiano | 71 |
| 4.3.2 Amplificação do gene <i>nifH</i> | 72 |
| 4.3.3 Clonagem e seqüenciamento do gene <i>nifH</i> | 73 |
| 4.3.4 Análise de suficiência amostral, diversidade de espécies e filogenia | 73 |
| 4.3.5 Cálculo da diversidade genética | 75 |
| 4.3.6 Números de acesso das seqüências de nucleotídeos | 75 |
| 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 77 |
| 4.4.1 Análise da suficiência amostral | 77 |
| 4.4.2 Diversidade de espécies e estimativa da riqueza de espécies | 78 |
| 4.4.3 Comparação entre a diversidade genética das comunidades | 83 |
| 4.4.4 Classificação taxonômica | 83 |
| 4.5 CONCLUSÕES | 89 |
| 4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 90 |

| | |
|---|-----|
| 5. CAPÍTULO IV – SELEÇÃO DE <i>Azospirillum</i> spp EFICIENTES NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO E NA PRODUÇÃO DE AUXINAS | 95 |
| 5.1 RESUMO | 96 |
| 5.2 INTRODUÇÃO | 97 |
| 5.3 MATERIAL E MÉTODOS | 99 |
| 5.3.1 Amostragem e preparação das amostras | 99 |
| 5.3.2 Isolamento bacteriano | 100 |
| 5.3.3 Extração do DNA bacteriano, amplificação e seqüenciamento do gene <i>nifH</i> dos isolados | 101 |
| 5.3.4 Análise filogenética | 102 |
| 5.3.5 Produção de auxinas e fixação do nitrogênio <i>in vitro</i> | 103 |
| 5.3.6 Resistência a estreptomicina | 104 |
| 5.3.7 Análise estatística | 104 |
| 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 105 |
| 5.5 CONCLUSÕES | 112 |
| 5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 113 |
| 6. CAPÍTULO V – SISTEMA INTEGRADO DE SEQÜENCIAMENTO GENÔMICO BASEADO EM PIROSEQÜENCIAMENTO APLICADO A AVALIAÇÃO DA BIODIVERSIDADE BACTERIANA TOTAL DO SOLO | 117 |
| 6.1 RESUMO | 118 |
| 6.2 INTRODUÇÃO | 119 |
| 6.3 MATERIAL E MÉTODOS | 122 |
| 6.3.1 Locais de estudo e amostragem do solo | 122 |
| 6.3.2 Seleção dos oligonucleotídeos iniciadores, amplificação e seqüenciamento do DNA | 123 |
| 6.3.3 Determinação das unidades taxonômicas e estimativas de riqueza e diversidade de espécies | 126 |
| 6.3.4 Probabilidade da descoberta de novas unidades taxonômicas e análise da suficiência amostral | 127 |
| 6.3.5 Classificação taxonômica | 127 |
| 6.3.6 Diversidade de bactérias diazotróficas cultiváveis | 128 |
| 6.3.7 Números de acesso das seqüências de nucleotídeos | 128 |

| | |
|---|-----|
| 6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 129 |
| 6.4.1 Riqueza e biodiversidade de bactérias no solo | 131 |
| 6.4.2 Classificação taxonômica | 134 |
| 6.4.3 Diversidade de bactérias diazotróficas cultiváveis presentes no solo | 137 |
| 6.5 CONCLUSÕES | 141 |
| 6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 142 |
| 7. CONCLUSÕES GERAIS | 146 |

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

CAPÍTULO I

| | | |
|------------------|---|----|
| TABELA 1. | Filos atualmente reconhecidos do domínio Bactéria classificados com base no seqüenciamento do gene do RNA ribossomal 16S de organismos cultivados e não cultivados (candidatos a filo) | 07 |
| TABELA 2. | Índices de riqueza de espécies calculados com base em 3.250 seqüências de nucleotídeos do gene <i>nifH</i> extraídas e amplificadas de bactérias isoladas do solo ou do DNA bacteriano extraído diretamente do solo | 14 |
| TABELA 3. | Principais gêneros bacterianos endofíticos associados a plantas não leguminosas | 18 |

CAPÍTULO II

| | | |
|------------------|---|----|
| TABELA 1. | Características do solo das 30 amostras coletadas em cinco diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul ... | 38 |
| TABELA 2. | Índices de diversidade genética e de espécies entre as comunidades de duas diferentes regiões climáticas do Estado do Rio Grande do Sul | 50 |

CAPÍTULO III

| | | |
|------------------|---|----|
| TABELA 1. | Localização das amostras de solo rizosférico, raízes e colmo de milho coletadas em seis lavouras do Estado do Rio Grande do Sul | 72 |
|------------------|---|----|

| | | |
|------------------|---|----|
| TABELA 2. | Índice de diversidade de Shannon-Weaver e índice de riqueza de espécies Chao1 calculados com base no número e na frequência das seqüências do gene <i>nifH</i> amplificadas de amostras de solo rizosférico, raízes e colmo de plantas de milho cultivadas em seis diferentes lavouras do Estado do Rio Grande do Sul | 81 |
|------------------|---|----|

CAPÍTULO IV

| | | |
|------------------|--|-----|
| TABELA 1. | Localização, propriedades químicas dos solos utilizados na amostragem e número de isolados obtidos | 106 |
| TABELA 2. | Produção de ácido indol acético (AIA), fixação biológica do nitrogênio e resistência a estreptomicina das 30 bactérias diazotróficas mais promissoras isoladas do solo rizosférico, raízes e colmo de plantas de milho | 108 |

CAPÍTULO V

| | | |
|------------------|---|-----|
| TABELA 1. | Local de amostragem, classificação e tipo de vegetação dos solos amostrados | 122 |
| TABELA 2. | Número de seqüências amostradas, unidades taxonômicas (UTs) observadas, riqueza de espécies e índices de diversidade de espécies calculados para quatro diferentes critérios de agrupamento entre as seqüências do gene 16S extraído de bactérias dos solos do Brasil, Canadá, Florida e Illinois | 130 |
| TABELA 3. | Análise de suficiência amostral, probabilidade de descoberta de uma nova unidade taxonômica ($\frac{1}{p_i q_i^n}$) e número de seqüências necessárias para a observação de uma nova unidade taxonômica ($1/\frac{1}{p_i q_i^n}$). Resultados obtidos utilizando a distribuição de frequências das unidades amostrais agrupadas com 99% de similaridade ... | 133 |
| TABELA 4. | Diversidade de gêneros bacterianos cultiváveis fixadores de nitrogênio detectados pela análise do gene ribossomal do 16S amplificado a partir do DNA microbiano extraído dos solos do Brasil, Canadá, Florida e Illinois | 138 |

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO I

- FIGURA 1.** Representação esquemática da árvore filogenética dos principais filos bacterianos existentes, baseada na comparação de seqüências do gene do RNA ribossomal 16S. Caixas preenchidas em cinza representam filos que contém pelo menos uma espécie microbiana fixadora de nitrogênio. (adaptado de Madigan et al., 1997) 09

CAPÍTULO II

- FIGURA 1.** Mapa do Estado do Rio Grande do Sul mostrando as diferenças climáticas e as cinco regiões amostradas. Os números indicam os 30 locais de amostragem das plantas de milho utilizadas neste trabalho. As medidas de temperatura média máxima e precipitação anual foram obtidas junto ao oitavo distrito da Rede Regional Meteorológica do Rio Grande do Sul (Instituto de Meteorologia / Ministério da Agricultura). Os valores apresentados representam a média acumulativa dos últimos 30 anos de informação 37
- FIGURA 2.** Dendrograma mostrando a análise de agrupamento baseada no polimorfismo dos fragmentos de restrição dos genes *nifH* amplificados a partir do DNA bacteriano extraído do colmo de milho cultivado em diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul após análise de agrupamento baseada na presença/ausência dos fragmentos de restrição 47

| | | |
|------------------|--|----|
| FIGURA 3. | Curvas de extinção calculadas pelo programa DOTUR usando 97% de similaridade para o agrupamento das seqüências do gene <i>nifH</i> de 10 amostras coletadas nas regiões II e V do Estado do Rio Grande do Sul (C = representatividade da amostragem) | 48 |
| FIGURA 4. | Dendrograma mostrando a relação entre os valores de F_{ST} das comunidades de bactérias diazotróficas endofíticas de diferentes regiões climáticas do Estado do Rio Grande do Sul. Os valores de F_{ST} foram significativamente diferentes ao nível de 0,05 usando 1.000 permutações | 52 |
| FIGURA 5. | Árvore filogenética das seqüências representativas do gene <i>nifH</i> amplificadas a partir do DNA de bactérias endofíticas extraído do colmo de plantas de milho cultivado em diferentes regiões climáticas do Estado do Rio Grande do Sul e seqüências de referência do gene <i>nifH</i> de bactérias cultivadas removidas do Banco de Genes. Filogenia inferida usando o algoritmo do vizinho mais próximo. Árvore consenso gerada pelo programa Splits Tree 4 (Huson & Bryant, 2006). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos | 55 |

CAPÍTULO III

| | | |
|------------------|--|----|
| FIGURA 1. | Curvas de extinção calculadas pelo programa DOTUR usando 97% de similaridade para o agrupamento das seqüências do gene <i>nifH</i> de 18 amostras de solo rizosférico, raízes e colmo de plantas de milho coletadas em seis diferentes lavouras do Estado do Rio Grande do Sul (CB = Carlos Barbosa, CO = Colorado, PM = Palmeiras das Missões, B = Bagé, CG = Canguçu, CA = Candelária).. | 80 |
| FIGURA 2. | Varição genética total das comunidades de bactérias diazotróficas associadas ao solo rizosférico, raízes e colmo de milho coletado em seis diferentes lavouras do Estado do Rio Grande do Sul. A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. (CB = Carlos Barbosa, CO = Colorado, PM = Palmeiras das Missões, B | |

| | | |
|------------------|--|----|
| | = Bagé, CG = Canguçu, CA = Candelária)..... | 84 |
| FIGURA 3. | Proporção das classes de bactérias diazotróficas detectadas pela análise comparativa das seqüências do gene <i>nifH</i> amplificadas a partir do DNA microbiano extraído de amostras de solo rizosférico, raízes e colmo de milho e seqüências do mesmo gene depositadas no banco de genes do NCBI | 86 |
| FIGURA 4. | Gêneros mais abundantes associados ao solo rizosférico, raízes e colmo de plantas de milho classificados de acordo com as seqüências do gene <i>nifH</i> mais similares disponíveis no Banco de Genes do NCBI. A fração dos gêneros classificados como “outros” foi representada pelo somatório das seqüências que ocorreram em porcentagens inferiores a 5% | 88 |

CAPÍTULO IV

| | | |
|------------------|--|-----|
| FIGURA 1. | Mapa do Estado do Rio Grande do Sul mostrando as diferenças climáticas e as cinco regiões amostradas. Os números indicam os 30 locais de amostragem das plantas de milho utilizadas neste trabalho. As medidas de temperatura média máxima e precipitação anual foram obtidas junto ao oitavo distrito da Rede Regional Meteorológica do Rio Grande do Sul (Instituto de Meteorologia / Ministério da Agricultura). Os valores apresentados representam a média acumulativa dos últimos 30 anos de informação | 100 |
| FIGURA 2. | Árvore filogenética mostrando a relação entre os genes <i>nifH</i> amplificadas e seqüenciadas de bactérias diazotróficas isoladas do solo rizosférico, raízes e colmo de plantas de milho e genes <i>nifH</i> de referência de bactérias diazotróficas identificadas extraídos do Banco de Genes. Filogenia inferida usando o algoritmo do vizinho mais próximo e árvore consenso gerada pelo programa Splits Tree 4 (Huson & Bryant, 2006). Números localizados nos ramos da árvore indicam a porcentagem de 1.000 reamostragens bootstrap. A escala representa o número | |

| | |
|--|-----|
| de mutações por posição dos nucleotídeos | 111 |
|--|-----|

CAPÍTULO V

| | |
|--|-----|
| FIGURA 1. Curvas de rarefação calculadas pelo programa DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005) para seqüências do gene ribossomal 16S amplificado de amostras de solos do Brasil, Canadá, Florida e Illinois | 132 |
| FIGURA 2. Abundância relativa dos filis bacterianos detectados nos solos do Brasil, Canadá, Florida e Illinois | 136 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

Embora tenham sido feitos avanços significativos no entendimento da diversidade dos microrganismos, a utilização de características fenotípicas e fisiológicas tem sido limitante para a identificação de novos isolados bacterianos. Somente com a aplicação de ferramentas da biologia molecular foi possível a detecção de uma extensiva diversidade microbiana que não havia sido observada anteriormente por meio do uso de técnicas de isolamento em meio de cultura e identificação morfológica de isolados. A partir de então passou a existir um consenso entre ecologistas de que a chave para prever a diversidade microbiana é evitar o isolamento focalizando os estudos no DNA microbiano. Esse consenso emerge do conceito de que seqüências de DNA podem ser usadas na identificação de microrganismos. De forma geral tais técnicas baseiam-se no isolamento do DNA microbiano a partir de uma amostra ambiental e na amplificação de genes marcadores que são posteriormente comparados entre si e utilizados para a descrição da filogenia dos microrganismos cujo DNA foi isolado.

No século XXI o desafio aos ecologistas microbianos passou a ser a identificação do maior número possível de seqüências de nucleotídeos para que o diagnóstico da diversidade reflita o real número e a abundância de espécies bacterianas presentes no ambiente. Na agricultura, existe um particular interesse na detecção da diversidade de bactérias que desempenham funções específicas no solo ou que vivem em associação com plantas como as bactérias diazotróficas. Este interesse deve-se ao fato de que as bactérias diazotróficas podem promover o crescimento das plantas por meio da fixação biológica do nitrogênio ou pela produção de fitohormônios reguladores do crescimento de plantas. A exploração deste grupo microbiano

em processos agrícolas poderia representar uma alternativa ao uso de fertilizantes sintéticos.

Tendo em vista o grande interesse em caracterizar a diversidade microbiana para a melhor exploração de seu potencial na agricultura, o presente trabalho teve como objetivos gerais: a) avaliar a diversidade de bactérias diazotróficas associadas ao solo rizosférico e as plantas de milho cultivadas em regiões agroecológicas do Estado do Rio Grande do Sul; b) avaliar a diversidade das bactérias totais em diferentes tipos de solo; c) isolar e identificar bactérias diazotróficas naturalmente associadas ao milho com elevado potencial em promover a crescimento das plantas.

CAPÍTULO I

BIODIVERSIDADE DAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A biodiversidade dos organismos procarióticos tem sido fonte de estudos e debates entre microbiologistas nas últimas décadas. Comunidades microbianas são importantes para grande parte dos ciclos biogeoquímicos do planeta. Muitos microrganismos são utilizados em processos industriais, na saúde humana, uma vez que tais comunidades representam um reservatório de biodiversidade para a síntese de novas drogas, e na agricultura. Entre as comunidades microbianas de importância agrícola, destacam-se aquelas que apresentam a habilidade em converter o nitrogênio gasoso a formas de nitrogênio acessíveis aos demais organismos, coletivamente chamados de diazotróficos.

Grande parte do nitrogênio fixado presente nos ecossistemas terrestres e aquáticos é originado da fixação biológica do nitrogênio. Nos solos agrícolas, a exceção das adições antropogênicas, as comunidades diazotróficas são a principal fonte de nitrogênio. A exploração da fixação biológica do nitrogênio oferece uma fonte não poluente de nitrogênio podendo aumentar a produção e diminuir o uso global de fertilizantes sintéticos. Em adição, bactérias diazotróficas podem diminuir a emissão do gás de efeito estufa N_2O , assim como reduzir a lixiviação de NO_3^- , devido à diminuição da utilização de fertilizantes nitrogenados, evitando possíveis contaminações de águas subsuperficiais (Kennedy et al., 2004). Neste sentido, estimativas da diversidade e da riqueza dos microrganismos presentes no ambiente são de central importância, pois servem de conhecimento básico da função e do papel das comunidades bacterianas (Hughes et al., 2001). Por meio de tais estimativas pode ser possível obter importantes informações a respeito do

manejo adequado do solo e sobre a adequada exploração da biodiversidade de sistemas agrícolas.

Embora tenham sido feitos avanços significativos no entendimento da diversidade dos diazotróficos, um diagnóstico completo da comunidade fixadora de nitrogênio que habita o solo e/ou vive em associação com gramíneas ainda não foi realizado. Muitos estudos sobre a comunidade fixadora de nitrogênio são baseados no cultivo e subsequente caracterização dos isolados. Entretanto, técnicas clássicas de cultivo de microrganismos fornecem apenas informações limitadas sobre a diversidade de diazotróficos já que muitos destes organismos não são facilmente cultivados por meio de tais técnicas de isolamento (Pace et al., 1997). Atualmente existe um consenso entre ecologistas microbianos de que a chave para prever a diversidade microbiana é evitar o isolamento, focalizando estudos no DNA microbiano (Curtis & Sloan, 2005).

De acordo com Hughes et al. (2001), investigações sobre a comunidade bacteriana requerem um grande número de amostras para que seja refletida a “real” diversidade da comunidade em estudo. Estimativas precisas requerem amostragens de aproximadamente 80%, as quais podem ser impraticáveis devido ao elevado número de microrganismos presentes no ambiente (Gans et al., 2005). Entretanto, a análise de um grupo específico de bactérias, tais como bactérias fixadoras de nitrogênio, pode ser consideravelmente facilitada em face da restrição do número de espécies capazes de fixar nitrogênio.

2.1.2 Principais grupos bacterianos fixadores de nitrogênio

Biodiversidade refere-se tanto ao número (riqueza) de diferentes categorias biológicas (ou unidades taxonômicas) quanto à abundância relativa (equitabilidade) dessas categorias. A biodiversidade inclui, assim, a totalidade dos recursos vivos, ou biológicos, e dos recursos genéticos, e seus componentes. O primeiro passo para o entendimento completo da biodiversidade das comunidades bacterianas é a identificação e classificação taxonômica das distintas populações microbianas. Entretanto, a taxonomia dos

organismos procarióticos tem passado por muitas mudanças nos últimos anos devido aos rápidos avanços na tecnologia de seqüenciamento do DNA.

Análises das seqüências de regiões altamente conservadas do genoma bacteriano tal como a subunidade do gene do RNA ribossomal 16S tem sido utilizada como um método universal para classificação microbiana bem como para estabelecer relações evolucionárias entre organismos. Nesta análise, chamada de matriz de distâncias, pares de seqüências de diferentes organismos são alinhados, e as diferenças na posição dos nucleotídeos são contadas. O número de diferenças é considerado como uma medida de distância evolucionária. Embora não seja universalmente aceito, a medida de distância evolucionária baseada na análise comparativa do gene do RNA ribossomal 16S tem sido usada para a comparação entre procariontes. Seqüências que apresentam similaridade igual ou superior a 97% entre si são consideradas como pertencentes à mesma espécie a qual representa a unidade taxonômica básica em microbiologia. De acordo com a atual classificação proposta pelo Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology (Garrity et al., 2005) grupos de espécies são classificados em gêneros, gêneros em famílias, famílias em ordens, ordens em classes, classes em filos e finalmente, filos em domínio o qual representa o mais alto nível taxonômico.

Com base no seqüenciamento do gene do RNA ribossomal 16S de bactérias cultivadas, são reconhecidos atualmente 6.466 espécies que estão distribuídas em 26 filos, 41 classes, 88 ordens, 240 famílias e 1.194 gêneros (Garrity et al., 2005). Entretanto, se forem considerados aqueles organismos que ainda não foram cultivados, mas que podem ser identificados por meio de técnicas de biologia molecular, pode-se detectar até 52 filos bacterianos. Destes, 50% é composto por representantes não cultivados ou também conhecidos como candidatos a filo (Rappé & Giovannoni, 2003). O termo candidato a filo foi definido por Hugenholtz et al. (1998) como uma linhagem de afiliação indefinida em múltiplas análises tendo <85% de identidade com seqüências de organismos pertencentes a filos conhecidos indicando seu potencial de representar um novo filo. Os atuais filos bacterianos com representantes cultivados e não cultivados podem ser observados na Tabela 1.

TABELA 1. Filos atualmente reconhecidos do domínio Bactéria classificados com base no seqüenciamento do gene do RNA ribossomal 16S de organismos cultivados e não cultivados (candidatos a filo). (adaptado de Rappé & Giovannoni, 2003).

| Organismos cultivados | Organismos não cultivados |
|------------------------------|----------------------------------|
| <i>Acidobacteria</i> | ABY1 |
| <i>Actinobacteria</i> | BD1-5 group |
| <i>Aquificae</i> | BRC1 |
| <i>Bacteroidetes</i> | Guaymas 1 |
| <i>Caldithrix</i> | Marine Group A |
| <i>Chlamydiae</i> | NC10 |
| <i>Chlorobi</i> | NKB19 |
| <i>Chloroflexi</i> | OP1 |
| <i>Coprothermobacter</i> | OP3 |
| <i>Cyanobacteria</i> | OP5 |
| <i>Deferribacteres</i> | OP8 |
| <i>Deinococcus-Thermus</i> | OP9 |
| <i>Desulfurobacterium</i> | OP10 |
| <i>Dictyoglomi</i> | OP11 |
| <i>Fibrobacteres</i> | OS-K |
| <i>Firmicutes</i> | SBR1093 |
| <i>Fusobacteria</i> | SC3 |
| <i>Gemmatimonadetes</i> | SC4 |
| <i>Nitrospirae</i> | Termite Group 1 |
| <i>Planctomycetes</i> | TM6 |
| <i>Proteobacteria</i> | TM7 |
| <i>Spirochaetes</i> | VadinBE97 |
| <i>Synergistes</i> | WS2 |
| <i>Thermodesulfobacteria</i> | WS3 |
| <i>Thermotogae</i> | WS5 |
| <i>Verrucomicrobia</i> | WS6 |

Grande parte da informação genética utilizada para a classificação dos atuais filos bacterianos está armazenada e mantida pelo RDP II (Ribosomal Database Project) e encontra-se disponível ao público através do website: <https://rdp.cme.msu.edu>. Até dezembro de 2006 foram publicadas 5.236 seqüências do gene RNA ribossomal 16S de bactérias cultiváveis agrupadas de acordo com os critérios taxonômicos propostos pelo *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Garrity, 2005). Os filos que apresentam a maior abundância de seqüências, cerca de 89%, são: *Proteobacteria* (1.935), *Firmicutes* (1.419) e *Actinobacteria* (1.344). A predominância de organismos pertencentes a estes três filos pode ser devido à facilidade de cultivo dos mesmos ou devido ao sucesso no estabelecimento, competição, crescimento e desenvolvimento nos ecossistemas amostrados. Com relação aos organismos não cultivados, foram publicados cerca de 177.743, o que representa cerca de 97% do atual banco de dados.

Entre os principais filos representativos de bactérias cultiváveis reconhecidos atualmente, é possível detectar pelo menos seis filos que contém espécies bacterianas capazes que fixar nitrogênio atmosférico isoladas de amostras de solo, plantas, água salgada, água doce e até mesmo do intestino de algumas térmitas. (Figura 1).

Usualmente, a identificação de bactérias diazotróficas é baseada no isolamento de genes responsáveis pela síntese da enzima nitrogenase, responsável pela catálise da reação que transforma o nitrogênio atmosférico em amônia, ou pela medição da atividade da nitrogenase usando a técnica da redução do acetileno. Genes homólogos ao gene *nifH* já foram detectados em bactérias pertencentes ao filo *Spirochaetes* (Lilburn et al., 2001). Tais organismos foram isolados do intestino de térmitas e de sedimentos de água doce. Posteriormente, a fixação do nitrogênio por *Spirochaetes* foi comprovada pela quantificação da atividade da nitrogenase.

O gene *nifH* também já foi isolado de bactérias pertencentes ao filo *Chlorobi* em organismos do gênero *Chlorobium* e *Pelodictyon* (Zehr, 2003; Raymond et al., 2004). Estes organismos são em sua maioria fototróficos, vivem em ambientes anaeróbios e geralmente não são móveis (penas uma espécie apresenta flagelo).

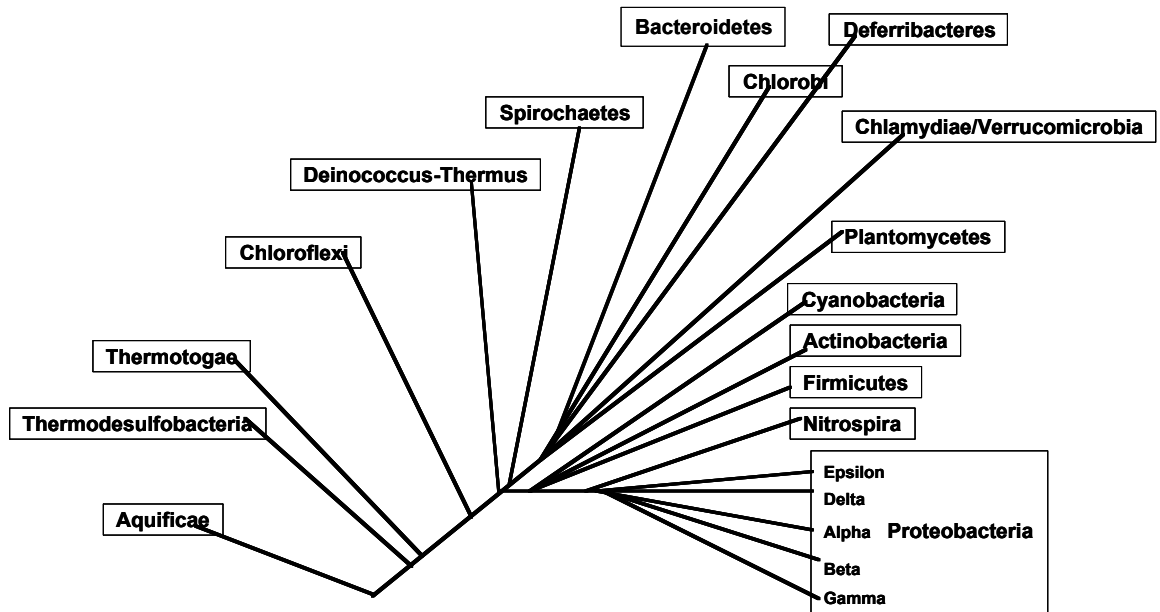


FIGURA 1. Representação esquemática da árvore filogenética dos principais filos bacterianos existentes, baseada na comparação de seqüências do gene do RNA ribossomal 16S. Caixas preenchidas em cinza representam filos que contém pelo menos uma espécie microbiana fixadora de nitrogênio. (adaptado de Madigan et al., 1997).

Com relação ao filo *Cyanobacteria*, já foram detectados organismos diazotróficos em bactérias pertencentes às classes *Nostocales* (Zehr, 2003; Raymond et al., 2004; Bhargava et al., 2006), *Stigonematales* (Zehr, 2003; Houle et al., 2006), *Chroococcales* (Zehr, 2003; Raymond et al., 2004; Steunou et al., 2006), *Oscillatoriales* (Zehr, 2003; Mulholland et al., 2006; Rabouille et al., 2006), e *Pleurocapsales* (De Chazal et al., 1992). As Cianobacterias podem ser encontradas tanto em água doce, em água salgada ou no solo. Apresentam um metabolismo aeróbio e são fototróficas. De forma geral a fixação biológica do nitrogênio ocorre naquelas espécies capazes de formar heterocistos onde a enzima nitrogenase pode ser encontrada.

Para o filo *Actinobacteria* foram detectadas bactérias diazotróficas nas classes *Frankia* (Zehr, 2003; Vessey et al., 2005) e *Actinobacteria* (Favilli & Messini, 1990; Valdés et al., 2005; Giri & Pati, 2004). O gênero *Frankia* é bastante conhecido e é composto por bactérias filamentosas fixadoras de

nitrogênio capazes de formar nódulos e viver em simbiose com plantas principalmente arbóreas. Na classe das *Actinobacterias* os principais organismos representantes, fixadores de nitrogênio, são *Corynebacterium* sp. *Flavobacterium* sp.

No filo *Firmicutes* foram detectadas bactérias diazotróficas pertencentes às classes *Bacilli* (Zehr, 2003; Ding et al., 2005) e *Clostridia* (Zehr, 2003; Raymond et al., 2004; Miyamoto et al., 2004). Bactérias da classe *Bacilli* são microrganismos aeróbios obrigatórios ou facultativos e a maioria dos diazotróficos isolados dessa classe foram isolados de amostras de solo. Ao passo que a classe *Clostridia* é composta por organismos anaeróbios. O representante diazotrófico mais bem estudado é o *Clostridium pasteurinum* o qual é provavelmente responsável pela maior parte do nitrogênio fixado no solo em condições de anaerobiose.

Com relação ao filo *Nitrospirae*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* e *Leptospirillum ferrodiazotrophum* são os únicos representantes acidofílicos capazes de fixar nitrogênio gasoso (Tyson et al., 2005). Ambas espécies foram isoladas de ambientes de baixo pH (pH = 1) principalmente em regiões de mineração.

Por fim, também se pode verificar a presença de bactérias diazotróficas no filo das Proteobacterias (Zehr, 2003; Raymond et al., 2004). Este filo é um dos mais bem estudados e apresenta o maior número de representantes capazes de fixar nitrogênio atmosférico sendo que apresenta pelo menos um representante em cada uma de suas cinco classes (*Alpha*, *Delta*, *Beta*, *Epsilon* e *Gamma*). Proteobacterias fixadoras de nitrogênio já foram detectadas principalmente em associação com gramíneas, simbiose com leguminosas e em vida livre no solo.

A análise filogenética de cada um dos genes componentes da nitrogenase e seus homólogos conhecidos indicam que esta enzima sofreu segregação em distintos grupos conforme sumarizado na representação esquemática da Figura 1. Esses grupos foram designados como: (a) nitrogenases que contém Mo-Fe e cujos membros são tipicamente encontrados nos filios *Proteobacteria* e *Cyanobacteria*; (b) nitrogenases que contém Mo-Fe e cujos membros são estritamente anaeróbicos, incluindo *Clostridia*, bactérias acetogênicas e metanogênicas; (c) nitrogenases alternativas não dependentes

de Mo incluindo os genes *anf* e *vnf*; (d) genes *nif* homólogos não caracterizados detectados apenas em bactérias metanogênicas e em algumas bactérias fotossintéticas anoxigênicas; (e) genes da biossíntese de clorofila II e bacterioclorofila comum em todos os microrganismos fototróficos.

2.1.3 Biodiversidade de bactérias diazotróficas do solo

A extração de DNA e amplificação de genes marcadores é uma técnica que tem sido largamente utilizada para a detecção da biodiversidade de bactérias diazotróficas. O gene *nifH* é o gene marcador mais utilizado para este propósito. Este gene está presente na maioria dos sistemas biológicos fixadores de nitrogênio e tem sido reportado que a construção filogenética baseada nesse gene é consistente com a filogenia baseada no gene do RNA ribossomal 16S (Young, 1992). Além disso, o banco de dados dos genes que codificam a enzima nitrogenase vem crescendo nos últimos anos tornando-se um dos maiores bancos de dados não ribossomais de organismos não cultivados (Zehr et al., 2003).

Análises da diversidade de bactérias diazotróficas do solo, baseadas na clonagem e no seqüenciamento de genes *nifH*, têm obtido estimativas bastante variáveis. Izquierdo & Nüsslein (2006) utilizando seqüências do gene *nifH* para estimar a riqueza de espécies de bactérias diazotróficas no solo detectaram cerca de 20 a 21 espécies em um solo de floresta tropical, 20 espécies em um solo da região da Tundra Ártica e de 11 a 12 espécies em um solo sob pastagem cultivada em clima temperado. Para este levantamento, foram utilizadas cerca de 200 seqüências do gene *nifH* para cada um dos três solos amostrados e seqüências que apresentavam similaridade maior ou igual a 97% foram consideradas como pertencentes a mesma espécie. Já, Yeager et al. (2004) trabalhando com solo coletado em regiões áridas e semi-áridas dos Estados Unidos, detectaram a presença de 12 grupos distintos de seqüências do gene *nifH* usando 95% de similaridade como critério de agrupamento. Entretanto, o número de seqüências amostradas não foi suficiente para revelar a totalidade das espécies presentes (30 a 46 seqüências do gene *nifH* dependendo do local amostrado). De forma similar, Hamelin et al. (2002)

utilizando 77 seqüências parciais do gene *nifH* observaram que cerca de 91% das mesmas (70 seqüências) não apresentavam similaridade com nenhuma das seqüências publicadas de organismos cultivados. Por meio desta análise os pesquisadores detectaram 71 grupos distintos. Diallo et al. (2004) comparando 33 seqüências do gene *nifH* amplificadas a partir do DNA extraído de um solo coletado no Senegal sob vegetação natural de *Acacia tortilis* e *Balanites aegyptiaca* observaram a presença de 29 grupos com 100% de similaridade.

Com base nos resultados obtidos na literatura até então, é possível concluir que o número de espécies diazotróficas presentes no solo pode variar em função do ecossistema amostrado e que espécies diferentes podem ser encontradas em função do ecossistema. No entanto, é necessário saber se o número de seqüências amplificadas até então é representativo da diversidade total de bactérias diazotróficas que habitam o solo. A resposta a essa pergunta servirá para indicar se os microrganismos existentes no solo foram suficientemente amostrados para revelar a diversidade total deste grupo microbiano. Assim será possível obter as informações necessárias para orientar futuros estudos que tenham por objetivo a detecção da biodiversidade de bactérias diazotróficas no solo.

Para responder essa pergunta, por meio do presente estudo de revisão da literatura, estimou-se matematicamente o número de espécies de bactérias diazotróficas presentes no solo. Utilizando cálculos propostos por Hughes (2001) obteve-se a estimativa do número de espécies sem a necessidade de que todos os indivíduos da comunidade (espécies) fossem amostrados. Foi realizada uma análise exploratória baseada em seqüências do gene *nifH* depositadas no banco genético NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Foram selecionadas, de forma aleatória, 3.250 seqüências de nucleotídeos do gene *nifH*. Estes genes foram seqüenciados de bactérias isoladas do solo, ou amplificados a partir do DNA extraído diretamente do solo. Para a estimativa do provável número de espécies bacterianas fixadoras de nitrogênio presentes no solo, as seqüências foram alinhadas usando o programa para alinhamentos múltiplos MUSCLE (Edgar, 2004). Com base no alinhamento, uma matriz de distancias foi calculada usando o programa DNAdist (Felsensten, 1989). Finalmente, a matriz de distâncias serviu de entrada de dados para o programa

DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005) para o cálculo de índices não paramétricos de riqueza de espécies os quais foram utilizados para estimar o provável número de espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio presentes no solo.

É importante salientar que esta análise proposta pode apresentar algumas limitações. Por exemplo, não existem critérios para a submissão das seqüências ao banco de genes. Alguns pesquisadores enviam apenas aquelas seqüências que são diferentes a um determinado nível de similaridade, outros enviam apenas aquelas seqüências que são únicas entre o banco de dados obtido e ainda existem aqueles que depositam todas as seqüências obtidas no estudo. A adoção destes diferentes critérios pode superestimar o número real de espécies fixadoras de nitrogênio presentes no solo. Ainda podem-se mencionar questões relativas aos oligonucleotídeos iniciadores utilizados. Não existe um par de oligonucleotídeos iniciadores universal para a amplificação do gene *nifH* e, em alguns casos, os oligonucleotídeos iniciadores são desenhados para a amplificação de um grupo específico de bactérias diazotróficas (Zehr et al, 2003). O nível de similaridade utilizado para o agrupamento das seqüências também é de crucial importância. Não existe um consenso a respeito do nível mais adequado para a definição de espécie baseada na análise comparativa do gene *nifH*. Embora se saiba que tais conceitos sejam arbitrários, esta análise é bastante valiosa quando usada com o objetivo de comparar comunidades de bactérias diazotróficas. Foram utilizados níveis de similaridade de 100% a 95% sendo que 97% de similaridade tem sido o critério utilizado para a definição de espécie na maioria dos estudos realizados.

Por meio da análise proposta por este estudo de biodiversidade de bactérias diazotróficas do solo, verificou-se que o índice não paramétrico de riqueza de espécies Chao1 variou de 11.694 a 2.239 para a máxima e mínima similaridade usada para a definição de espécie, respectivamente, ao passo que o índice ACE variou de 14.235 a 2.415 (Tabela 2). Utilizando o critério de agrupamento de 97% de similaridade entre seqüências, observou-se que o número estimado de espécies de bactérias diazotróficas presentes no solo variou de 3.161 ± 722 a 3.476 ± 375 de acordo com o índice adotado para o cálculo. Para o mesmo nível de similaridade (97%), foram detectados 1.318

grupos sendo que 66% (874) das seqüências não apresentaram similaridade entre si (seqüências únicas a 97% de similaridade).

O número de espécies detectado por esta análise exploratória, representa o somatório das diferentes espécies detectadas em variados ecossistemas o que não significa que uma amostra de solo possa abrigar um número tão elevado de bactérias diazotróficas.

TABELA 2. Índices de riqueza de espécies calculados com base em 3.250 seqüências de nucleotídeos do gene *nifH* extraídas e amplificadas de bactérias isoladas do solo ou do DNA bacteriano extraído diretamente do solo.

| Nível de similaridade (%) | Nº de unidades amostrais detectadas | Índices de riqueza de espécies | |
|---------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------|
| | | Chao1 | ACE |
| 100 | 2.441 | 11.694 ± 2.877 | 14.235 ± 2.408 |
| 99 | 1.741 | 5.662 ± 1.368 | 6.213 ± 807 |
| 97 | 1.318 | 3.161 ± 722 | 3.476 ± 375 |
| 95 | 1.119 | 2.239 ± 482 | 2.415 ± 296 |

Embora tenham sido detectadas até o momento valores modestos da riqueza de bactérias diazotróficas no solo, a análise das seqüências depositadas no banco de genes indica que o número total de diazotróficos pode ser ainda maior. A análise indica claramente que a estratégia adotada para amostragem deve ser reavaliada para a descrição da biodiversidade integral dos diazotróficos presentes no solo. O seqüenciamento intensivo de genes como o *nifH* e o desenvolvimento de novos oligonucleotídeos iniciadores são essenciais para o avanço na detecção de organismos ainda não descritos.

2.1.4 Biodiversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a gramíneas

As bactérias associadas aos vegetais são chamadas de endofíticas quando habitam o interior da planta hospedeira sem causar dano aparente

(Sturz et al, 1998). A colonização do interior dos tecidos das plantas pode conferir uma vantagem ecológica sob as bactérias que colonizam a rizosfera (Lodewyckx et al., 2002). O interior dos tecidos das plantas fornece, aos endofíticos, um ambiente protegido de condições ambientais extremas encontradas na superfície das raízes das plantas ou no solo. As plantas podem ser colonizadas simultaneamente por uma grande variedade de bactérias. Muitos microrganismos são encontrados em grande número no interior das plantas, sendo caracterizados como espécies dominantes. Contudo, existe uma grande variedade de espécies bacterianas endofíticas que não são facilmente detectadas no interior das plantas devido ao baixo número de células presentes. Estes endofíticos são caracterizados como espécies raras. Segundo Lodewyckx et al. (2002), bactérias endofíticas podem ser detectadas tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas sendo que já foram encontrados mais de 80 gêneros bacterianos colonizando o interior dos tecidos das plantas tais como: *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Aeromonas*, *Afipia*, *Agrobacterium*, *Agromonas*, *Alcaligenes*, *Alcanivorax*, *Allorhizobium*, *Alteromonas*, *Aminobacter*, *Aquaspirillum*, *Arthrobacter*, *Aureobacterium*, *Azoarcus*, *Azomonas*, *Azorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Blastobacter*, *Blastomonas*, *Brachymonas*, *Bradyrhizobium*, *Brenneria*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chelatobacter*, *Chromobacterium*, *Chryseomonas*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Delftia*, *Derxia*, *Devosia*, *Enterobacter*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Frankia*, *Halomonas*, *Herbaspirillum*, *Matsuebacter*, *Mesorhizobium*, *Moraxella*, *Nevskia*, *Nocardia*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Phenylbacterium*, *Phyllobacterium*, *Photobacterium*, *Porphyrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Ralstonia*, *Renibacterium*, *Rhizobacter*, *Rhizobium*, *Rhizomonas*, *Rhodanobacter*, *Rhodococcus*, *Shewanella*, *Sinorhizobium*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Spirillum*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Thauera*, *Variovorax*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Zoogloea*, *Zymbacter*, *Zymomonas*. Embora exista uma grande diversidade de bactérias endofíticas capazes de se associar com uma variedade de espécies de plantas, apenas uma pequena fração destes organismos é capaz de fixar nitrogênio.

A possibilidade da ocorrência de aumentos significativos na disponibilidade de nitrogênio por meio da FBN para gramíneas, tais como o arroz (Boddey et al., 1995), cana-de-açúcar (James, 2000), milho, sorgo e trigo (Roncato-Maccari et al., 2003) foi demonstrada há alguns anos atrás. Sendo que a cana-de-açúcar foi um dos melhores exemplos de associação com bactérias fixadoras de nitrogênio (Lima et al., 1987; Oliveira et al., 2002). Inicialmente, imaginou-se que esse aumento na FBN fosse devido à presença das bactérias diazotróficas na rizosfera das plantas. Contudo, evidências posteriores demonstraram que certos diazotróficos podem colonizar o interior dos tecidos das plantas e tornaram-se conhecidos como bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio (Baldani et al., 1997; James & Olivares, 1997; Cocking, 2003). Além da FBN, alguns desses microrganismos também possuem a capacidade de promover o crescimento vegetal através da solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo e produzem ou alteram a concentração de hormônios vegetais, como o ácido indol acético, ácido giberélico, citocininas e etileno (Asghar et al., 2002; Dobbelaere et al., 2003).

Döbereiner (1992) demonstrou que as bactérias diazotróficas podem infectar todos os tecidos da cana-de-açúcar e estudos subseqüentes mostraram que esses organismos não estão restritos a essa única cultura. Esses diazotróficos foram observados em vários membros da família das gramíneas, especialmente nas plantas com a rota fotossintética C_4 , a qual, em condições favoráveis, pode assimilar o dobro de energia solar que as plantas C_3 . A maioria das plantas C_4 cresce nos trópicos, com exceção do milho e do sorgo, os quais também são encontrados em regiões temperadas (Reis et al., 2000).

O isolamento de bactérias diazotróficas endofíticas ativas na FBN do interior das raízes foi realizado há algum tempo atrás por Baldani et al. (1986) utilizando raízes de milho e sorgo, as quais foram externamente esterilizadas. Durante as últimas duas décadas, muitas bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio foram isoladas e identificadas, incluindo espécies dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Azoarcus*. Grande parte desses diazotróficos foi isolada de regiões tropicais, especialmente no Brasil, e essas regiões têm sido a principal fonte para os grupos que trabalham com diazotróficos associativos.

Entre os organismos diazotróficos endofíticos estão incluídos os organismos capazes de fixar nitrogênio em simbiose com plantas leguminosas (gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, por exemplo) e organismos que fixam nitrogênio associados a gramíneas. Entre os fixadores que habitam o interior das raízes (endofíticos), destacam-se as bactérias dos gêneros *Azospirillum* (endofíticas facultativas) e as bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* e *Azoarcus* (consideradas endofíticas obrigatórias, devido à obrigatoriedade de viverem no interior da planta) (Baldani et al., 1997). Essa grande diversidade é também estendida para organismos do mesmo gênero e mesmo entre linhagens de uma mesma espécie, crescidos em condições ambientais diferentes. Para *Azospirillum*, por exemplo, foi demonstrado que diferentes linhagens, isoladas de solos de sete regiões geográficas diferentes na Austrália, apresentaram uma ampla variação na sua atividade de nitrogenase (redução do nitrogênio molecular à amônia), como consequência do ambiente em que estavam expostas (Han & New, 1998). Os diazotróficos endofíticos são encontrados em várias plantas não leguminosas (Tabela 3).

Entre os organismos diazotróficos endofíticos citados, o gênero *Azospirillum* é o mais estudado e tem sido usado como modelo para investigações da associação entre bactérias diazotróficas e cereais (Zakharova et al., 1999). Organismos do gênero *Azospirillum* são bactérias Gram negativas fixadoras de nitrogênio classificadas inicialmente como bactérias de vida livre. Entretanto existem relatos da associação destes microrganismos com as raízes das plantas e da presença destes o interior dos tecidos vivendo endofiticamente nos espaços intercelulares (Sumner, 1990). Sendo assim, *Azospirillum* spp. é atualmente classificado com endofítico facultativo. O gênero apresenta um metabolismo bastante versátil o que confere características adaptativas permitindo assim o estabelecimento competitivo na rizosfera (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Essas características conferem ao gênero a habilidade de promover o crescimento de mais de 100 espécies de cereais e leguminosas (Bashan et al., 2004). Aparentemente, a inoculação de *Azospirillum* spp. pode reduzir o uso de fertilizantes químicos, especialmente nitrogênio, na ordem de 20% a 50% sendo que resultados superiores já foram obtidos quando a inoculação foi utilizada juntamente com a incorporação de

fertilizantes orgânicos (Bashan et al., 2004).

TABELA 3. Principais gêneros bacterianos endofíticos associados a plantas não leguminosas.

| Gênero bacteriano | Planta hospedeira | Referência |
|--------------------------|---|---|
| <i>Azorhizobium</i> | Tomate Cereais | Cocking, 2001 Sabry et al., 1997 Webster et al., 1997 |
| <i>Azospirillum</i> | Cana-de-açúcar Cereais Gramíneas forrageiras Palmeiras Plantas tuberosas | Kennedy et al., 2004 Reis et al., 2000 |
| <i>Azoarcus</i> | Arroz Batata doce <i>Kallar grass</i> | Kennedy et al., 2004 Reiter et al., 2003 |
| <i>Bacillus</i> | Arroz Milho | Liu et al., 2006 |
| <i>Bulkholderia</i> | Cana-de-açúcar Cereais Palmeiras Plantas tuberosas | Reis et al., 2000 Perin et al., 2006 |
| <i>Clostridium</i> | Batata doce Cereais <i>Miscanthus sinensis</i> | Kennedy et al., 2004 Miyamoto et al., 2004 Reiter et al., 2003 |
| <i>Gluconacetobacter</i> | Batata-doce Cana-de-açúcar <i>Pennisetum purpureum</i> | Reis et al., 2000 |
| <i>Herbaspirillum</i> | Cana-de-açúcar Cereais Gramíneas forrageiras <i>Miscanthus</i> sp. Palmeiras <i>Pennisetum purpureum</i> <i>Spartia pectinata</i> | Kennedy et al., 2004 Reis et al., 2000 |
| <i>Klebsiella</i> | Batata doce Cereais | Reiter et al., 2003 Triplett, 1996 |
| <i>Pantoea</i> | Arroz Batata doce | Asis & Adachi, 2004 Feng et al., 2006 |
| <i>Pseudomonas</i> | Milho | Mehnaz & Lazarovits, 2006 Seghers et al., 2004 |
| <i>Rhizobium</i> | Algodão Batata doce <i>Brassica</i> spp Cereais | Doty et al., 2005 Kennedy et al., 2004 Reiter et al., 2003 Trinick & Hadobas, 1995 |
| <i>Serratia</i> | Arroz | Balachandar et al., 2006 Gyaneshwar et al., 2001 |

2.1.5 Biodiversidade de bactérias diazotróficas associadas ao milho

As plantas de milho podem ser colonizadas simultaneamente por uma grande diversidade de bactérias diazotróficas (Chelius & Triplett, 2001; Lodewyckx et al., 2002). Recentemente, muitos microrganismos diazotróficos tem sido encontrados colonizando plantas de milho (Olivares et al., 1996; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000; Chelius & Triplett, 2001). Contudo, a maioria dos estudos de diversidade, realizados até o presente, foram baseados em técnicas de cultivo e subsequente caracterização de isolados. O cultivo de microrganismos fornece informações limitadas sobre a diversidade já que a maioria dos organismos existentes não é facilmente isolada por meio de técnicas de cultivo convencionais. Embora muitos microrganismos diazotróficos tenham sido detectados em associação com plantas de milho, a diversidade (número e riqueza de espécies) de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a estas plantas ainda permanece desconhecida.

Relatos da associação de bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Klebsiella* são os mais freqüentes em estudos da interação de diazotróficos com o milho. Ambos gêneros já foram detectados por estudos baseados em cultivo e isolamento (Baldani & Döbereiner, 1980; Baldani et al., 1986; Palus et al., 1996) bem como estudos baseados em técnicas independentes de cultivo (Chelius & Triplett, 2001). Tem sido reportado que bactérias do gênero *Azospirillum* podem colonizar o interior de diversas gramíneas e cereais (Reis et al., 2000) e que bactérias do gênero *Klebsiella* podem colonizar o interior de plantas de trevo vermelho (Sturz et al., 1998), videiras (Bell et al., 1995), arroz (Elbeltagy et al., 2000) e batata doce (Reiter et al., 2003).

O gênero *Burkholderia* também tem sido apontado como de ampla ocorrência em associação com o milho cultivado no Brasil e no México (Perin et al., 2006) sendo que a espécie *B. tropica* tem sido detectada em maior freqüência. A ocorrência destes organismos em associação com o milho em diferentes regiões geográficas pode indicar que certos gêneros de bactérias diazotróficas estão associados preferencialmente ao milho independente do tipo de solo e do clima da região de cultivo.

Além dos organismos diazotróficos citados anteriormente, o gênero *Rhizobium* também já foi detectado infectando o interior dos tecidos de plantas

de milho principalmente em plantas coletadas em lavouras cultivadas no sistema de rotação de culturas com plantas leguminosas. Embora este gênero seja bem estudado na associação com plantas leguminosas, pouco se sabe sobre os efeitos provocados por estas bactérias quando associadas a gramíneas. Entretanto, o aumento no crescimento do milho devido à produção de fitohormônios excretados por bactérias do gênero *Rhizobium* já foi constatado (Chabot et al., 1996; Schloter et al., 1997). Tais microrganismos também tem sido detectados no interior de outras plantas não leguminosas como batata doce (Reiter et al., 2003), arroz (Boddey et al., 1995) e algodão (Doty et al., 2005). Gutiérrez-Zamora & Martínez-Romero (2001) detectaram a presença de isolados de *R. etli* colonizando o interior de plantas de milho cultivadas em consórcio com feijão em solos do México que apresentavam baixa disponibilidade de nutrientes. A espécie diazotrófica *Rhizobium tropici* isolado CIAT899, utilizada com sucesso na inoculação de *Phaseolus vulgaris*, também foi reconhecida por Rosenblueth & Martinez-Romero (2004) como uma espécie endofítica competitiva capaz de se associar a plantas de milho em experimentos de inoculação o que demonstra que estes organismos estão naturalmente associados ao milho.

2.2 CONCLUSÕES

Entre os 52 filos bacterianos, compostos por bactérias cultivadas e não cultivadas, atualmente reconhecidos, é possível detectar pelo menos seis filos (*Spirochaetes*, *Chlorobium*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Nitrospirae* e *Proteobacteria*) que contém espécies bacterianas capazes de fixar nitrogênio atmosférico. Entre estes, o filo das Proteobactérias apresenta o maior número de representantes capazes de fixar nitrogênio. Com base nos resultados obtidos na literatura até então, é possível concluir que o número de espécies diazotróficas presentes no solo pode variar em função do ecossistema amostrado e que espécies diferentes podem ser encontradas em função do ecossistema. Embora o número de bactérias diazotróficas detectado seja modesto, a análise das seqüências de genes responsáveis pela fixação do nitrogênio indica que os microrganismos diazotróficos existentes no solo não foram suficientemente amostrados para revelar a real diversidade sendo que o número total de bactérias diazotróficas pode ser ainda maior. Com relação às bactérias diazotróficas endofíticas, dos 80 gêneros endofíticos cultiváveis detectados até então, apenas 13 (*Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Bulkholderia*, *Clostridium*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*) são reconhecidamente fixadores de nitrogênio. Estes resultados indicam claramente que há necessidade de se reavaliar as estratégias atualmente adotadas para que seja possível a descrição da biodiversidade integral das bactérias diazotróficas do solo e associadas às plantas.

2.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASGHAR, H. N. et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.35, n. 1, p. 231-237, 2002.

ASIS, C.A.; ADACHI, K. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 1, p.19-23, 2004.

BALACHANDAR, D. et al. Flavonoids and growth hormones influence endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp in rice. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 22, n. 7, p. 707-712, 2006.

BALDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n.5, p. 911-922, 1997.

BALDANI, V. L. et al. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorgum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 90, n.1, p. 35-46, 1986.

BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980.

BASHAN, Y. et al. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004.

BELL, C.R. et al. Endophytic bacteria in Grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, n.1, p. 46-53, 1995.

BHARGAVA, S. et al. Auxotrophic mutant of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* showing absolute requirement of Cs⁺ or Rb⁺ for diazotrophy and autotrophy. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 46, n. 4, p. 255-262, 2006.

BODDEY, R.M. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, n.1, p. 195-209, 1995.

CHABOT, R. et al. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n.8, p. 2767-2772, 1996.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.

COCKING, E.C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, n.2, p. 169-175, 2003.

COCKING, E.C. Xylem colonization of tomato by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. **Acta Biologica Hungarica**, Bubapest, v. 52, n. 2, p. 189-194, 2001.

CURTIS, T.; SLOAN, T. Exploring microbial diversity – A vast below. **Science**, Washington, v. 309, n. 5739, p. 1331 - 1333, 2005.

DE CHAZAL, N.M. et al. Methods involving light variation for isolation of Cyanobacteria - Characterization of isolates from central Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, n. 11, p. 3561-3566, 1992.

DIALLO, M.D. et al. 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. **Environmental Microbiology**, New York, v. 6, n. 4, p. 400 - 415, 2004.

DING, Y. et al. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 5, p. 1271-1281, 2005.

DOBBELAERE, S. et al. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DÖBEREINER, J. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, n. 1, p. 1-13, 1992.

DOTY, S.L. et al. Identification of an endophytic Rhizobium in stems of Populus. **Symbiosis**, Rehovot, v. 39, n. 1, p. 27 - 35, 2005.

EDGAR, R. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 1792 – 1797, 2004.

ELBELTAGY, A. et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 46, n. 3, p. 617-629, 2000.

FALSENSTEN, J. PHYLIP-Phylogeny inference package (version 3.2). **Cladistics**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 164 – 166, 1989.

FAVILLI, F.; MESSINI, A. Nitrogen fixation at phyllospheric level in coniferous plants in Italy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 128, n. 1, p. 91 - 95, 1990.

FENG, Y. et al. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 5, p. 938-945, 2006.

GANS, J. et al. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, Washington, v. 309, n. 5739, p.1387-1390, 2005.

GARRITY, J.B. et al. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology**. New York: Springer, 2005. 1108 p.

GIRI, S.; PATI, B.R. A comparative study on phyllosphere nitrogen fixation by newly isolated *Corynebacterium* sp. & *Flavobacterium* sp. and their potentialities as biofertilizer. **Acta Microbiologica Hungarica**, Bubapest, v. 51, n. 1, p. 47-56, 2004.

GUTIERREZ-ZAMORA, M.L.; MARTINEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, n. 3, p. 117-126, 2001.

GYANESHWAR, P. et al. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 8, p. 2634 – 2645, 2001.

HAMELIN, J. et al. *NifH* gene diversity in the bacterial community associated with the rhizosphere of *Molinia coerulea*, an oligonitrophilic perennial grass. **Environmental Microbiology**, New York, v. 4, n. 8, p. 477 - 477, 2002.

HAN, S.O.; NEW, P.B. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, n.2, p. 193-201, 1998.

HOULE, D. et al. Identification of two genera of N₂-fixing cyanobacteria growing on three feather moss species in boreal forests of Quebec, Canada. **Canadian Journal of Botany-Revue**, Ottawa, v. 84, n. 6, p.1025-1029, 2006.

HUGENHOLTZ, P. et al. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 2, p. 366–376, 1998.

HUGHES, J.B. et al. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 4399-4406, 2001.

IZQUIERDO J.A.; NUSSLEIN K. Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, n. 4, p. 441-52, 2006.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic associative symbiosis. **Field Crops Research**, North Carolina, v. 65, n. 2, p.197-209, 2000.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v.17, n.1, p.77-119, 1997.

KELLER, M.; ZENGLER, K. Tapping into microbial diversity. **Nature Reviews**, London, v. 2, n. 2, p. 141 – 150, 2004.

LILBURN T.G. et al. Nitrogen Fixation by Symbiotic and Free-Living Spirochetes. **Science**, Washington, v. 292, n. 29 p. 2495, 2001.

LIMA, E. et al. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugarcane using a ¹⁵N aided nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, n.1, p. 165-170, 1987.

LIU, X. et al. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C₄. **Current Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 186–190, 2006.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002.

MADIGAN, M.T. et al. **Brock biology of microorganisms**. 8th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. 986p.

MEHNAZ, S; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, n. 3, p. 326–335, 2006.

MIYAMOTO, T. et al. Novel endophytic nitrogen-fixing Clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n.11, p. 6580–6586, 2004.

MULHOLLAND, M.R. et al. Nitrogen fixation and release of fixed nitrogen by *Trichodesmium* spp. in the Gulf of Mexico. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 51 n. 4, p. 1762-1776, 2006.

OLIVARES, F.L. et al. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soil**, New York, v. 21, n. 3, p. 197-200, 1996.

OLIVEIRA, A.L.M. et al. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 242, n. 2, p. 205-215, 2002.

PACE, N. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Washington, v. 274, n. 5313, p. 734 - 740, 1997.

PALUS, J.A. et al. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Iltis and Doebley. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 186, n. 1, p. 135-142, 1996.

PERIN, L. et al. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3103 - 3110, 2006.

RABOUILLE, S. et al. Modeling the dynamic regulation of nitrogen fixation in the cyanobacterium *Trichodesmium* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3217-3227, 2006.

RAPPÉ, M.; GIOVANNONI, S. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, n. 1, p. 369 – 394, 2003.

RAYMOND, J. et al. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.

REIS, V.M. et al. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, n. 3, p. 227-247, 2000.

REITER, B. et al. Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 49, n.9, p. 549–555, 2003.

RONCATO-MACCARI, L. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 45, n.1, p. 39-47, 2003.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. **Archives of Microbiology**, New York, v. 181, n.5, p. 337-344, 2004.

- SABRY, S.R.S. et al. Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. **Proceedings: Biological Sciences**, London, v. 264, n. 1380, p. 341-346. 1997.
- SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN. J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1501-1506, 2005.
- SCHLOTTER, M. et al. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 5, p. 2038-2046, 1997.
- SEGHERS, D. et al. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 3, p. 1475–1482, 2004.
- STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 24, n.4, p. 487-506, 2000.
- STEUNOU, A.S. et al. In situ analysis of nitrogen fixation and metabolic switching in unicellular thermophilic cyanobacteria inhabiting hot spring microbial mats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington v. 103, n. 7, p. 2398-2403, 2006.
- STURZ, A. V. et al. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, n. 2, p. 162-167. 1998.

TRINICK, M.J.; HADOBAS, P.A. Formation of nodular structures on the non-legumes *Brassica napus*, *B. campestris*, *B. juncea* and *Arabidopsis thaliana* with *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* isolated from *Parasponia* spp. or legumes grown in tropical soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 172, n. 2, p. 207 - 219, 1995.

TRIPLETT, E. W. Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 186, n.1, p. 29-38, 1996.

TYSON, G.W. et al. Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp nov from an acidophilic microbial community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 10, p. 6319 - 6324, 2005.

VALDÉS, M. et al. Non-*Frankia* Actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 1, 460 – 466, 2005.

VESSEY, J.K. et al. Root-based N₂-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 274, n. 1, p. 51-78, 2005.

WEBSTER, G. et al. Interactions of rhizobia with rice and wheat. **Plant and soil**, Dordrecht, v. 94, n. 1, p. 115 – 122, 1997.

YEAGER, C. M. et al. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 2, p. 973-983, 2004.

ZAKHAROVA, E, A. et al. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense* - Insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 259, n. 3, 572-576, 1999.

ZEHR, J.P. et al. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, New York, v. 5, n. 7, p. 539-554, 2003.

CAPÍTULO II

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A PLANTAS DE MILHO EM DIFERENTES REGIÕES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

3.1 RESUMO

Bactérias diazotróficas endofíticas são capazes de promover o crescimento do milho por meio da fixação biológica do nitrogênio (FBN) ou pela produção de fitohormônios. Sendo assim, existe um grande interesse em caracterizar a diversidade destes microrganismos para que seu potencial seja mais bem explorado. Neste estudo, a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho foi caracterizada em diferentes locais do Estado do Rio Grande do Sul que apresentavam variações de clima e solo. Para a detecção da diversidade, foi usada uma metodologia baseada na amplificação do gene *nifH* grupo I, análise de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) e seqüenciamento dos genes amplificados. Os índices de Shannom-Weaver e Equitabilidade foram calculados para estimar a diversidade dos diazotróficos, bem como diversidade de nucleotídeos e a divergência entre seqüências para estimar a diversidade genética das comunidades detectadas. Para avaliar a diferenciação entre as comunidades foi utilizado o teste F_{ST} . Os resultados mostraram uma maior variação entre as comunidades das diferentes regiões do Estado do que dentro das comunidades de cada região avaliada, particularmente entre comunidades provenientes de diferentes tipos de solo, regime pluviométrico e regiões geográficas. O índice de diversidade de Shannon-Weaver indicou uma grande diferença em termos de diversidade de espécies entre as comunidades avaliadas. As comunidades amostradas da região norte do Rio Grande do Sul, a qual apresentou maior disponibilidade de água e maior conteúdo de argila, tenderam a apresentar maior diversidade quando comparada as comunidades amostradas na região sul. A análise de equitabilidade mostrou a dominância de espécies dentro de cada comunidade avaliada independente da região amostrada. Todas as seqüências obtidas foram classificadas como pertencentes ao gene *nifH* grupo I, um grupo filogenético composto pelos genes *nifH* que codificam nitrogenases que contém Mo-Fe e alguns genes *vnfH*. Foram obtidas seqüências pertencentes às classes alpha, beta e gammaproteobacteria. Os resultados demonstraram que existe uma grande diversidade de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio capazes de colonizar o interior de plantas de milho e que as diferentes condições edafoclimáticas estão podem influenciar a diversidade dos genes *nifH*.

3.2 INTRODUÇÃO

Recentemente, os sistemas agrícolas têm sofrido mudanças com o objetivo de promover a melhoria da qualidade ambiental e evitar a degradação do solo. O manejo do solo e a exploração da biodiversidade dos sistemas agrícolas têm sido utilizados para otimizar a produção e a sustentabilidade dos ecossistemas. Neste sentido, a associação de cereais e gramíneas com bactérias diazotróficas endofíticas pode representar uma das alternativas mais promissoras para a promoção do crescimento das plantas, manejo do solo e qualidade ambiental.

Bactérias diazotróficas endofíticas podem estimular o crescimento das plantas, aumentar a resistência a doenças bem como promover a fixação biológica do nitrogênio (Reis et al., 2000; Thuler et al., 2003; Bashan et al., 2004; Iniguez et al., 2004). Além disso, diazotróficos endofíticos podem apresentar vantagens em relação aos diazotróficos associados às raízes uma vez que estes se encontram mais bem localizados para explorar as fontes de carbono disponibilizadas pelas plantas. Em adição, os diazotróficos endofíticos colonizam nichos específicos no interior das plantas que apresentam reduzida tenção de oxigênio, a qual é necessária para a expressão da nitrogenase (James & Olivares, 1997; Dobbelaere et al., 2003). As plantas são consideradas um complexo microecossistema, composto por diferentes habitats e podem ser colonizadas simultaneamente por uma grande diversidade de bactérias endofíticas (Chelius & Triplett, 2001; Lodewyckx et al., 2002). Tal diversidade pode representar uma grande fonte de biodiversidade, largamente inexplorada.

Bactérias diazotróficas endofíticas tem sido isoladas de várias espécies de gramíneas (Reis et al., 2000; Riggs et al., 2001) e uma grande diversidade de diazotróficos tem sido encontrada colonizando plantas de milho (Baldani et

al., 1996; Chelius & Triplett, 2001; Olivares et al., 1996; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). A maioria destes estudos de diversidade está baseada em técnicas de cultivo e subsequente caracterização dos isolados. Entretanto, o cultivo de microrganismos fornece informações limitadas sobre a diversidade já que a maioria dos organismos existentes não são facilmente isolados por meio de técnicas de cultivo convencionais.

Sabendo que bactérias diazotróficas são candidatos potenciais para o aumento da produção vegetal, existe um grande interesse em caracterizar a diversidade destes microrganismos para que seu potencial seja mais bem explorado. Neste estudo, foi feita a caracterização da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho cultivado em diferentes regiões geográficas do Estado do Rio Grande do Sul. Para avaliar a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio em diferentes ecossistemas, oligonucleotídeos iniciadores foram utilizados para amplificar o gene *nifH* por meio de técnicas independentes de cultivo (Poly et al., 2001; Burgmann et al., 2004; Bashan et al., 2004). Estas técnicas possibilitam a obtenção de uma caracterização mais completa da comunidade de diazotróficos do que técnicas dependentes de cultivo. Neste estudo foi testada a hipótese de que a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas varia em função do ambiente.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Amostragem e preparação das amostras

Foram coletados colmos de plantas de milho cultivados em lavouras sob sistema de semeadura direta em cinco regiões do Estado do Rio Grande do Sul que apresentavam diferenças com relação ao tipo de solo e clima (Figura 1, Tabela 1). As amostras foram coletadas no período de 25 a 28 de fevereiro de 2003, período este que corresponde ao final do ciclo de crescimento do milho no Rio Grande do Sul. De cada região, foram coletadas de cinco a sete amostras de milho. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados, contendo gelo e foram posteriormente congeladas a -4°C até o momento da análise molecular.

Em cada local amostrado também foram retiradas amostras de solo para a análise das características químicas e físicas. Foram coletadas seis amostras de solo, pesando aproximadamente 0,5 kg ao todo, de cada um dos 30 locais estudados. As amostras de solo foram secas em estufa a 60°C , moídas e peneiradas em peneira de 2mm. Os conteúdos totais de matéria orgânica pelo foram quantificados método Walkley-Black (Tedesco et al., 1995), a porcentagem de argila pelo método de decantação em solução aquosa (Tedesco et al., 1995) e pH em solução 1:25 (solo:água).

As medidas de temperatura máxima anual e quantidade anual de chuva para cada uma das regiões amostradas foram obtidas junto a Rede Regional Meteorológica do 8° Distrito de Meteorologia do RS (Instituto Nacional de Meteorologia/Ministério da Agricultura) (Figura 1). Os dados climáticos apresentados representam a média acumulativa de 30 anos de informação.

Precipitação anual*

Temperatura média*

*Média de 30 anos (1931 – 1990)

FIGURA 1. Mapa do Estado do Rio Grande do Sul mostrando as diferenças climáticas e as cinco regiões amostradas. Os números indicam os 30 locais de amostragem das plantas de milho utilizadas neste trabalho. As medidas de temperatura média máxima e precipitação anual foram obtidas junto ao oitavo distrito da Rede Regional Meteorológica do Rio Grande do Sul (Instituto de Meteorologia / Ministério da Agricultura). Os valores apresentados representam a média acumulativa dos últimos 30 anos de informação.

TABELA 1. Características do solo das 30 amostras coletadas em cinco diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul.

| Regiões | Número da amostra | Características do solo | | |
|-----------------|-------------------|-------------------------|--|------------------------------|
| | | pH | Matéria Orgânica (g kg ⁻¹) | Argila (g kg ⁻¹) |
| I | 1 | 4,1 ± 0,5 | 39 ± 1,3 | 140 ± 8,3 |
| | 14 | 4,9 ± 0,2 | 10 ± 0,9 | 140 ± 7,1 |
| | 15 | 4,9 ± 0,1 | 7 ± 0,8 | 140 ± 7,5 |
| | 16 | 5,3 ± 0,3 | 56 ± 1,5 | 190 ± 8,6 |
| | 27 | 5,6 ± 0,2 | 45 ± 1,4 | 240 ± 9,5 |
| | 28 | 5,3 ± 0,5 | 17 ± 0,8 | 140 ± 5,4 |
| Média da Região | | 5,0 ± 0,3 | 29 ± 1,1 | 165 ± 7,7 |
| II | 2 | 6,2 ± 0,6 | 16 ± 0,7 | 180 ± 10,4 |
| | 3 | 4,9 ± 0,5 | 34 ± 1,4 | 620 ± 11,2 |
| | 4 | 5,1 ± 0,5 | 40 ± 1,6 | 470 ± 9,6 |
| | 5 | 4,6 ± 0,4 | 22 ± 1,0 | 700 ± 15,4 |
| | 6 | 4,8 ± 0,6 | 32 ± 1,1 | 470 ± 9,8 |
| | 7 | 5,1 ± 0,3 | 34 ± 1,2 | 620 ± 12,4 |
| | 8 | 4,1 ± 0,4 | 18 ± 0,4 | 470 ± 11,2 |
| Média da Região | | 4,9 ± 0,5 | 28 ± 0,9 | 504 ± 11,9 |
| III | 9 | 5,7 ± 0,3 | 47 ± 1,9 | 620 ± 13,4 |
| | 10 | 5,2 ± 0,2 | 38 ± 1,7 | 180 ± 7,1 |
| | 11 | 5,4 ± 0,4 | 29 ± 0,6 | 620 ± 6,3 |
| | 12 | 4,9 ± 0,5 | 36 ± 0,8 | 470 ± 12,1 |
| | 13 | 4,4 ± 0,6 | 36 ± 1,2 | 290 ± 11,8 |
| Média da Região | | 5,1 ± 0,3 | 37 ± 1,2 | 416 ± 10,1 |
| IV | 17 | 5,1 ± 0,7 | 13 ± 0,7 | 80 ± 5,6 |
| | 18 | 4,7 ± 0,3 | 14 ± 0,5 | 140 ± 6,5 |
| | 19 | 4,8 ± 0,4 | 15 ± 0,9 | 160 ± 8,4 |
| | 20 | 6,1 ± 0,4 | 29 ± 1,1 | 140 ± 5,7 |
| | 21 | 6,9 ± 0,6 | 21 ± 1,6 | 190 ± 6,2 |
| | 22 | 5,1 ± 0,2 | 41 ± 1,9 | 190 ± 6,1 |
| Média da Região | | 5,4 ± 0,4 | 22 ± 1,1 | 150 ± 6,4 |
| V | 23 | 4,5 ± 0,5 | 34 ± 2,3 | 220 ± 7,8 |
| | 24 | 5,0 ± 0,2 | 39 ± 1,8 | 170 ± 5,4 |
| | 25 | 4,6 ± 0,4 | 36 ± 0,9 | 240 ± 6,9 |
| | 26 | 5,7 ± 0,5 | 44 ± 2,5 | 210 ± 7,4 |
| | 29 | 5,2 ± 0,6 | 13 ± 1,2 | 140 ± 6,5 |
| | 30 | 5,0 ± 0,3 | 33 ± 2,0 | 150 ± 5,1 |
| Média da Região | | 5,0 ± 0,4 | 33 ± 1,8 | 190 ± 6,5 |

3.3.2 Extração do DNA microbiano

As amostras de colmo foram superficialmente desinfestadas utilizando uma solução de etanol a 70% por cinco minutos. Para a extração do DNA das bactérias endofíticas, 10g do material foi finamente cortado e acondicionado em frascos de vidro contendo uma solução de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0 EDTA 1mM) + 0,5 M NaCl, suficiente para cobrir a amostra. Os frascos foram submetidos a agitação (150 rpm) por um período de 16h a 4°C para evitar o crescimento bacteriano. Após o período de incubação, o líquido foi filtrado e centrifugado por 10 min. a 10.000 g. O pellet, composto por células bacterianas, foi homogeneizado com uma solução de tampão TE e o DNA da suspensão de células foi extraído usando o protocolo descrito por Schrank et al. (1987). Após a extração, as amostras de DNA foram purificadas com o auxílio do kit DNeasy Tissue (Qiagen, Valencia, Calif.), seguindo as instruções do fabricante.

3.3.3 Amplificação do gene *nifH*

Os fragmentos do gene *nifH* foram amplificados utilizando nested PCR (Widmer et al., 1999). Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores: o primeiro par foi definido por Zehr & McReynolds (1989) e foi construído para a amplificação de 359 pares de bases (pb) do gene *nifH*. Esse par foi escolhido por amplificar uma região do gene *nifH* altamente conservada entre a maioria dos procariotes fixadores de nitrogênio. O segundo par de oligonucleotídeos iniciadores foi *nifH*For (5'-ACCCGCCTGATCCTGCACGCAAGG-3') e *nifH*Rev (5'-ACGATGTAGATTTCTGGGCCTTGTT-3') desenhado por Soares et al. (2006) para amplificar diversos fragmentos de seqüências do gene *nifH*, previamente denominado de *nifH* grupo I composto por microrganismos pertencentes os filos Proteobacteria, Cianobacteria e Firmicutes (Chien & Zinder, 1996; Zehr et al., 2003; Steward et al., 2004). O produto de amplificação esperado é de 314 ou 317pb dependendo da espécie bacteriana da qual o DNA obtido na primeira reação de amplificação é utilizado. A reação de PCR foi feita utilizando uma mistura para PCR (PCR Master Mix -

Promega, Madison, Wis.). Para a primeira reação de amplificação foram utilizados 25_μl da mistura de reação, 100ng de DNA purificado e 2,5_μl de cada oligonucleotídeo iniciador a uma concentração de 10_μM. A segunda reação foi feita em 50_μl da mistura de reação contendo 1_μl do produto da primeira PCR como molde. Após a desnaturação inicial que consistiu em 5 min. a 94°C, foram aplicados 30 ciclos, em ambas as reações, conforme o seguinte: desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 55°C por 45s e extensão a 72°C por 45s. Para a extensão final, a mistura de reação contendo o DNA molde foi submetida a 72°C por 5min. Ao final da amplificação, as amostras foram resfriadas e mantidas a 4°C. A quantidade e a qualidade dos produtos amplificados foram analisadas em gel de agarose ultrapura a 1,5% (Invitrogen, Carlsbad, California). A especificidade das bandas de DNA amplificadas foi testada por meio de hibridização dos produtos da PCR com uma sonda do gene *nifH* de *Azospirillum brasilense* previamente amplificado e seqüenciado usando o sistema ECL para marcação e detecção direta de ácidos nucleicos (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey).

3.3.4 Análise do polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP)

Para as análises de restrição foram usados 10_μl do produto da amplificação purificado (QIAquick - Qiagen, Valencia, Calif.), amplificado das amostras de colmo do milho. As enzimas de restrição *TaqI* e *HaeIII* foram utilizadas, pois os produtos obtidos pela ação das mesmas sob o gene *nifH* podem diferenciar várias espécies de bactérias diazotróficas (Widmer et al., 1999; Poly et al., 2001). As digestões foram feitas por um período de 16h para que a completa fragmentação do DNA fosse atingida. Os produtos da digestão foram analisados em um gel de poliacrilamida a 10% e os produtos obtidos foram utilizados para a construção de uma matriz binária de acordo com a presença ou ausência dos fragmentos de restrição no gel. Esta matriz foi utilizada para a comparação entre o grau similaridade das amostras utilizando-se o coeficiente de Jacard e agrupamento pelo método UPGMA. Para a observação das relações genéticas entre as comunidades avaliadas foi

construído um dendrograma de similaridade baseado na análise de agrupamento.

3.3.5 Clonagem e seqüenciamento do gene *nifH*

Com base nos resultados obtidos pela análise de restrição, foram selecionadas 10 comunidades, entre as 30 analisadas, para a clonagem e o seqüenciamento dos genes *nifH*. O uso do termo clone nesse sentido significa células geneticamente idênticas derivadas de uma única célula. Este procedimento foi adotado para que fosse obtida uma melhor descrição da diversidade dos microrganismos diazotróficos endofíticos de cada comunidade e entre as comunidades bem como determinar a identidade dos organismos capazes de colonizar o interior das plantas de milho.

O produto da PCR foi purificado utilizando o kit para purificação de PCR QIAquick (Qiagen, Valencia, Calif.) e posteriormente clonado usando o vetor pGEM – T Easy (Promega, Madison, Wis.). Os plasmídeos obtidos foram purificados com o kit QIAprep spin miniprep (Qiagen, Valencia, Calif.) e os fragmentos do gene *nifH* foram seqüenciados em ambas as direções utilizando os oligonucleotídeos iniciadores T7 e RP-48 e o kit para seqüenciamento DYEnamic ET (GE Healthcare) em um termociclador do tipo PTC200 (BioRad) em placas de 96 poços acoplado a um seqüenciador capilar do tipo MegaBACE 1000 (GE Healthcare).

3.3.6 Análise de suficiência amostral, diversidade de espécies e filogenia

Após a edição manual para a eliminação das seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e de seqüências potencialmente incorretas, as seqüências do gene *nifH* foram alinhadas e agrupadas em unidades taxonômicas (UTs). Seqüências que apresentaram 97% de similaridades ou mais foram consideradas como pertencentes ao mesmo grupo taxonômico. O alinhamento foi realizado utilizando o programa para alinhamentos múltiplos ClustalX 1.83 (Thompson et al., 1997). Com base no

alinhamento, foi construída uma matriz de distâncias usando o programa DNAdist (Felsensten, 1989) e finalmente esta matriz de distâncias foi utilizada como entrada de dados para o programa DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005) que fez a análise de agrupamento, construção de curvas de extinção e o cálculo do índice de diversidade de Shannon-Weaver ($H = - \sum (P_i \ln[P_i])$ onde P_i é o número de indivíduos de uma dada espécie dividido pelo número total de espécies observadas). A relação entre as espécies detectadas foi avaliada pelo índice de equitabilidade calculado pela seguinte equação: $E = H / [\ln S]$; onde S é o número de espécies detectadas e H é o índice de Shannon-Weaver. Todos os programas utilizados foram aplicados usando as configurações padrão.

A estimativa da suficiência amostral foi calculada por meio da construção de curvas de extinção e pela equação proposta por Mullins et al. (1995), onde representatividade amostral (C) é igual a $1 - (n_1/N)$ sendo n_1 o número de seqüências que foram detectadas apenas uma vez (seqüências únicas) e N o número total de seqüências amostradas.

Para a construção das relações filogenéticas, as seqüências de nucleotídeos obtidas neste estudo foram comparadas com todas as seqüências do banco de genes do National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando Blast (Altschul et al., 1997). Seqüências representativas agrupadas pelo programa DOTUR usando o critério de 97% de similaridade foram combinadas em um banco de dados juntamente com as seqüências do gene *nifH* mais similares, de organismos cultivados, retiradas do Banco de Genes (NCBI). As seqüências foram novamente alinhadas usando o programa ClustalX 1.83 e finalmente foi construída uma árvore filogenética usando o algoritmo do vizinho mais próximo (neighbor-joining) e o programa Splits Tree 4 (Huson and Bryant, 2006).

Para a avaliação das proteínas codificadas pelo gene seqüenciado foi usado o programa Blastx, que realizou a tradução conceitual das seqüências de nucleotídeos seguida da busca pela proteína traduzida no banco de dados do NCBI.

3.3.7 Cálculo da diversidade genética

A diversidade genética foi avaliada pela variação de nucleotídeos das seqüências obtidas conforme a metodologia proposta por Martin (2002) pela seguinte equação:

$$H = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

onde H é a diversidade genética, n é o número de cópias do gene, k é o número de seqüências distintas e, p_i é a freqüência de cada seqüência.

A variação genética total entre as comunidades foi obtida pela comparação da diversidade genética dentro de cada comunidade e a diversidade genética total das comunidades combinadas (F_{ST}) calculada pela seguinte equação: $F_{ST} = (\theta_T - \theta_W) / \theta_T$, onde θ_T é a diversidade para todas as amostras e θ_W é a diversidade genética média dentro de cada comunidade sobre todas as comunidades comparadas. A significância estatística de F_{ST} foi avaliada pela re-amostragem aleatória das seqüências utilizando 1.000 permutações. A comparação dos valores de F_{ST} aos pares para cada comunidade analisada foi utilizada para a construção de um dendrograma calculado pelo algoritmo UPGMA por meio do programa MEGA versão 3.1 (Kumar et al., 2004). Dentro de cada comunidade, a variação genética total foi calculada pela média da diversidade de nucleotídeos e pela média da divergência entre as seqüências de acordo com a seguinte equação:

$$\theta(\pi) = \sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j d_{ij}$$

onde k é o número de seqüências distintas, p_i é a freqüência de cada seqüência, p_j é a freqüência de cada espécie e, d_{ij} é o número de diferenças entre duas seqüências. Todos os cálculos de diversidade genética foram realizados com o auxílio do programa Arlequin ver. 3.0 para a análise de dados de populações genéticas (Excoffier et al., 2005).

3.3.8 Números de acesso das seqüências de nucleotídeos

Todas as seqüências do gene *nifH* obtidas neste estudo foram enviadas ao Banco de Genes NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e receberam os números de acesso: DQ425209 a DQ426510.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitas pesquisas que abordam a diversidade de bactérias diazotróficas foram baseadas no isolamento e na caracterização dos isolados por meio de procedimentos bioquímicos e/ou moleculares. Neste estudo, a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho cultivado no Estado do Rio Grande do Sul foi avaliada por meio da extração do DNA da comunidade bacteriana, amplificação, clonagem e seqüenciamento do gene *nifH*. Esse gene foi selecionado pois está presente na maioria dos sistemas biológicos capazes de fixar nitrogênio atmosférico. Além disso, tem sido reportado que a análise filogenética obtida por esse gene é largamente consistente com a filogenia do gene ribossomal do 16S (Zehr et al., 2003). O banco de dados dos genes que codificam a enzima nitrogenase está aumentando e representa atualmente o maior banco de dados não ribossomal de microrganismos não cultivados (Zehr et al., 2003). Com o objetivo de comparar a diversidade evidente em amostras de seqüências do gene *nifH* foram feitas análises da diversidade por meio da aplicação de índices ecológicos padrão de diversidade de espécies, índices de diversidade genética. Também foram feitas análises da suficiência amostral para determinar se a amostragem obtida da diversidade total das bactérias diazotróficas presentes em cada comunidade foi representativa. Embora estas análises representem um avanço nos estudos da biodiversidade de bactérias diazotróficas, deve-se salientar que os processos de extração de DNA, bem como as amplificações do gene marcador por PCR, podem exercer influência sobre os resultados obtidos (Martin-Laurent et al., 2001, Von Wintzingerode et al., 1997) e, portanto, precauções adicionais devem ser tomadas na interpretação dos resultados.

3.4.1 Análise de agrupamento baseada no polimorfismo dos fragmentos de restrição dos genes *nifH*

A amplificação do gene *nifH* com oligonucleotídeos iniciadores específicos e o corte com as endonucleases *TaqI* e *HaeIII* produziu um número variável de fragmentos nas diferentes amostras analisadas (Figura 2). A enzima *TaqI* produziu em média 5 fragmentos e este número variou de 3 a 8 (desvio padrão = 1.23) dependendo da comunidade analisada. A enzima *HaeIII* produziu uma média de 5 fragmentos entretanto este número variou de 2 a 10 (desvio padrão = 1,92) de acordo como a comunidade analisada. Ambas endonucleases produziram fragmentos menores do que 300pb.

A análise filogenética mostrou que a comunidade de bactérias diazotróficas endofíticas associada às plantas de milho foi agrupada em dois grandes grupos com 50% de similaridade. O grupo I (Figura 2) correspondeu às seqüências que foram amostradas na região norte do Rio Grande do Sul e o grupo II correspondeu às seqüências amplificadas do DNA extraído das amostras pertencentes à região sul do Estado.

3.4.2 Análise da suficiência amostral

De acordo com Hughes et al. (2001), em uma comunidade, o número de tipos de organismos observados aumenta com o aumento no número de amostras tomadas até que todos os tipos presentes sejam observados. Uma forma de saber se a amostragem foi suficiente para revelar a diversidade total de uma comunidade é por meio da plotagem de curvas de extinção. Para o cálculo de tais curvas necessitam-se dados quantitativos e qualitativos de todas as seqüências amostradas dentro de uma comunidade (Chelius & Triplett, 2000) bem como dos resultados médios obtidos pela re-amostragem aleatória do número acumulativo dos tipos observados versus o número total de amostras tomadas. Considerando que nenhuma das manipulações do DNA exerceu influência sob os resultados obtidos, então as curvas de extinção irão refletir a diversidade taxonômica do ecossistema amostrado (Stackebrandt & Goebel, 1994).

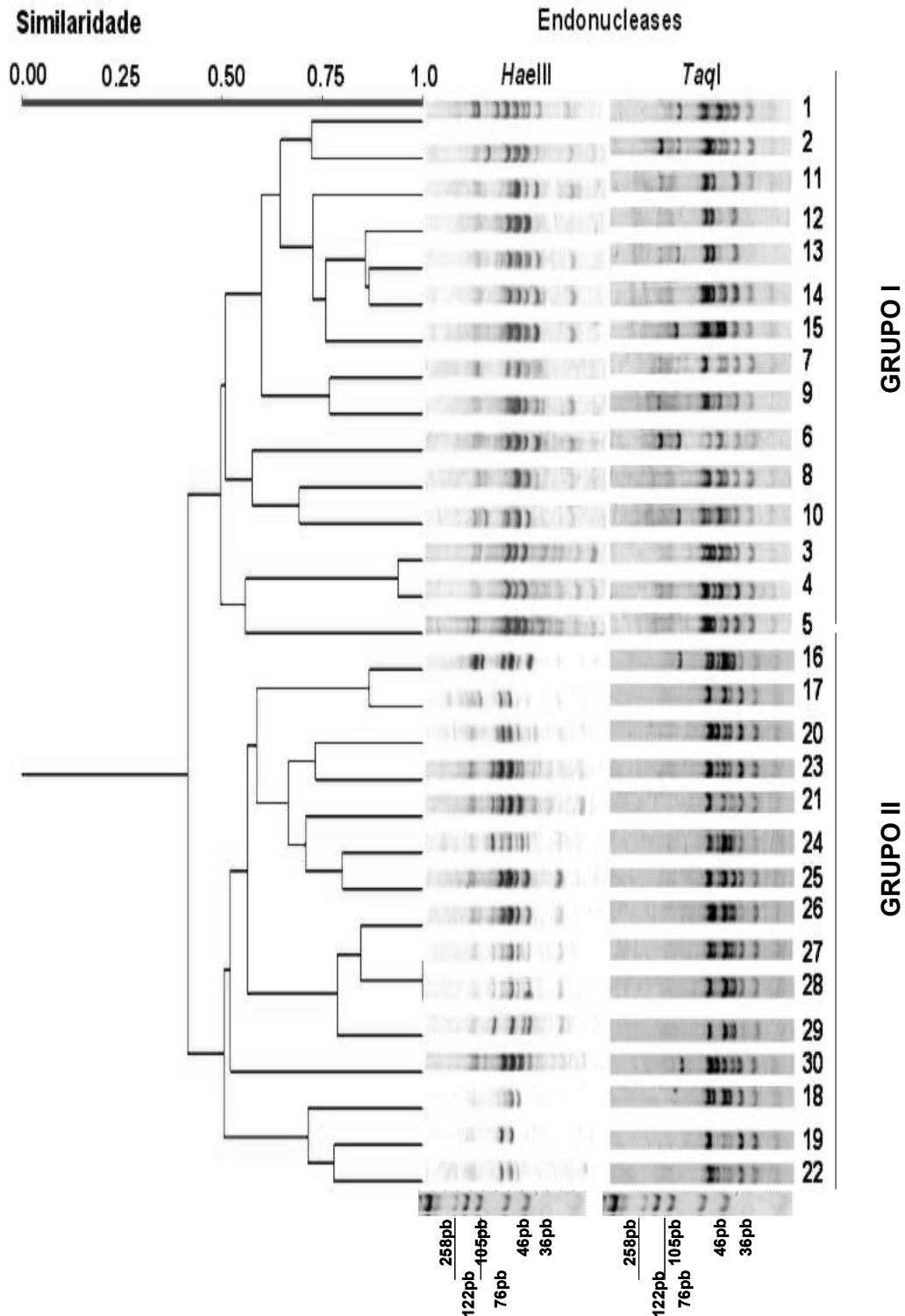


FIGURA 2. Dendrograma mostrando a análise de agrupamento baseada no polimorfismo dos fragmentos de restrição dos genes *nifH* amplificados a partir do DNA bacteriano extraído do colmo de milho cultivado em diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul após análise de agrupamento baseada na presença/ausência dos fragmentos de restrição. Grupo I – Região norte do Estado do RS, Grupo II – Região sul do Estado do RS.

Curvas de extinção e cálculos da representatividade da amostragem fornecem uma estimativa quantitativa relacionada ao tamanho da amostra e do quanto esta refletiu a diversidade aparente dentro de uma comunidade. Neste trabalho, todas as curvas de extinção tenderam a atingir um platô usando 97% de similaridade como critério de agrupamento (Figura 3) indicando que o número de clones seqüenciados se aproximou do número total de indivíduos presentes dentro da comunidade amostrada. Os cálculos da representatividade da amostragem também indicaram que uma grande porcentagem das seqüências foi amostrada. A representatividade variou de 87% (amostra 3) a 97% (amostras 23 e 25) sendo a representatividade média igual a 93,4%. Neste estudo, o número de clones seqüenciado foi suficiente para revelar o número total de espécies dentro de cada comunidade avaliada. Uma vez que foi obtida uma amostragem representativa, foi possível realizar as análises subseqüentes de comparação entre comunidades e das diferenças na diversidade genética.

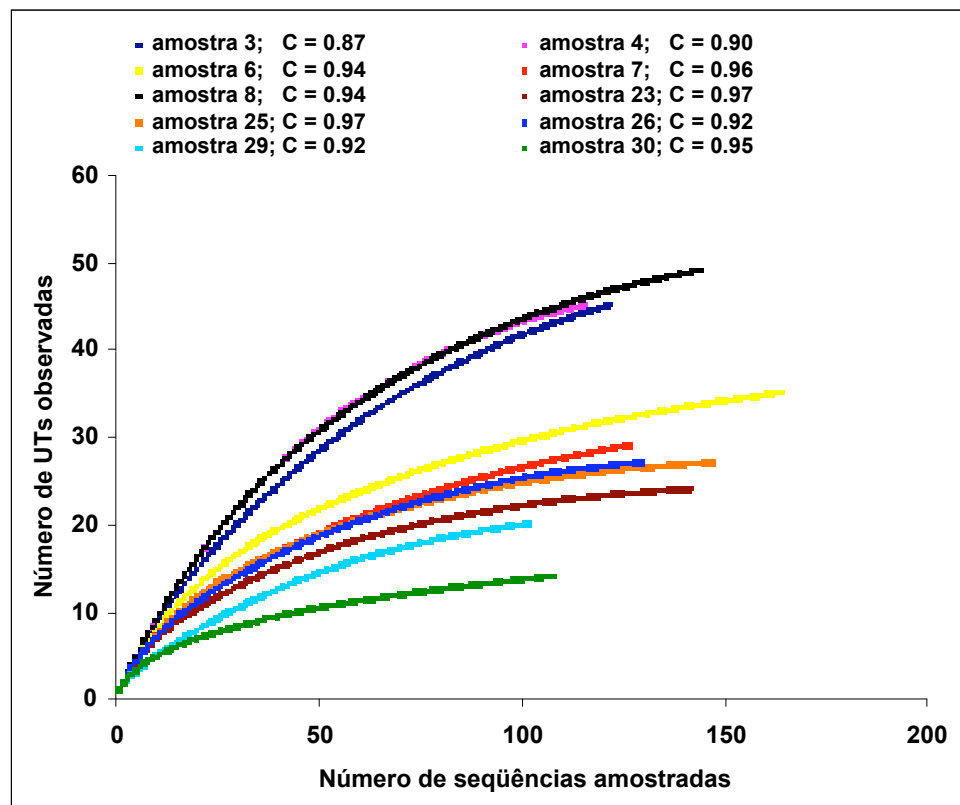


FIGURA 3. Curvas de extinção calculadas pelo programa DOTUR usando 97% de similaridade para o agrupamento das seqüências do gene *nifH* de 10 amostras coletadas nas regiões II e V do Estado do Rio Grande do Sul (C = representatividade da amostragem).

3.4.3 Diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas associadas ao milho

Com o objetivo de confirmar a diferenciação entre as comunidades microbianas fixadoras de nitrogênio detectada pela análise de restrição do gene *nifH* nas diferentes regiões geográficas amostradas, foram selecionadas 10 amostras para a clonagem e o seqüenciamento dos genes. Foram selecionadas cinco amostras da região II e cinco amostras de região V (Figura 1, Tabela 1) as quais apresentaram os maiores contrastes relacionados ao clima e ao tipo de solo.

O número de espécies (UTs) detectadas a 97% de similaridade variou de 49 (amostra 8) a 29 (amostra 7) para as amostras coletadas na região II, e de 27 (amostras 25 e 26) a 14 (amostra 30) para as amostras coletadas na região V (Tabela 2). A média do número de espécies detectada na região II foi 40 ao passo que a média do número de espécies detectadas na região V foi 22.

Para a estimativa da diversidade de espécies presentes nas comunidades analisadas foram aplicados os índices de Shannon-Weaver e Equitabilidade. O índice de Shannon-Weaver (H) é um índice geral de diversidade sensível a riqueza e a abundância relativa de espécies (Atlas & Bartha, 1998). Equitabilidade indica se há o domínio de uma população na comunidade amostrada. A média do índice de Shannon-Weaver foi maior para a região II (3,29) em relação a região V cujo valor médio calculado foi de 2,35 (Tabela 2). A comunidade presente na amostra número oito apresentou a maior diversidade ($3,65 \pm 0,25$) enquanto que a comunidade presente na amostra 30 apresentou a menor diversidade ($1,83 \pm 0,42$). Com relação a Equitabilidade (E), observou-se que para a região II os valores calculados variaram de 0,937 (amostra 8) a 0,816 (amostra 7) e a média geral foi de 0,891. Para a região V os valores de equitabilidade variaram de 0,852 (amostra 25) a 0,617 (amostra 29) e a média geral foi de 0,757. Tais resultados sugerem que a diversidade de espécies foi diferente entre as duas regiões avaliadas e que a região II, localizada ao norte do Estado, tendeu a apresentar maior diversidade quando comparada com a região V, localizada ao sul do Estado.

TABELA 2. Índices de diversidade genética e de espécies entre as comunidades de duas diferentes regiões climáticas do Estado do Rio Grande do Sul.

| Número amostra | Diversidade genética | Diversidade nucleotídeos | $\theta(\pi)$ | S | H | E |
|----------------|----------------------|--------------------------|----------------|----|-------------|-------|
| Região II | | | | | | |
| 3 | 0,875 ± 0,02 | 0,413 ± 0,19 | 169,02 ± 80,59 | 45 | 3,42 ± 0,36 | 0,898 |
| 4 | 0,951 ± 0,01 | 0,220 ± 0,10 | 186,63 ± 89,67 | 45 | 3,60 ± 0,28 | 0,945 |
| 6 | 0,916 ± 0,02 | 0,287 ± 0,13 | 148,75 ± 71,45 | 35 | 3,07 ± 0,29 | 0,863 |
| 7 | 0,906 ± 0,01 | 0,297 ± 0,14 | 185,23 ± 88,16 | 29 | 2,75 ± 0,38 | 0,816 |
| 8 | 0,977 ± 0,01 | 0,375 ± 0,17 | 167,64 ± 80,43 | 49 | 3,65 ± 0,25 | 0,937 |
| Região V | | | | | | |
| 23 | 0,631 ± 0,05 | 0,146 ± 0,07 | 94,41 ± 45,37 | 24 | 2,56 ± 0,36 | 0,805 |
| 25 | 0,813 ± 0,03 | 0,221 ± 0,10 | 124,01 ± 59,46 | 27 | 2,81 ± 0,31 | 0,852 |
| 26 | 0,569 ± 0,07 | 0,141 ± 0,06 | 93,38 ± 45,02 | 27 | 2,71 ± 0,39 | 0,822 |
| 29 | 0,653 ± 0,02 | 0,144 ± 0,07 | 57,64 ± 27,96 | 20 | 1,85 ± 0,61 | 0,617 |
| 30 | 0,460 ± 0,07 | 0,254 ± 0,12 | 149,21 ± 71,11 | 14 | 1,83 ± 0,42 | 0,693 |

$\theta(\pi)$: variação genética total dentro da comunidade; S: número de espécies; H: Shannon-Weaver; E: Equitabilidade.

Para a análise genética das populações amostradas foram feitos cálculos da diversidade genética das comunidades, diversidade de nucleotídeos, variação genética total dentro da comunidade $\theta(\pi)$ e variação genética total entre as comunidades (F_{ST}). As estimativas de diversidade de nucleotídeos e os valores de $\theta(\pi)$ não foram significativamente diferentes entre os locais amostrados (Tabela 2). Embora ambas análises tenham apresentado variação nos valores calculados para algumas das amostras, as 10 comunidades analisadas exibiram valores aproximadamente idênticos de diversidade de nucleotídeos e variação genética total dentro da comunidade.

A estimativa da diversidade genética das comunidades variou entre as duas regiões analisadas sendo que, em média, a diversidade genética das amostras coletadas na região II foi maior do que a diversidade genética das amostras coletadas na região V (Tabela 2). Em concordância com os resultados obtidos pelo cálculo do índice de Shannon-Weaver. A comunidade presente na amostra 8 apresentou maior índice diversidade genética ($0,977 \pm$

0,01) ao passo que a comunidade presente na amostra 30 apresentou a menor diversidade genética ($0,460 \pm 0,07$).

Para a avaliação das diferenças das seqüências de nucleotídeos entre as comunidades foi aplicado o teste F_{ST} . Com base nos valores de F_{ST} calculados para cada par de amostras foi construído um dendrograma utilizando o algoritmo UPGMA (Figura 4). Por meio deste dendrograma pode-se observar a presença de quatro grupos distintos formados de acordo com a região geográfica da qual as amostras foram retiradas. O grupo I foi formado pelas amostras três, oito e sete (região II), o grupo II foi formado pelas amostras quatro e cinco (região II), O grupo III foi formado pelas amostras 23 e 25 (região V) e finalmente o grupo IV foi formado pelas amostras 26, 29 e 30 (região V).

Para confirmar as diferenças na diversidade genética observada entre as regiões II e V, as seqüências do gene *nifH* das cinco amostras de cada região foram combinadas e aplicados os teste F_{ST} e P considerando cada região como uma única grande amostra. A diversidade genética das regiões norte e sul foram significativamente diferentes em nível de 0,05 de probabilidade ($F_{ST} = 0,130$; $P < 0,00001$).

De acordo com Martin (2002), cálculos de índices de diversidade de espécies padrão em ecologia microbiana, como o índice de Shannon-Weaver, por exemplo, podem não revelar a diferenciação genética real entre duas comunidades. Entretanto, o uso de tais índices foram complementares aos índices de diversidade genética aplicados neste estudo. O índice de Shannon-Weaver indicou uma grande diferença em termos de diversidade de espécies entre comunidades bem como indicou que as comunidades de bactérias diazotróficas endofíticas presentes na região norte do Estado tenderam a apresentar uma maior diversidade do que as comunidades presentes na região sul. Embora tenham sido observadas tais diferenças, o índice de equitabilidade, que apresentou valores próximos a um, demonstrou que havia a dominância de determinadas espécies dentro de cada comunidade analisada independentemente da região amostrada.

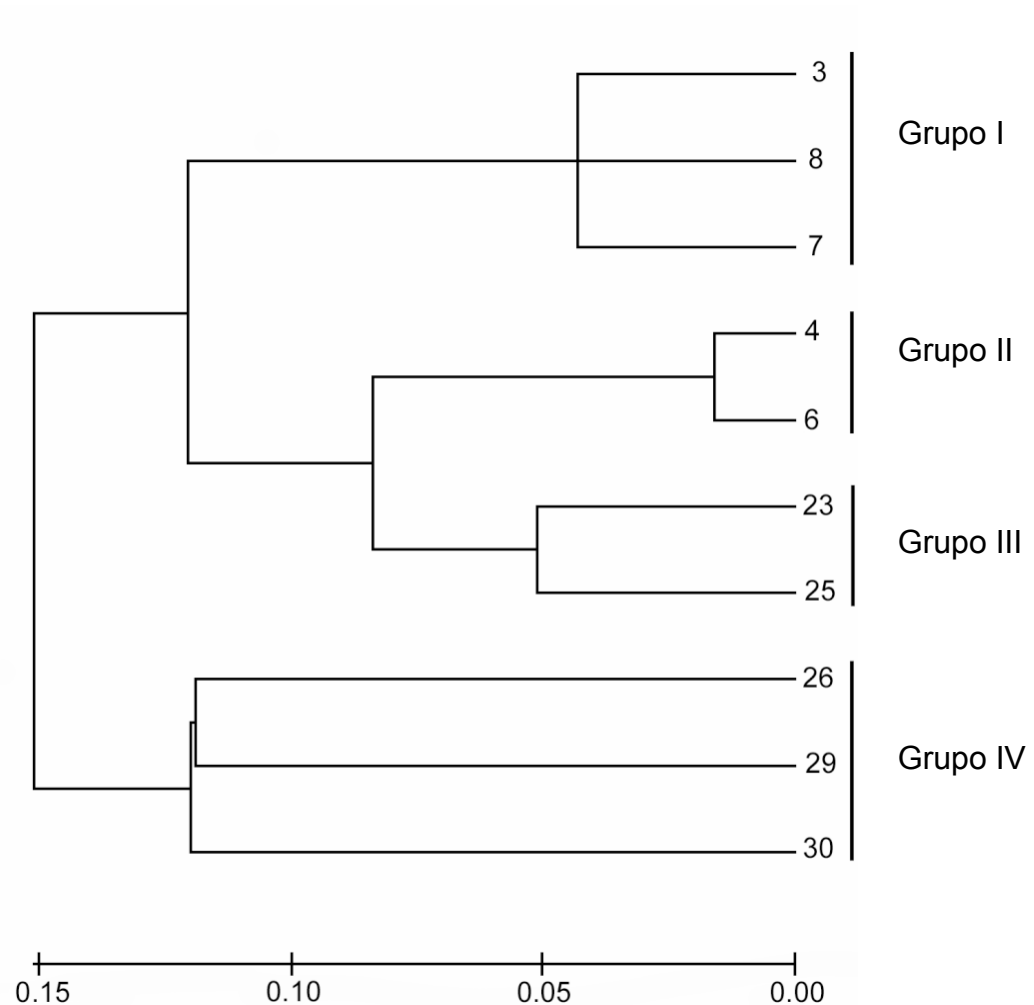


FIGURA 4. Dendrograma mostrando a relação entre os valores de F_{ST} das comunidades de bactérias diazotróficas endofíticas de diferentes regiões climáticas do Estado do Rio Grande do Sul. Os valores de F_{ST} foram significativamente diferentes em nível de 0,05 usando 1.000 permutações.

Com base na análise dos resultados verificou-se uma maior variação entre as comunidades do que dentro de cada comunidade. As bactérias diazotróficas endofíticas analisadas exibiram uma grande diferença particularmente entre comunidades amostradas de diferentes tipos de solo, regime hídrico e regiões geográficas. Tal variação mostrou-se dependente do ecossistema avaliado demonstrando uma forte influência regional sobre as bactérias diazotróficas endofíticas. Diversos aspectos, incluindo solo e clima podem ter contribuído para a determinação destas diferenças. De acordo com Poly et al. (2001), características físicas e químicas do solo tais como textura,

carbono total e o conteúdo de nitrogênio podem ser correlacionadas com as diferenças na estrutura genética dos grupos de genes *nifH*. Tan et al. (2003), também relataram que fatores ambientais como tipo de solo e regime hídrico são fatores determinantes da estrutura da comunidade de diazotróficos. Se a comunidade de bactérias endofíticas é representada por uma fração da comunidade microbiana presente no solo (Seghers et al., 2004), então a composição da comunidade endofítica será determinada pelas influências ambientais e a especificidade entre microrganismo e hospedeiro. As diferenças com relação aos tipos de solo coletados neste estudo, relacionadas principalmente a textura, quantidade e qualidade da matéria orgânica, podem ter influenciado na diversidade de diazotróficos endofíticos associados ao milho. A disponibilidade de água, a qual representa uma das maiores diferenças climáticas entre as regiões norte e sul do Rio Grande do Sul, foi também um importante fator na determinação da diversidade dos diazotróficos. Recentemente, Yannarell & Triplett (2005) identificaram diversos fatores ambientais que influenciaram a composição da comunidade bacteriana em lagos localizados em Wisconsin - EUA. Em adição, a variabilidade entre as comunidades avaliadas pelos pesquisadores foi explicada pela região climática e pela situação geográfica da região. Os resultados obtidos sugerem que diferenças regionais podem influenciar a comunidade bacteriana e para a obtenção de uma melhor exploração do potencial das bactérias diazotróficas, uma perspectiva regional pode ser uma importante consideração.

3.4.4 Identificação das bactérias diazotróficas endofíticas associadas ao milho

As seqüências do gene *nifH* obtidas neste estudo foram submetidas a análises comparativas com as seqüências depositadas do banco genômico do NCBI usando a ferramenta Blast. A pesquisa foi realizada utilizando-se a função Blast nucleotídeo-nucleotídeo (Blastn) comparando seqüências de DNA não redundantes do banco de dados. Foram detectadas seqüências pertencentes as classes α -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* e β -*Proteobacteria*. De acordo do as análises comparativas, foram encontradas diversas

seqüências similares (similaridade >90%) e até mesmo idênticas às espécies bacterianas: *Alcaligenes faecalis* (X96609); *Azoarcus indigenus* (U97118); *Azohydromonas australica* (AB188121); *Azohydromonas lata* (AB201627); *Azomonas agilis* (AF216883); *Azonexus fungiphilus* (DQ029204); *Azonexus* sp. (DQ029203); *Azospirillum brasilense* (X51500); *Azospirillum lipoferum* (AY786992); *Azospirillum oryzae* (AB185395); *Azotobacter vinelandii* (M20568); *Bradyrhizobium elkanii* (AB094963); *Bradyrhizobium japonicum* (AJ563961); *Bradyrhizobium* sp. (AB079616); *Burkholderia vietnamiensis* (AM110718); *Dechloromonas* sp. (AJ563286); *Delftia tsuruhatensis* (AY544164); *Herbaspirillum seropedicae* (Z54207); *Herbaspirillum* sp. (AB196476); *Ideonella* sp. (AY231580); *Klebsiella pneumoniae* (AY242355); *Klebsiella pneumoniae* (X13303); *Klebsiella variicola* (AY367395); *Methylosinus trichosporium* (AJ563953); *Pelomonas saccharophila* (AB188120); *Pseudomonas stutzeri* (AJ297529); *Raoultella terrigena* (AY367396); *Rhodobacter azotoformans* (AB079621); *Rhodovulum strictum* (AB079628); *Sinorhizobium* sp. (AJ505315); *Xanthobacter flavus* (AY221812). Adicionalmente, seqüências altamente similares entre si foram encontradas em regiões de solo e clima distintos. As espécies detectadas com maior freqüência dentro das comunidades analisadas foram *Azospirillum brasilense* e *Klebsiella pneumoniae*.

Conforme esperado, a análise filogenética (Figura 5) demonstrou que todas as seqüências amostradas foram agrupadas no grupo dos organismos que apresentam o gene *nifH* anteriormente classificado como *nifH* grupo I (Chien & Zinder, 1996; Zehr et al., 2003; Steward et al., 2004). Este grupo consiste principalmente em seqüências do gene *nif* pertencentes a Cianobactérias, Firmicutes e Proteobactérias que, coletivamente, representam o grupo de nitrogenases mais bem estudadas (Raymond et al., 2004). Em concordância com a pesquisa realizada pela ferramenta Blast, as seqüências do gene *nifH* grupo I foram em sua maioria agrupadas dentro do filo das Proteobactérias e Firmicutes. Entretanto não foram detectadas seqüências pertencentes ao filo das Cianobactérias nem a classe epsilon-proteobacteria.

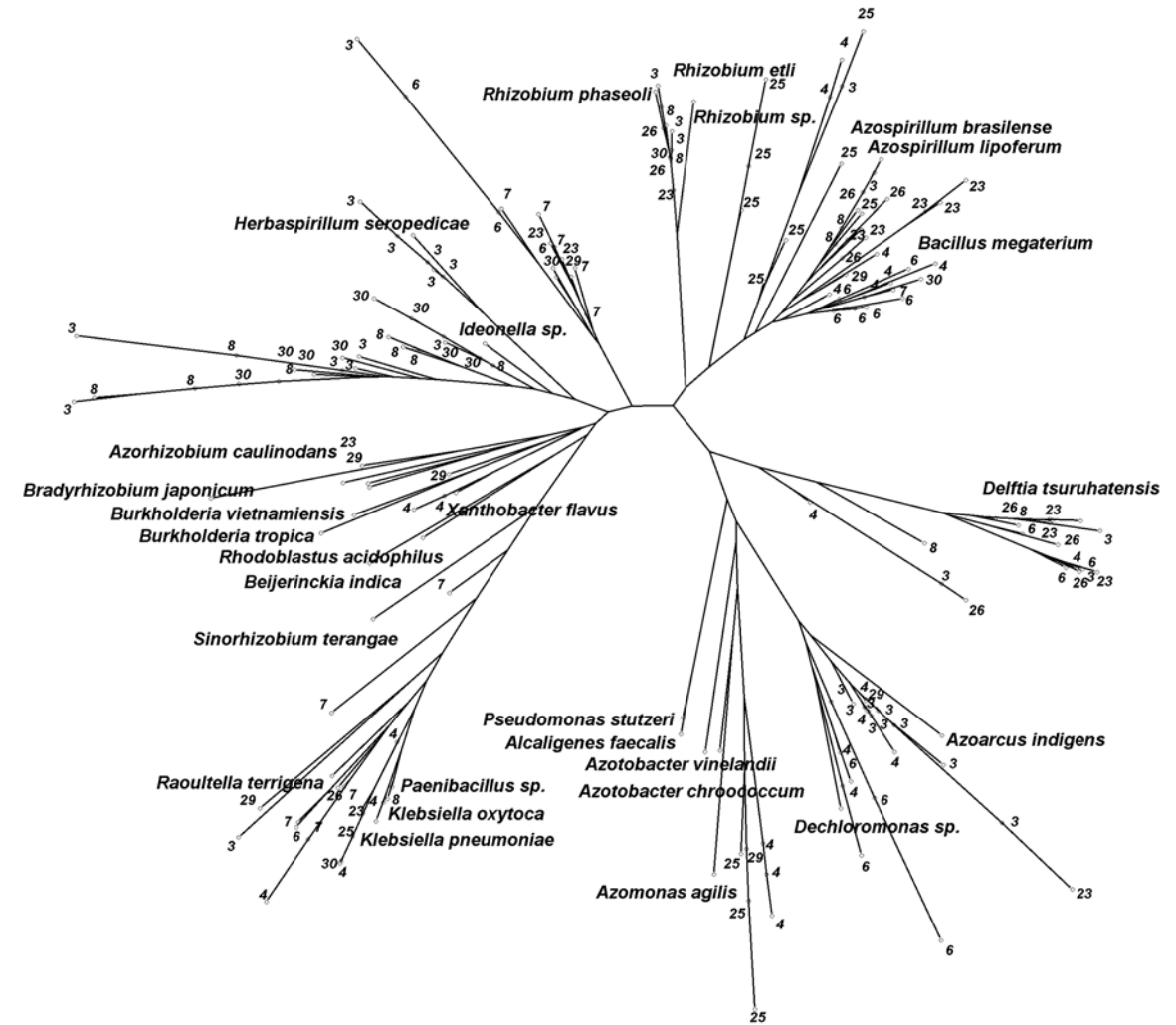


FIGURA 5. Árvore filogenética das seqüências representativas do gene *nifH* amplificadas a partir do DNA de bactérias endofíticas extraído do colmo de plantas de milho cultivado em diferentes regiões climáticas do Estado do Rio Grande do Sul e seqüências de referência do gene *nifH* de bactérias cultivadas removidas do Banco de Genes. Filogenia inferida usando o algoritmo do vizinho mais próximo. Árvore consenso gerada pelo programa Splits Tree 4 (Huson & Bryant, 2006). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos.

Embora seqüências do gene *nifH* das Proteobactérias correspondam aproximadamente com a filogenia observada pela análise de seqüências do gene ribossomal do 16S, alguns microrganismos cultivados não foram agrupados no seu respectivo filo (Figura 5) indicando que a análise filogenética dos genes *nifH* de alguns representantes cultivados deste grupo não apresentam consistência com a classificação filogenética baseada no 16S (Raymond et al., 2004). De acordo com Zehr et al. (2003), os grupos formados pelas classes gamma e alphaproteobacteria são geralmente bem definidos, porém existem alguns microrganismos cultivados que não se agrupam de forma consistente por meio da análise filogenética baseada no gene *nifH*. Além disso, muitos microrganismos apresentam múltiplas cópias dos genes que codificam a enzima nitrogenase ou enzimas homólogas que são classificadas em diferentes grupos filogenéticos (Zehr et al., 2003). A maioria das seqüências amplificadas diretamente do colmo de milho apresentou similaridade com seqüências de bactérias cultivadas, entretanto, algumas seqüências não foram consistentemente relacionadas a estes microrganismos sugerindo a existência de bactérias diazotróficas endofíticas não identificadas associadas ao milho.

Embora os índices de diversidade tenham demonstrado diferenças relacionadas às regiões de coleta das amostras, alguns gêneros bacterianos tais como *Klebsiella* e *Azospirillum* parecem ser bactérias endofíticas comumente associadas ao milho já que ambos os gêneros foram encontrados em praticamente todas as comunidades analisadas independente da região de coleta das amostras. Ambos os gêneros já foram detectados em associação com plantas de milho em muitos estudos, incluindo estudos baseados em cultivo e isolamento (Baldani & Döbereiner, 1980; Baldani et al., 1986; Palus et al., 1996) bem como estudos baseados em técnicas independentes de cultivo (Chelius & Triplett, 2001). Tem sido reportado que bactérias do gênero *Azospirillum* podem colonizar o interior de diversas gramíneas e cereais (Reis et al., 2000) e que bactérias do gênero *Klebsiella* podem colonizar o interior de plantas de trevo vermelho (Sturz et al., 1998), videiras (Bell et al., 1995), arroz (Elbeltagy et al., 2000) e batata doce (Reiter et al., 2003).

Seqüências do gene *nifH* pertencentes a microrganismos do gênero *Rhizobium* também foram encontrados no interior das plantas de milho. O

aumento no crescimento do milho devido à produção de fitohormônios excretados por bactérias do gênero *Rhizobium* já foi constatado (Chabot et al., 1996; Schloter et al., 1997). Tais microrganismos também tem sido detectados no interior de outras plantas não leguminosas como batata doce (Reiter et al., 2003), arroz (Boddey et al., 1995) e algodão (Doty et al., 2005). Todas as amostras de colmo de milho foram coletadas em lavouras cultivadas no sistema de semeadura direta, onde os resíduos das culturas do ano anterior são depositados na superfície do solo. Esta técnica de manejo do solo ainda envolve sistemas de rotação de culturas com plantas leguminosas, o que pode explicar o grande número de seqüências similares ao gênero *Rhizobium* colonizando o interior das plantas de milho. Em concordância com os resultados obtidos neste estudo, Gutiérrez-Zamora & Martínez-Romero (2001) detectaram a presença de isolados de *R. etli* colonizando o interior de plantas de milho cultivadas em consórcio com feijão em solos do México que apresentavam baixa disponibilidade de nutrientes. A espécie diazotrófica *Rhizobium tropici* isolado CIAT899, utilizada com sucesso na inoculação de *Phaseolus vulgaris*, também foi reconhecida por Rosenblueth & Martínez-Romero (2004) como uma espécie endofítica competitiva capaz de se associar a plantas de milho em experimentos de inoculação o que demonstra que estes organismos estão naturalmente associados ao milho. Uma fonte potencial de bactérias edofíticas pode ser encontrada nos solos e em resíduos culturais depositados no solo. Assim, um efeito adicional pode ser incluído na já bem conhecida lista de benefícios do sistema de semeadura direta e da rotação de culturas (Welbaum et al., 2004) que é o armazenamento de populações residuais de bactérias endofíticas capazes de promover o crescimento das plantas.

3.5 CONCLUSÕES

Este estudo revelou que influências geográficas e ambientais podem gerar a associação de diferentes bactérias diazotróficas endofíticas com plantas de milho. Ocorreu uma menor diversidade na distribuição das seqüências do gene *nifH* na região sul do Rio Grande do Sul a qual apresenta uma reduzida distribuição de chuva (1500 mm por ano) e cujos solos contém um baixo teor de argila ($\sim 190 \text{ gkg}^{-1}$ de solo em média) em comparação com a região norte do Estado que apresenta maior distribuição de chuva (1800 mm por ano) e maiores teores de argila no solo ($\sim 504 \text{ gkg}^{-1}$ de solo em média). Apesar disso, diversas seqüências do gene *nifH* similares ou até mesmo idênticas entre si foram detectadas em plantas cultivadas em regiões de clima e solo distintas indicando que a presença de certas espécies de bactérias diazotróficas endofíticas independe do ambiente (*Azospirillum brasilense* e *Klebsiella pneumoniae* foram detectados em todas as comunidades analisadas independente da região de coleta). Os resultados apresentados demonstram o valor de uma perspectiva regional na exploração do potencial de bactérias diazotróficas associadas ao milho.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology**: fundamentals and Applications. 4th ed. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1998. 694p.

BALDANI, J.I. et al. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb nov; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, Washington, v. 46, n.3, p. 802-810, 1996.

BALDANI, V.L.D. et al. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 90, n. 3, p. 35-46, 1986.

BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980.

BASHAN, Y. et al. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004.

BELL, C.R. et al. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, n.1, p. 46-53, 1995.

BODDEY, R.M. Biological nitrogen-fixation associated with sugarcane and rice - contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, n.2, p. 195-209, 1995.

BURGMANN, H. et al. New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 240-247. 2004.

CHABOT, R. et al. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n.8, p. 2767-2772, 1996.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.

CHIEN, Y.T.; ZINDER, S.H. Cloning, functional organization, transcript studies, and phylogenetic analysis of the complete nitrogenase structural genes (*nifHDK*) and associated genes in the archaeon *Methanosarcina barkeri* 227. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 1, p. 143–148, 1996.

DOBBELAERE, S. et al. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 22, n. 2, p.107-149, 2003.

DOTY, S.L. et al. Identification of an endophytic *Rhizobium* in stems of *Populus*. **Symbiosis**, Rehovot, v. 39, n. 1, p. 27-35, 2005.

ELBELTAGY, A. et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 46, n. 3, p. 617-629, 2000.

EXCOFFIER, L. et al. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, Auckland, v. 1, n. 1, p. 47-50, 2005.

FALSENSTEN, J. PHYLIP-Phylogeny inference package (version 3.2). **Cladistics**, Oxford, v. 5, n.1, p. 164 – 166, 1989.

GUTIERREZ-ZAMORA, M.L.; MARTINEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, n. 3, p. 117-126, 2001.

HUGHES, J.B. et al. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 4399-4406, 2001.

HUSON, D.H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 254-267, 2006.

INIGUEZ, A. L. et al. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Minnesota, v. 17, n.10, p. 1078-1085, 2004.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, n. 1, p. 77-119, 1997.

KUMAR, S. et al. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Birmingham, v. 5, n. 2, p. 150-163, 2004.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002.

MARTIN, A. P. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p. 3673-3682, 2002.

MARTIN-LAURENT, F. et al. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 9, p. 2354–2359, 2001.

MULLINS T.D. et al. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. **Limnology and Oceanography**, Lawrence, v. 40, n. 1, p. 148–158, 1995.

OLIVARES, F.L. et al. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soil**, New York, v. 21, n. 3, p. 197-200, 1996.

PALUS, J.A. et al. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Illis and *Doebley*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 186, n. 1, p. 135-142, 1996.

POLY, F. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2255-2262, 2001.

RAYMOND, J. et al. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.

REIS, V.M. et al. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 19, n. 3, p. 227-247, 2000.

REITER, B. et al. Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 49, n. 9, p. 549-555, 2003.

RIGGS, P.J. et al. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 28, n. 9, p. 829-836, 2001.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. **Archives of Microbiology**, New York, v. 181, n.5, p. 337-344, 2004.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v. 71, n. 3, p. 1501-1506, 2005.

SCHLOTTER, M. et al. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 5, p. 2038-2046, 1997.

SCHRANK, I. S. Construction of a gene library from *Azospirillum brasilense* and characterization of a recombinant containing the Nif structural genes. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 4, p. 321-330, 1987.

SEGHERS, D. et al. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 3, p. 1475-1482, 2004.

SOARES, R.A. et al. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 221-234, 2006.

STACKBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 24, n.4, p. 487-506, 2000.

STEWART, G.F. et al. Development and testing of a DNA macroarray to assess nitrogenase (*nifH*) gene diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 3, p. 1455-1465, 2004.

STURZ, A. V. et al. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, n. 2, p. 162-167. 1998.

TAN, X.Y. et al. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. **Environmental Microbiology**, New York, v. 5, n. 10, p. 1009-1015, 2003.

TEDESCO, L.M. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174p.

THULER, D.S. et al. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp in chemically defined media. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 174-178, 2003.

THOMPSON, J. D., et al. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 25, n. 24, 4876-4882, 1997.

VON WINTZINGERODE, F. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 213–229, 1997.

WELBAUM, G.E. et al. Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 23, n. 2, p. 175-193, 2004.

WIDMER, F. et al. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 2, p. 374-380, 1999.

YANNARELL, A.C.; TRIPLETT, E.W. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 1, p. 227-239, 2005.

ZEHR, J.P.; MC REYNOLDS, L.A. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine Cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 10, p. 2522-2526, 1989.

ZEHR, J.P. et al. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, New York, v. 5, n. 7, p. 539-554, 2003.

CAPÍTULO III

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA INTERFACE SOLO- RAÍZ-COLMO DE PLANTAS DE MILHO

4.1 RESUMO

Para a descrição da comunidade de bactérias diazotróficas associadas às plantas e ao solo rizosférico do milho, o presente estudo realizou a clonagem e seqüenciamento de um grande número de fragmentos do gene *nifH* gerados pela amplificação do DNA extraído das bactérias do solo, raízes e colmo de plantas de milho cultivado em seis lavouras de diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul. O objetivo do trabalho foi comparar a diversidade de bactérias diazotróficas entre os diferentes locais amostrados bem com descrever a comunidade de bactérias diazotróficas que apresentam o gene *nifH* grupo I (representantes dos filos Proteobacteria, Cyanobacteria e Firmicutes) capazes de colonizar as plantas e o solo rizosférico do milho. Com base nas seqüências parciais obtidas foram feitas análises de suficiência amostral e cálculos de índices de diversidade de espécies e diversidade genética. As análises aplicadas neste estudo indicaram consistentemente que o solo da rizosfera apresentou maior diversidade de bactérias diazotróficas em relação às raízes e o colmo do milho. A classificação taxonômica baseada em análises comparativas do gene *nifH* revelou grande dominância de bactérias diazotróficas pertencentes as classes Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria. Apenas dois gêneros bacterianos, *Azospirillum* e *Azotobacter*, foram detectados em todas as amostras em abundância superior a 1% do total das seqüências do gene *nifH* obtidas. Alguns gêneros bacterianos foram detectados restritamente no solo (*Methylocystis*, *Beijerinckia*, *Geobacter*, *Rhodovulum*, *Methylobacterium*, *Gluconacetobacter*, *Methylocella*, e *Delftia*) nas raízes (*Dechloromonas*) e no colmo (*Methylosinus*, *Raoultella*, e *Rhizobium*) ao passo que três gêneros, *Herbaspirillum*, *Ideonella* e *Klebsiella* foram dominantes no interior das plantas, porém muito raros no solo.

4.2 INTRODUÇÃO

Grande parte do nitrogênio fixado presente nos ecossistemas aquáticos e terrestres é proveniente da fixação biológica do nitrogênio. Em solos agrícolas, a exceção das adições antrópicas, as comunidades diazotróficas são responsáveis pela principal fonte de aporte de nitrogênio. A exploração da fixação biológica do nitrogênio oferece uma fonte de N não poluente podendo promover o crescimento das plantas e diminuir o uso global de fertilizantes sintéticos. Neste sentido, estimativas da diversidade e da riqueza de espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio são de grande importância, pois servem de base para o conhecimento da função e do potencial das comunidades bacterianas (Hong et al., 2006). Tais estimativas podem ser utilizadas na melhoria das técnicas de manejo do solo que tenham por objetivo a exploração da biodiversidade como alternativa não poluente aos fertilizantes sintéticos.

Embora avanços significativos tenham sido obtidos no entendimento da diversidade das bactérias diazotróficas, uma completa descrição da comunidade de microrganismos fixadores de nitrogênio que vive no solo ou em associação com gramíneas ainda permanece desconhecida. Por exemplo, essas bactérias estão presentes no solo e podem penetrar o tecido das plantas sobrevivendo endofiticamente ou elas foram transmitidas via semente? Se tais organismos forem derivados do solo então se espera encontrá-los simultaneamente em amostras de solo e no interior das plantas. Esta questão é de particular interesse, pois tem sido reportado que bactérias diazotróficas endofíticas podem fixar nitrogênio atmosférico e fornecê-lo a planta hospedeira (Sturz, 2000; Coking, 2003). Em adição, bactérias diazotróficas não simbióticas podem promover benefícios econômicos e ambientais incluindo o aumento no rendimento da cultura, redução de custos pela diminuição do uso de fertilizantes sintéticos e redução da emissão de gases de efeito estufa (N₂O)

bem como redução da lixiviação de nitratos para águas sub-superficiais (Kennedy et al., 2004).

Muitos estudos que abordam a diversidade de bactérias diazotróficas são baseados em técnicas convencionas de cultivo e de identificação de bactérias. Entretanto, o cultivo *in vitro* de microrganismos fornece apenas informações limitadas sobre a diversidade dos diazotróficos uma vez que a maioria dos microrganismos existentes não é facilmente cultivável (Pace et al. 1986).

Atualmente, existe um certo consenso entre os ecologistas microbianos de que a chave para estimar a diversidade é evitar o estudo dos microrganismos em si e sim focalizar os estudos no DNA microbiano (Curtis & Sloan, 2005). As técnicas de biologia molecular utilizadas no estudo da diversidade de organismos diazotróficos são principalmente baseados na amplificação de um gene marcador para a fixação biológica do nitrogênio, que geralmente é o gene *nifH*. A maioria dos organismos diazotróficos apresentam o gene *nifH* que codifica a subunidade Fe-proteína da enzima nitrogenase (Zehr & Capone, 1996). Adicionalmente, as análises filogenéticas baseadas no gene *nifH* apresentam resultados semelhantes a filogenia baseada no gene ribossomal do 16S e o banco de dados dos genes que codificam a enzima nitrogenase tem aumentado significativamente nos últimos anos tornando-se um dos maiores bancos de dados de genes não ribossomais de microrganismos não cultivados (Zehr et al., 2003). Desta forma, a análise da diversidade dos genes *nifH* permite a representação da diversidade taxonômica e pode ser utilizada em estudos da comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio (Widmer et al., 1999; Lovell et al., 2000; Poly et al., 2001; Rösch et al., 2002; Soares et al., 2006).

De acordo com Hughes et al. (2001), levantamentos da diversidade microbiana requerem um grande número de amostras para que os resultados possam refletir a “real” diversidade da comunidade em análise. Estimativas acuradas requerem uma amostragem de cerca de 80% da comunidade, a qual é elevada para comunidades bacterianas do solo (Gans et al., 2005). Por outro lado, a análise de um grupo bacteriano específico, como as bactérias diazotróficas, pode ser bastante facilitada devido à pequena diversidade de

espécies ou a predominância de poucos representantes no ambiente em análise.

Para a descrição da comunidade de bactérias diazotróficas associada às plantas e ao solo rizosférico do milho, oligonucleotídeos iniciadores conservados foram utilizados para amplificar, fragmentos do gene *nifH* do solo, raízes e colmo de plantas de milho cultivados em seis regiões distintas do Estado do Rio Grande do Sul. Os fragmentos amplificados foram clonados e seqüenciados e as seqüências de nucleotídeos comparadas entre si e com seqüências de microrganismos conhecidos. Os objetivos principais deste trabalho foram comparar a diversidade de bactérias diazotróficas entre os diferentes locais na planta e no solo amostrados, e descrever a comunidade de bactérias diazotróficas que apresentam o gene *nifH* grupo I (representantes dos filos Proteobacteria, Cyanobacteria e Firmicutes) capazes de colonizar as plantas e o solo rizosférico do milho.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Amostragem e extração do DNA microbiano

Amostras de solo da rizosfera, raízes e colmo de milho foram coletadas em seis lavouras cultivadas sob o sistema de semeadura direta no Estado do Rio Grande do Sul (Tabela 1). O sistema de manejo do solo das lavouras amostradas ainda envolvia o sistema de rotação de culturas com leguminosas e gramíneas (soja – milho – aveia). De cada local, três sub-amostras foram coletadas e misturadas para compor uma amostra única a qual foi utilizada para a extração do DNA microbiano.

O DNA bacteriano foi extraído diretamente das amostras de solo usando o kit para extração de DNA FastDNA® (Qbiogene, Inc., Calif.). Para a extração do DNA das bactérias endofíticas das raízes e do colmo das plantas foram utilizados os procedimentos adotados por Soares et al. (2006). As raízes foram lavadas em água destilada para a remoção do excesso de solo e posteriormente desinfestadas superficialmente usando uma solução de cloramina T 1% por 15min. Após a desinfestação superficial as amostras das raízes foram lavadas três vezes em água destilada por 10min. cada lavagem. As amostras de colmo foram lavadas em água destilada e desinfestadas superficialmente em uma solução de etanol a 70% por cinco minutos. Após a extração do DNA as amostras foram purificadas usando o kit para purificação de DNA DNeasy(Qiagen, Valencia, Calif.) seguindo as instruções do fabricante.

TABELA 1. Localização das amostras de solo rizosférico, raízes e colmo de milho coletadas em seis lavouras do Estado do Rio Grande do Sul.

| Amostra | Cidade | Localização |
|---------|-----------------------|--------------------------|
| CB | Carlos Barbosa | 29°17'25" S; 51°30'46" O |
| CO | Colorado | 28°31'39" S; 52°59'37" O |
| PM | Palmeiras das Missões | 27°54'00" S; 53°19'11" O |
| B | Bagé | 31°19'38" S; 54°06'08" O |
| CG | Canguçu | 31°24'00" S; 52°40'49" O |
| CA | Candelária | 29°39'27" S; 52°48'16" O |

4.3.2 Amplificação do gene *nifH*

Os fragmentos do gene *nifH* foram amplificados utilizando “nested” PCR (Widmer et al., 1999). Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores: o primeiro par foi desenhado por Zehr & McReynolds (1989) e amplifica 359 pares de bases (pb) do gene *nifH*. Esse par foi escolhido por amplificar uma região do gene *nifH* altamente conservada entre a maioria dos procariotos fixadores de nitrogênio. O segundo par de oligonucleotídeos iniciadores foi *nifH*For (5'-ACCCGCCTGATCCTGCACGCCAAGG-3') e *nifH*Rev (5'-ACGATGTAGATTTCCCTGGGCCTTGTT-3') desenhado por Soares et al. (2006) para amplificar diversos fragmentos de seqüências do gene *nifH*, previamente denominado de *nifH* grupo I composto por microrganismos pertencentes aos filos Proteobacteria, Cyanobacteria e Firmicutes (Chien & Zinder, 1996; Zehr et al., 2003; Steward et al., 2004). O produto desta amplificação pode ser de 314 ou 317pb dependendo da espécie bacteriana. A reação de PCR foi feita utilizando uma mistura para PCR (PCR Master Mix - Promega, Madison, Wis.). Para a primeira reação de amplificação foram utilizados 25_μl da mistura de reação, 100ng de DNA purificado e 2,5_μl de cada oligonucleotídeo iniciador a uma concentração de 10_μM. A segunda reação foi feita em 50_μl da mistura de reação contendo 1_μl do produto da primeira PCR como molde. Após a desnaturação inicial que consistiu em 5 min. a 94°C, foram aplicados 30 ciclos, em ambas as reações, conforme o seguinte: desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 55°C por 45s e extensão a 72°C

por 45s e uma extensão final de 72°C por 5min. Ao final da amplificação, as amostras foram resfriadas e mantidas a 4°C. A concentração e a qualidade dos produtos amplificados foram analisadas em gel de agarose ultrapura a 1,5% (Invitrogen, Carlsbad, California).

4.3.3 Clonagem e seqüenciamento do gene *nifH*

O produto da PCR foi purificado utilizando o kit para purificação de PCR QIAquick (Qiagen, Valencia, Calif.) e posteriormente clonado usando o vetor TOPO TA Cloning® (Invitrogen, Carlsbad, Calif.). Os plasmídeos obtidos foram purificados com o kit QIAprep spin miniprep (Qiagen, Valencia, Calif.) e os fragmentos do gene *nifH* foram seqüenciados em ambas as direções utilizando os oligonucleotídeos iniciadores T7 e T3 e o kit para seqüenciamento DYEnamic ET (GE Healthcare) em um termociclador do tipo PTC200 (BioRad) em placas de 96 poços acoplado a um seqüenciador capilar do tipo MegaBACE 1000 (GE Healthcare).

4.3.4 Análise de suficiência amostral, diversidade de espécies e filogenia

A suficiência amostral e a diversidade taxonômica dos genes amplificados foram avaliadas por meio da utilização de três técnicas. Curvas de extinção foram calculadas para julgar se o número de seqüências amostradas foi suficiente para revelar a diversidade das comunidades amostradas. A estimativa da representatividade amostral foi calculada pela equação proposta por Mullins et al. (1995) onde, representatividade amostral (C) é igual a $1 - (n_1/N)$ sendo n_1 o número de seqüências que foram detectadas apenas uma vez (seqüências únicas) e N o número total de seqüências amostradas. Para a avaliação da riqueza de espécies (número de diferentes Unidades Taxonômica – UTs) foi aplicado o índice Chao1, um teste não paramétrico utilizado para a estimativa do número de espécies de uma determinada amostra. Finalmente, foram feitos cálculos de diversidade de espécies baseados no índice de Shannon-Weaver. Este índice reflete tanto o número de espécies como a

freqüência destas dentro de uma comunidade. Valores mais elevados do índice de Shannon-Weaver significam que a amostra analisada apresenta maior nível diversidade.

As seqüências de nucleotídeos obtidas neste estudo foram comparadas com todas as seqüências do banco de genes do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando Blast (Altschul et al., 1997). Para confirmar se as seqüências obtidas eram do gene *nifH* foi usado o programa Blastx, que realizou a tradução conceitual das seqüências de nucleotídeos seguida da busca pela proteína traduzida no banco de dados do NCBI. A afiliação taxonômica bacteriana foi baseada nos resultados das comparações usando Blast. Seqüências que apresentaram similaridade igual ou superior a 97% com as seqüências do gene *nifH* armazenadas no banco de dados de bactérias identificadas, foram consideradas como pertencentes a mesma espécie.

Após a edição manual para a eliminação das seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e de seqüências potencialmente incorretas, as seqüências do gene *nifH* foram alinhadas e agrupadas em unidades taxonômicas (UTs). Seqüências que apresentaram 97% de similaridades ou mais foram consideradas como pertencentes ao mesmo grupo taxonômico. O alinhamento foi realizado utilizando o programa para alinhamentos múltiplos ClustalX 1.83 (Thompson et al., 1997). Com base no alinhamento, foi construída uma matriz de distâncias usando o programa DNAdist (Felsensten, 1989) e finalmente esta matriz de distâncias foi utilizada como entrada de dados para o programa DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005) que realizou a análise de agrupamento, construção de curvas de extinção, cálculo do índice de diversidade de Shannon-Weaver ($H = -\sum (P_i \ln[P_i])$ onde P_i é o número de indivíduos de uma dada espécie dividido pelo número total de espécies observadas) e cálculo do índice Chao1 para estimativa da riqueza de espécies. Todos os programas utilizados foram aplicados usando as configurações padrão.

4.3.5 Cálculo da diversidade genética

As seqüências representativas de cada grupo formado pelo programa DOTUR que apresentavam similaridade igual ou superior a 97% foram organizadas em um arquivo de texto que foi utilizado para os cálculos da diversidade genética. O arquivo de texto foi composto por 18 grupos de seqüências do gene *nifH* (6 amostras de solo, 6 amostras de raízes e 6 amostras de colmo). Cada grupo foi composto por seqüências representativas precedidas de um número que representa a quantidade de seqüências, com similaridade $\geq 97\%$, que o grupo continha. Todos os cálculos foram feitos usando o programa para análise de dados de populações genéticas Arlequin versão 3.0 (Excoffier et al., 2005).

A variação genética total entre as comunidades foi obtida pela comparação da diversidade genética dentro de cada comunidade e a diversidade genética total das comunidades combinadas (F_{ST}) calculada pela seguinte equação: $F_{ST} = (\theta_T - \theta_W) / \theta_T$, onde θ_T é a diversidade para todas as amostras e θ_W é a diversidade genética média dentro de cada comunidade sobre todas as comunidades comparadas. A significância estatística de F_{ST} foi avaliada pela re-amostragem aleatória das seqüências utilizando 1.000 permutações. A comparação dos valores de F_{ST} aos pares para cada comunidade analisada foi utilizada para a construção de um dendrograma calculado pelo algoritmo UPGMA por meio do programa MEGA versão 3.1 (Kumar et al., 2004).

4.3.6 Números de acesso das seqüências de nucleotídeos

Todas as seqüências obtidas neste estudo foram enviadas ao Banco de Genes NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e receberam os seguintes números de acesso: Colmo - amostra B (DQ425843 a DQ425984), amostra CA (DQ426403 a DQ426510), amostra CB (DQ425611 a DQ425740), amostra CG (DQ425741 a DQ425842), amostra CO (DQ425985 a DQ426131), amostra PM (DQ426259 a DQ426402); Raíz - amostra B (DQ981867 a DQ981989), amostra CA (DQ981990 a DQ982136), amostra CB (DQ982137 a DQ982194)

amostra CG (DQ982195 a DQ982276), amostra CO (DQ982277 a DQ982383), amostra PM (DQ982384 a DQ982494); Solo - amostra B (DQ982495 a DQ982687), amostra CA (DQ982688 a DQ982802), amostra CB (DQ982803 a DQ982887), amostra CG (DQ982888 a DQ982979), amostra CO (DQ982980 a DQ983052), amostra PM (DQ983053 a DQ983183).

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diversidade microbiana pode ser definida por diversas formas incluindo critérios filogenéticos, metabólicos e genômicos (Keller & Zengler, 2004). As técnicas baseadas em biologia molecular, aplicadas neste estudo, permitiram estimar a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio com uma maior confiabilidade do que as baseadas em técnicas de microbiologia. O gene *nifH* foi selecionado pois está presente na maioria dos sistemas biológicos capazes de fixar nitrogênio atmosférico, bem como apresenta regiões altamente conservadas entre a maioria das bactérias diazotróficas. Além disso, tem sido reportado que a análise filogenética obtida por esse gene é largamente consistente com a filogenia do gene ribossomal do 16S (Zehr et al., 2003) e o banco de dados dos genes que codificam a enzima nitrogenase está aumentando e representa atualmente o maior banco de dados não ribossomal de microrganismos não cultivados (Zehr et al., 2003).

4.4.1 Análise da suficiência amostral

Amostras compostas de solo rizosférico, raízes e colmo de milho foram tomadas em seis lavouras cultivadas sob mesmo sistema de manejo do solo. Para cada amostra, foi extraído o DNA microbiano e os genes *nifH* foram amplificados, clonados e seqüenciados. Por meio desta técnica foi possível avaliar unicamente a diversidade de bactérias diazotróficas.

Em qualquer comunidade, o número de espécies observadas aumenta com ao aumento no número de amostras até que todas as espécies tenham sido observadas (Hughes et al., 2001). Uma estimativa da representatividade da comunidade amostrada pode ser feita por meio da plotagem de curvas de

extinção. Para o cálculo de tais curvas necessitam-se dados quantitativos e qualitativos de todas as seqüências amostradas dentro de uma comunidade (Chelius & Triplett, 2000), bem como dos resultados médios obtidos pela re-amostragem aleatória do número acumulativo dos tipos observados versus o número total de amostras tomadas. Considerando que nenhuma das manipulações do DNA exerceu influência sob os resultados obtidos, então as curvas de extinção irão refletir a diversidade taxonômica do ecossistema amostrado (Stackebrandt & Goebel, 1994). Em adição, a diversidade taxonômica é dependente do critério utilizado para a definição de uma UT. Neste estudo as UTs foram definidas como aquelas seqüências do gene *nifH* que apresentaram similaridade igual ou superior a 97%. Embora esta definição não seja um critério válido para a determinação da hierarquia taxonômica bacteriana, esse tipo de análise fornece informações relevantes para a comparação entre comunidades amostradas de diferentes locais.

De acordo com as curvas de extinção (Figura 1), o número de seqüências amostradas no solo rizosférico, raízes e colmo das plantas de milho foi suficiente para revelar o número total de UTs dentro das comunidades já que todas as curvas atingiram um platô. Com base na análise das curvas de extinção pode-se observar que a diversidade foi maior no solo rizosférico do que nas raízes e no colmo de milho, respectivamente (Figura 1).

O número de seqüências obtidas foi suficiente para a detecção de diferenças estatisticamente significativas. Amostras de aproximadamente 60 a 180 seqüências do gene *nifH* foram necessárias para a discriminação estatística da diversidade entre o solo rizosférico, raízes e colmos de milho.

4.4.2 Diversidade de espécies e estimativa da riqueza de espécies

Os valores obtidos pelo índice Chao1, utilizado para estimar a riqueza de espécies, foram comparados utilizando os resultados obtidos para o maior número de seqüências de cada comunidade (Tabela 2). Independente da lavoura em que foi feita a amostragem, a riqueza de espécies foi sempre maior nas amostras de solo rizosférico do que nas amostras de raízes e colmo. Pelo índice Chao1 foi estimado que a menor riqueza de espécies detectada nas

amostras de solo rizosférico foi de 35 UTs (valor médio para a amostra CB) e que a maior riqueza de espécies foi de 99 UTs (valor médio para a amostra PM). Comparando os resultados obtidos na análise da riqueza das amostras de solo rizosférico com as amostras do colmo, observa-se diferenças na ordem de 1,3 a sete vezes mais UTs no solo rizosférico (amostras CB e PM, respectivamente).

Os valores obtidos pelo índice de riqueza entre as amostras de raiz e colmo indicaram que as raízes tenderam a apresentar maior número de UTs em relação ao colmo. Para as amostras PM, B, CG e CA o índice Chao1 foi maior nas raízes do que no colmo, entretanto, para as amostras CB e CO observou-se valores de riqueza semelhantes tanto nas raízes como no colmo (Tabela 2). A maior riqueza detectada nas raízes foi de 52 UTs (valor médio para a amostra CG), 2,8 vezes maior do que a estimativa da riqueza calculada para o colmo da mesma amostra. O menor índice de riqueza de espécies detectado nas raízes foi de 24 UTs (valor médio para a amostra CB). Nas amostras de colmo a maior riqueza detectada foi de 27 e 26 UTs nas amostras CB e CO, respectivamente.

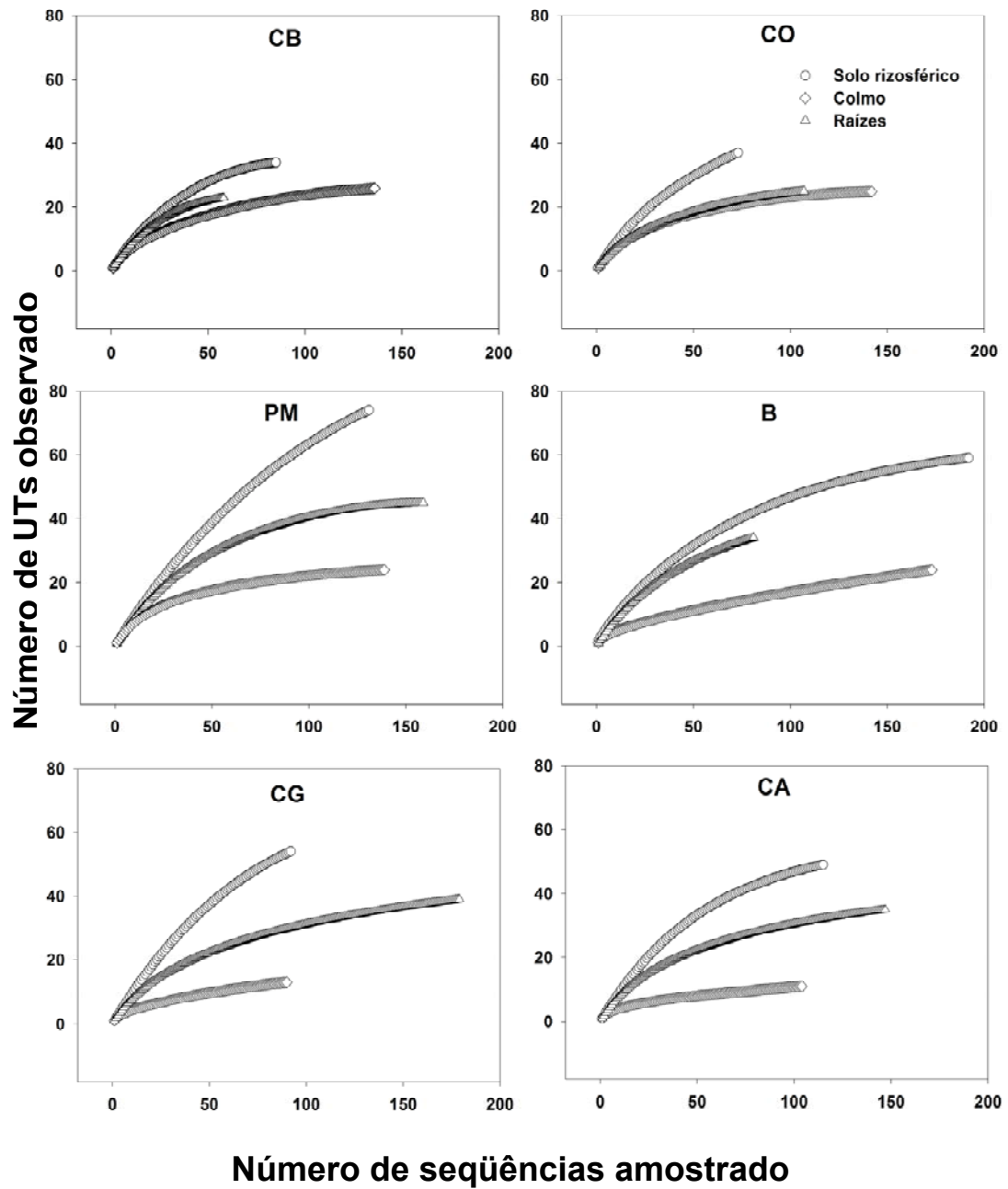


FIGURA 1. Curvas de extinção calculadas pelo programa DOTUR usando 97% de similaridade para o agrupamento das seqüências do gene *nifH* de 18 amostras de solo rizosférico, raízes e colmo de plantas de milho coletadas em seis diferentes lavouras do Estado do Rio Grande do Sul. (CB = Carlos Barbosa, CO = Colorado, PM = Palmeiras das Missões, B = Bagé, CG = Canguçu, CA = Candelária).

TABELA 2. Índice de diversidade de Shannon-Weaver e índice de riqueza de espécies Chao1 calculados com base no número e na frequência das seqüências do gene *nifH* amplificadas de amostras de solo rizosférico, raízes e colmo de plantas de milho cultivadas em seis diferentes lavouras do Estado do Rio Grande do Sul.

| Amostra | Shannon-Weaver | | | Chao1* | | | | | | | | |
|---------|----------------|-------------|-------------|-----------|-----|-----|------|-----|-----|-------|-----|-----|
| | Rizosfera | Raiz | Colmo | Rizosfera | | | Raiz | | | Colmo | | |
| | | | | min | méd | máx | min | méd | máx | min | méd | máx |
| CB | 3,34 ± 0,16 | 2,96 ± 0,38 | 2,64 ± 0,18 | 34 | 35 | 39 | 23 | 24 | 34 | 26 | 27 | 33 |
| CO | 3,40 ± 0,18 | 2,66 ± 0,42 | 2,75 ± 0,15 | 44 | 58 | 99 | 25 | 27 | 39 | 25 | 26 | 29 |
| PM | 4,12 ± 0,14 | 2,76 ± 0,30 | 1,22 ± 0,11 | 85 | 99 | 130 | 24 | 25 | 36 | 13 | 14 | 18 |
| B | 3,75 ± 0,13 | 3,25 ± 0,38 | 1,63 ± 0,17 | 60 | 65 | 80 | 35 | 40 | 57 | 19 | 19 | 22 |
| CG | 3,88 ± 0,14 | 2,19 ± 0,31 | 1,64 ± 0,24 | 59 | 66 | 87 | 18 | 24 | 53 | 14 | 18 | 42 |
| CA | 3,76 ± 0,12 | 3,12 ± 0,30 | 1,55 ± 0,2 | 50 | 54 | 68 | 39 | 41 | 63 | 11 | 16 | 43 |

* valores máximos e mínimos foram calculados utilizando 95% de intervalo de confiança.

CB = Carlos Barbosa, CO = Colorado, PM = Palmeiras das Missões, B = Bagé, CG = Canguçu, CA = Candelária.

Em concordância com as curvas de extinção e as estimativas de riqueza de espécies, o índice de Shannon-Weaver indicou que o solo rizosférico apresentou maior diversidade do que a raiz e o colmo do milho (Tabela 2). No solo rizosférico a maior diversidade foi detectada na amostra PM ($4,12 \pm 0,14$) ao passo que nas amostras de colmo, a maior diversidade foi de $2,75 \pm 0,15$ (amostra CO). Com relação às raízes a maior diversidade foi observada na amostra CG ($3,64 \pm 0,29$).

Os índices de riqueza e de diversidade assim como as curvas de extinção calculados neste estudo indicaram de forma consistente que o solo rizosférico possuía maior diversidade de bactérias diazotróficas do que as raízes e o colmo das plantas de milho. Seghers et al. (2004) obtiveram resultados semelhantes trabalhando com a comunidade bacteriana total associada ao solo e o interior das raízes e colmo de plantas de milho usando

uma técnica baseada na análise de eletroforese de gel com gradiente de desnaturação (DGGE). Os pesquisadores detectaram diferenças na estrutura da comunidade bacteriana que habitava o interior dos tecidos das plantas de milho e a comunidade que habitava a porção externa das raízes. Entretanto a riqueza da comunidade bacteriana do solo que não teve influência das raízes, e a riqueza da comunidade do solo rizosférico, não puderam ser estimadas já que os fragmentos observados no gel não foram separados adequadamente. De acordo com Welbaum et al. (2004), a grande área superficial das raízes é um habitat extraordinariamente vasto que abriga uma grande variedade de bactérias que vai desde comunidades saprofitas a comensais, mutualísticas, simbióticas, endofíticas e patogênicas. Assim o crescimento radicular implica no aumento de substratos de carbono na zona das raízes os quais promovem a proliferação de rizobactérias em face do ambiente rico em fontes de carbono. A maior diversidade detectada no solo rizosférico pode ser parcialmente explicada pela presença dos nutrientes exudados pelas raízes das plantas de milho. De acordo com as estimativas de diversidade e riqueza de espécies, Shannon-Weaver e Chao1, às raízes do milho foram o segundo habitat que apresentou maior diversidade neste levantamento. A maior diversidade nas raízes do que no colmo de milho se deve ao fato de que as raízes são o primeiro local de entrada dos endofíticos nas plantas (Lodewyckx et al., 2002).

Mecanismos de penetração são necessários para que as bactérias colonizem o interior dos tecidos das raízes. Apenas um grupo especializado de bactérias fixadoras de nitrogênio são capazes de penetrar os tecidos das raízes e estabelecer um nicho de colonização no interior da planta. Uma vez dentro do tecido das plantas, diferentes mecanismos e distribuição podem ocorrer devido as interações com outras bactérias ou devido as diferentes necessidades de cada microrganismo que determinam a colonização de diferentes nichos dentro da planta (Lodewyckx et al., 2002). A menor diversidade detectada no interior do colmo de milho em comparação com o solo da rizosfera e as raízes pode ser explicada pelos mecanismos mencionados acima. Além destes fatores, Liu et al. (2006), estudando a colonização de milho e arroz por *Bacillus megaterium* observaram que esta bactéria migrou lentamente das raízes em direção ao colmo e as folhas,

provando assim que apenas poucas células bacterianas podem ser encontradas no interior das plantas de milho e arroz.

4.4.3 Comparação entre a diversidade genética das comunidades

Usando o teste F_{ST} , foram determinadas as distâncias genéticas entre nucleotídeos das seqüências do gene *nifH* amplificadas das amostras de DNA extraído do solo rizosférico, raízes e colmo de plantas de milho. Os valores de F_{ST} foram calculados para cada par de amostras entre as 18 comunidades amostradas. Os resultados obtidos geraram uma matriz de distâncias que foi utilizada para a construção de um dendrograma de similaridade (Figura 2). A distância genética entre as comunidades amostradas demonstrou que as mesmas estavam divididas em dois grupos bem definidos. O primeiro grupo foi composto por seqüências do gene *nifH* que foram amplificadas do DNA microbiano extraído do solo rizosférico e das raízes do milho e o segundo grupo foi constituído unicamente por seqüências amplificadas do DNA extraído do colmo das plantas de milho. Esses resultados demonstram os genes *nifH* amplificadas do colmo apresentaram uma comunidade diferente das comunidades associadas ao solo rizosférico e as raízes do milho. De acordo com o dendrograma, a distância geográfica entre as seqüências amostradas não apresentaram influência significativa na diversidade dos genes *nifH*. A distância genética foi maior entre os locais da planta analisados ou do solo, do que entre as lavouras amostradas (Figura 2).

4.4.4 Classificação taxonômica

Seqüências de diversas espécies de bactérias diazotróficas cultiváveis foram detectadas por meio da ferramenta de pesquisa Blast, colonizando o solo rizosférico, as raízes e o colmo de milho. Embora os oligonucleotídeos iniciadores utilizados tenham sido desenhados para a captura de seqüências do gene *nifH* pertencentes aos filos Proteobacteria, Cyanobacteria e Firmicutes, somente foram detectados genes de bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria nas 18 comunidades avaliadas. No solo rizosférico foram detectadas seqüências pertencentes às classes α -proteobacteria, β -proteobacteria, γ -proteobacteria e δ -proteobacteria (Figura. 3).

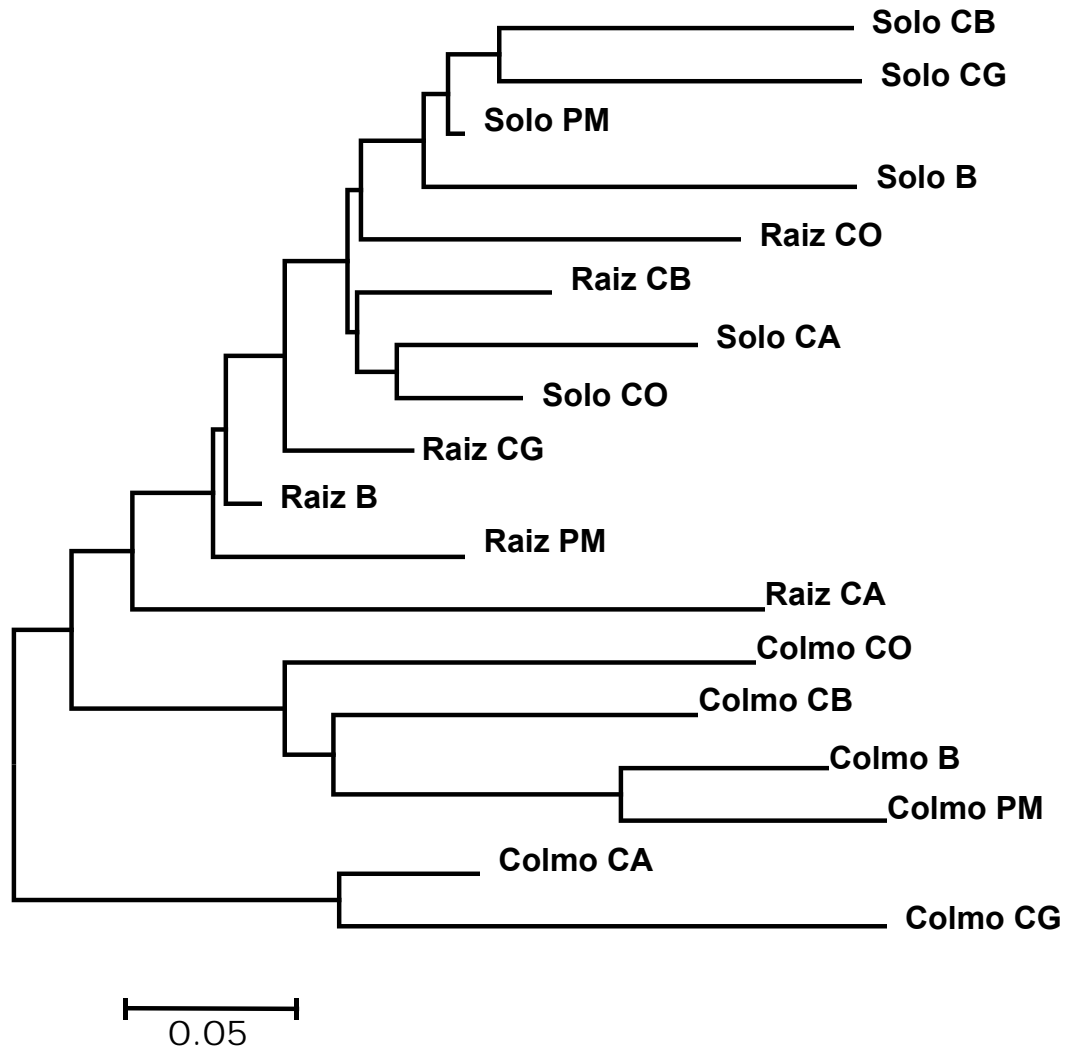


FIGURA 2. Variação genética total das comunidades de bactérias diazotróficas associadas ao solo rizosférico, raízes e colmo de milho coletado em seis diferentes lavouras do Estado do Rio Grande do Sul. A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. (CB = Carlos Barbosa, CO = Colorado, PM = Palmeiras das Missões, B = Bagé, CG = Canguçu, CA = Candelária).

Observou-se que a classe α -proteobacteria compôs a maior parcela das seqüências em todas as amostras de solo rizosférico (46,5%) sendo que a segunda classe bacteriana mais abundante foi a β -proteobacteria (22,3%). As classes γ - e δ -proteobacteria apresentaram-se distribuídas em apenas algumas das amostras e representaram cerca 2,4 e 1,3%, respectivamente, do total das seqüências amostradas no solo.

Com relação às raízes, foram detectadas seqüências do gene *nifH* pertencentes as classes α -, β -, e γ -proteobacteria (Figura 3). As α -proteobacterias foram detectadas em maior proporção nas seqüências amostradas (49,7%) ao passo que as classes β - e γ -proteobacteria apresentaram distribuição semelhante e foram detectadas em 16,8% e 20%, respectivamente, do total das amostras de raízes.

A análise taxonômica das seqüências amplificadas a partir do DNA extraído do colmo de milho mostrou a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio pertencentes às classes α -, β -, γ -proteobacteria (Figura 3). Ao contrário do observado nas amostras de solo rizosférico e raízes, não foi observada a dominância de classes bacterianas entre as seqüências de colmo amostradas. Verificou-se que 32,5% das seqüências amostradas pertenciam a classe α -proteobacteria, 35% a classe γ -proteobacteria e 25,6% a classe β -proteobacteria. Em um estudo da diversidade de Bactéria e Archaea associadas com raízes de milho, Chelius & Triplett (2001) observaram que a maioria das seqüências do gene ribossomal do 16S amplificadas eram similares a bactérias do filo Proteobacteria e que a classe α -proteobacteria foi predominante. De forma similar Schmalenberger & Tebbe (2003) e Sanguin et al. (2006) estudando a diversidade de bactérias associadas as raízes do milho, usando técnicas baseadas em biologia molecular, detectaram que a maioria das seqüências analisadas eram similares as seqüências pertencentes a proteobactérias.

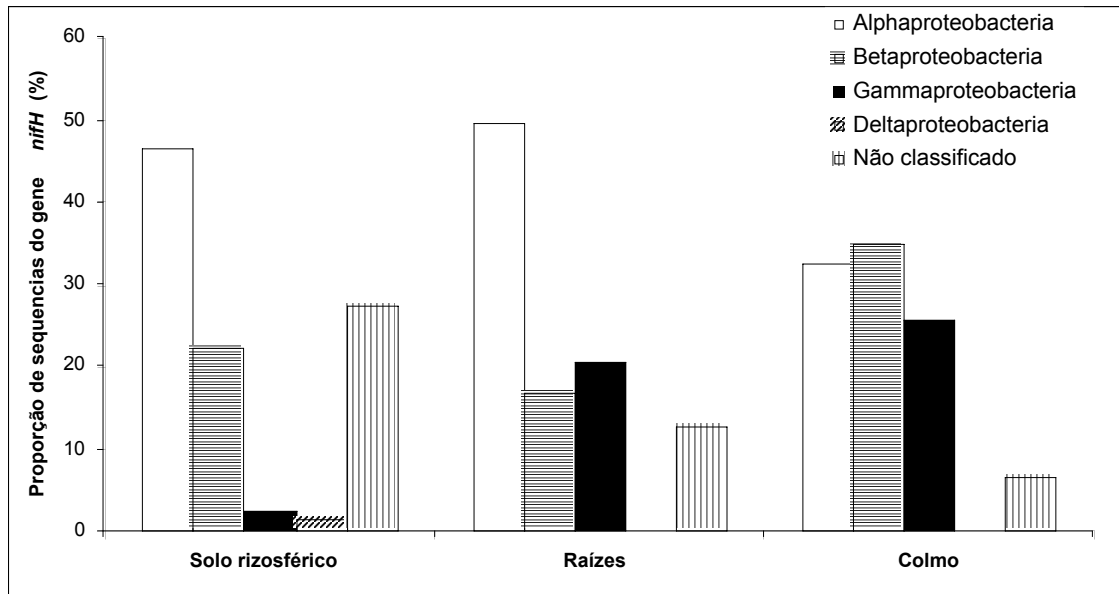


FIGURA 3. Proporção das classes de bactérias diazotróficas detectadas pela análise comparativa das seqüências do gene *nifH* amplificadas a partir do DNA microbiano extraído de amostras de solo rizosférico, raízes e colmo de milho e seqüências do mesmo gene depositadas no banco de genes do NCBI.

Entre as seqüências analisadas, também foi detectada uma grande proporção que não apresentou filogenia conhecida. Entretanto, a maior proporção de seqüências não identificadas foi encontrada nas amostras de solo rizosférico (27%).

Com relação aos gêneros microbianos associados às plantas de milho e ao solo rizosférico, verificou-se que *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum*, *Ideonella*, *Klebsiella* e *Raoultella* foram mais abundantes (Figura 4). Nas amostras de solo rizosférico observou-se que *Azospirillum*, *Bradyrhizobium* e *Ideonella* ocorreram em maior número (5%, 20,8% e 11%, respectivamente). Por outro lado, os gêneros *Herbaspirillum* e *Raoultella* não foram detectados nas amostras de solo e seqüências do gene *nifH* similares as seqüências de bactérias do gênero *Klebsiella* foram detectadas em pequenas proporções (0,2%). Com relação às raízes das plantas, a maior fração das seqüências apresentou similaridade com bactérias do gênero *Azospirillum* (23,3%), *Bradyrhizobium* (30%) e *Klebsiella* (11,9%). Nas amostras de colmo, seqüências similares a bactérias do gênero *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Ideonella*, *Klebsiella* e *Raoultella* foram encontradas em maior proporção (20%,

7,4%, 27%, 12,6% e 5,4%, respectivamente). Tais resultados sugerem que as bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum*, *Ideonella*, *Klebsiella* e *Raoultella* colonizam as plantas de milho de forma preferencial e independente do tipo de solo ou da região geográfica em que as plantas forem cultivadas. Sendo assim estes gêneros podem ser considerados dominantes na associação com o milho. A colonização preferencial bem como a ocorrência de espécies dominantes tem sido detectada em outras espécies de plantas. Reiter et al. (2003) mostraram em um estudo que abordou a diversidade de bactérias endofíticas associadas a batata doce, que as seqüências do gene *nifH* foram agrupadas em diversos grupos taxonômicos incluindo α -, β -, e γ -Proteobacteria assim como bactérias Gram positivas com baixa proporção de C+G. Entretanto, cerca de 50% dos genes seqüenciados foram derivados de bactérias do gênero *Rhizobium* pertencentes ao filo β -Proteobacteria.

Embora os gêneros mencionados acima tenham sido detectados em maior proporção, cerca de 35,8% das seqüências obtidas do solo rizosférico foram representadas por diversos gêneros que ocorreram em baixa proporção (>5%) sendo assim classificados como gêneros raros. Entre estes estavam incluídos *Azoarcus*, *Azorhizobium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Dechloromonas*, *Derxia*, *Geobacter*, *Gluconacetobacter*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Methylocella*, *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodoblastus*, *Rhodovulum*, *Sinorhizobium* e *Xanthobacter*. Entre as amostras de raiz, 14,7% das seqüências amostradas apresentavam similaridade com os genes *nifH* de um dos seguintes gêneros: *Azoarcus*, *Azohydromonas*, *Azonexus*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Dechloromonas*, *Delftia*, *Derxia*, *Methylocystis*, *Pelomonas*, *Sinorhizobium* ou *Xanthobacter*. Finalmente, cerca de 20% das seqüências amplificadas do DNA extraído de bactérias presentes no colmo da plantas de milho apresentou similaridade com bactérias do gênero *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Dechloromonas*, *Methylobacterium*, *Methylosinus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodoblastus*, *Sinorhizobium* ou *Xanthobacter*.

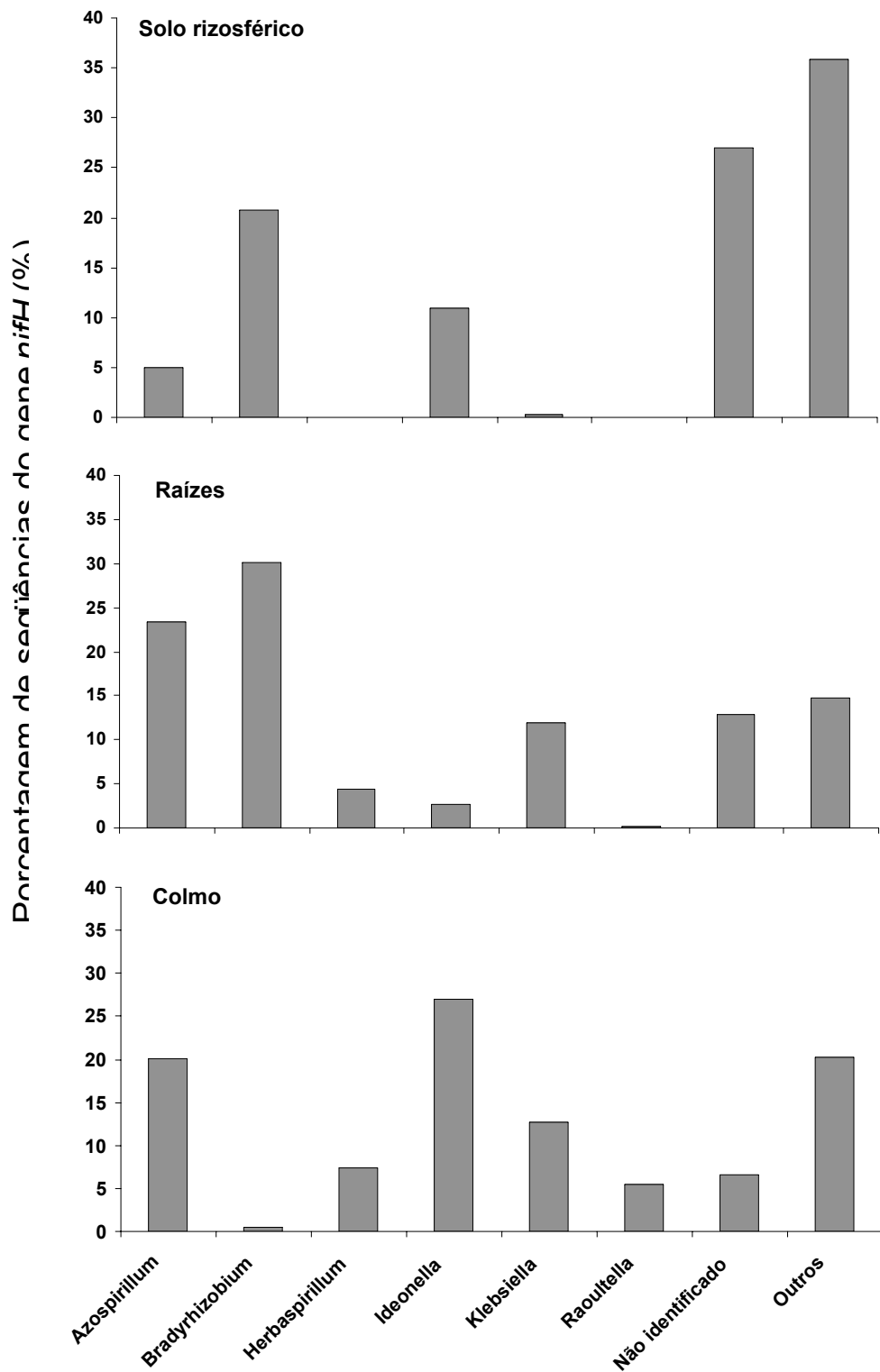


FIGURA 4. Gêneros mais abundantes associados ao solo rizosférico, raízes e colmo de plantas de milho classificados de acordo com as seqüências do gene *nifH* mais similares disponíveis no Banco de Genes do NCBI. A fração dos gêneros classificados como “outros” foi representada pelo somatório das seqüências que ocorreram em porcentagens inferiores a 5%.

4.5 CONCLUSÕES

No presente estudo, alguns gêneros bacterianos ocorreram de forma restrita no solo (*Methylocystis*, *Beijerinckia*, *Geobacter*, *Rhodovulum*, *Methylobacterium*, *Gluconacetobacter*, *Methylocella*, e *Delftia*), raízes (*Dechloromonas*) e ao colmo (*Methylosinus*, *Raoultella*, e *Rhizobium*). Três gêneros, *Herbaspirillum*, *Raoultella*, e *Klebsiella* foram dominantes no interior das plantas, porém muito raros no solo. Tais resultados levam a conclusão que uma porção das bactérias diazotróficas endofíticas foram provenientes de parte da comunidade bacteriana presente no solo.

O solo da rizosfera apresentou a maior diversidade bactérias diazotróficas. O colmo das plantas de milho apresentou a menor diversidade e as raízes apresentaram uma diversidade intermediária entre o solo rizosférico e o colmo. Embora se tenha observado uma grande diversidade de bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho, apenas alguns gêneros tais como *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum*, *Ideonella*, *Klebsiella* e *Raoultella* foram dominantes.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIORÁFICAS

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

CHABOT, R. et al. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n.8, p. 2767-2772, 1996.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.

CURTIS, T.; SLOAN, T. Exploring microbial diversity – A vast below. **Science**, Washington, v. 309, n. 5739, p. 1331 - 1333, 2005.

EXCOFFIER, L. et al. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, Auckland, v. 1, n. 1, p. 47-50. 2005.

FALSENSTEN, J. PHYLIP-Phylogeny inference package (version 3.2). **Cladistics**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 164 – 166, 1989.

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, Washington, v. 309, n. 5739, p.1387-1390, 2005.

GUTIERREZ-ZAMORA, M.L.; MARTINEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, n. 3, p. 117-126, 2001.

HONG, S.; BUNGE, J.; JEON, S.; EPSTEIN, S. Predicting microbial species richness. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.103, n. 1, p.117-122, 2006.

HUGHES, J.B. et al. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 4399-4406, 2001.

KELLER, M.; ZENGLER, K. Tapping into microbial diversity. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 2, n. 2, p. 141–150, 2004.

KENNEDY, I. R., et al. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 8, p.1229-1244, 2004.

KUMAR, S. et al. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Birmingham, v. 5, n. 2, p. 150-163, 2004.

LIU, X., et al. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. **Current Microbiology**, New York, v. 52, n. 3, p. 186-190, 2006.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002.

LOVELL, C. R. et al. Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. **Applied and Environmental. Microbiology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 3814-3822, 2000.

PACE, N. R. et al. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, New York v. 9, n. 1, p. 1-55, 1986.

POLY, F. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2255-2262, 2001.

REITER, B. et al. Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 49, n. 9, p. 549-555, 2003.

RÖSCH, C. et al. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p. 3818-3829, 2002.

SANGUIN, H. et al. Potential of a 16S rRNA-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium* spp. and bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 6, p. 4302-4312, 2006.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN. J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1501-1506, 2005.

SCHLOTTER, M. et al. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 5, p. 2038-2046, 1997.

SCHMALENBERGER, A.; TEBBE, C.C. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 251-262, 2003.

SEGHERS, D. et al. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 3, p. 1475-1482, 2004.

SOARES, R.A. et al. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 221-234, 2006.

STACKBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

STURZ, A. V. et al. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, n. 2, p. 162-167. 1998.

THOMPSON, J. D., et al. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

WELBAUM, G.E. et al. Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 23, n. 2, p. 175-193, 2004.

WIDMER, F. et al. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 2, p. 374-380, 1999.

ZEHR, J.P.; MC REYNOLDS, L.A. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine Cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 10, p. 2522-2526, 1989.

ZEHR, J.P.; CAPONE, D.G.. Problems and promises of assaying the genetic potential for nitrogen fixation in the marine environment. **Microbial Ecology**, New York, 32, n. 3, p. 263–281, 1996.

ZEHR, J.P. et al. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, New York, v. 5, n. 7, p. 539-554, 2003.

Capítulo IV

SELEÇÃO DE *Azospirillum* spp EFICIENTES NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO E NA PRODUÇÃO DE AUXINAS

5.1 RESUMO

O isolamento de microrganismos, assim como os testes e a seleção de isolados com características desejáveis são passos importantes nos estudos que tem por objetivo otimizar a produção e promover a sustentabilidade dos sistemas agrícolas. O objetivo deste estudo foi isolar e identificar bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* naturalmente associado ao solo rizosférico, raízes e colmo de milho com elevado potencial em promover o crescimento das plantas. Os microrganismos diazotróficos foram isolados em meios de enriquecimento NFb semi-sólido sem a adição de N. Para a seleção dos microrganismos mais eficientes, na promoção do crescimento de plantas, os isolados foram avaliados quanto a sua morfologia celular, coloração de Gram, resistência a estreptomicina, assim como produção de auxinas e fixação biológica do nitrogênio sob condição gnotobióticas. Entre os 224 isolados obtidos, 121 apresentaram capacidade de fixar nitrogênio e produzir auxina. Os 30 isolados mais promissores produziram de 3,51 a 246,69 $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$ de proteína e fixaram cerca de 1,53 a 95,21 $\mu\text{g de N mg}^{-1}$ proteína. Dos 30 isolados mais produtivos, o DNA cromossomal foi extraído e uma porção do gene *nifH* foi amplificada e seqüenciada. Vinte e nove isolados apresentaram similaridade com bactérias do gênero *Azospirillum* e um isolado apresentou similaridade com *Herbaspirillum seropedicae*. Os isolados bacterianos obtidos demonstraram possuir potencial para aumentar a produtividade das plantas e podem ser considerados como candidatos para inoculação em plantas nas condições edafoclimáticas do Estado do Rio Grande do Sul.

5.2 INTRODUÇÃO

Os sistemas agrícolas têm sofrido diversas mudanças no manejo para que, sem perda de produtividade, seja possível aumentar a qualidade ambiental e evitar a degradação dos solos. Uma das técnicas mais promissoras para evitar a degradação do ambiente é o uso de bio-inoculantes compostos por bactérias diazotróficas as quais representam uma alternativa ao uso de fertilizantes nitrogenados (Welbaum et al., 2004; Kennedy et al., 2004). Já foi demonstrado que as bactérias diazotróficas além de fixar nitrogênio atmosférico, podem também produzir metabólitos de interesse agrícola incluindo fitohormônio como o ácido indol acético (AIA) que é uma das auxinas mais conhecidas e mais bem estudadas e apresenta importância central no crescimento das plantas (Arshad & Frankenberger, 1991; Boddy & Dobereiner, 1995; Bashan et al., 2004). A habilidade de sintetizar AIA é uma característica comumente encontrada entre bactérias presentes no solo ou associadas as plantas. Estima-se que cerca de 80% das bactérias rizosféricas sejam capazes de sintetizar pelo menos um tipo de fitohormônio regulador de crescimento de plantas (Costacurta & Vanderleyden, 1995; Patten & Glick, 1996). O isolamento de microrganismos, assim como os testes e a seleção de isolados com características desejáveis são passos importantes nos estudos que tem por objetivo otimizar a produção e promover a sustentabilidade dos sistemas agrícolas.

Entre os microrganismos associados as plantas, bactérias do gênero *Azospirillum* tem sido consideradas promissoras devido a sua habilidade em produzir fitohormônios e fixar nitrogênio em associação com mais de 100 espécies de cereais e leguminosas (Bashan et al., 2004). Organismos do gênero *Azospirillum* são bactérias Gram negativas fixadoras de nitrogênio de vida livre e podem se associar as raízes das plantas. Apresentam um

metabolismo bastante versátil o que confere ao gênero características adaptativas permitindo assim o estabelecimento competitivo na rizosfera (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Essas características conferem ao gênero a habilidade de promover o crescimento de cereais e de outras plantas leguminosas. Aparentemente, a inoculação de *Azospirillum* spp. pode reduzir o uso de fertilizantes químicos, especialmente nitrogênio, na ordem de 20% a 50% sendo que resultados superiores já foram obtidos quando a inoculação foi utilizada juntamente com a incorporação de fertilizantes orgânicos (Bashan et al., 2004). Além disso, uma outra característica importante das bactérias desse gênero é sua capacidade de penetrar no interior dos tecidos das plantas e sobreviver endofiticamente nos espaços intercelulares (Sumner, 1990). Bactérias diazotróficas endofíticas podem apresentar vantagens em relação aos organismos associados as raízes uma vez que os mesmos encontram-se protegidos no interior da planta e podem utilizar os substratos de carbono supridos pela mesma. Em adição, os organismos endofíticos colonizam nichos que apresentam reduzida tenção de oxigênio a qual é necessária para a expressão da enzima nitrogenase (James & Olivares, 1997; Dobbelaere et al., 2003).

O objetivo deste estudo foi isolar e identificar bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* naturalmente associadas ao solo rizosférico, raízes e colmo de milho cultivado em lavouras do Estado do Rio Grande do Sul, e selecionar bactérias com elevado potencial em promover o crescimento das plantas.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, o solo da rizosfera, as raízes e o colmo de plantas de milho cultivados em diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul foram utilizados para isolar e selecionar bactérias do gênero *Azospirillum* capazes de promover o crescimento das plantas. As amostras foram coletadas em 30 lavouras cultivadas sob o mesmo sistema de manejo, mas que estavam localizadas em diferentes regiões climáticas e diferentes tipos de solo. Com o sistema de amostragem adotado objetivou-se obter a variabilidade necessária para selecionar bactérias diazotróficas com elevado potencial de fixar nitrogênio atmosférico e produzir fitohormônios.

5.3.1 Amostragem e preparação das amostras

Amostras do solo rizosférico, raízes e colmo de plantas de milho foram coletadas em cinco diferentes regiões climáticas do Estado do Rio Grande do Sul (Figura 1). Para cada região edafoclimática foram amostradas de cinco a sete lavouras de milho cultivado sob o sistema de semeadura direta onde os resíduos da cultura anterior permanecem na superfície do solo. O sistema de manejo das lavouras amostradas ainda envolvia a rotação anual de culturas incluindo o uso de leguminosas e gramíneas. De cada lavoura amostrada foram coletadas três plantas inteiras e solo rizosférico que foram utilizados para o isolamento das bactérias diazotróficas. Também foram tomadas amostras de solo para a determinação do conteúdo de matéria orgânica, porcentagem de argila e pH. As análises físicas e químicas do solo foram feitas com base na metodologia descrita em Tedesco et al. (1995).

5.3.2 Isolamento bacteriano

As bactérias diazotróficas foram isoladas utilizando o meio de enriquecimento NFb semi-sólido sem adição de nitrogênio (Döbereiner, 1992), inicialmente desenvolvido para o isolamento de *Azospirillum lipofereum* ou *A. brasilense*. O solo da rizosfera foi seco a temperatura ambiente por 24h e peneirado em peneira de 2mm. As raízes foram lavadas em água corrente para a remoção do excesso de solo e desinfestadas superficialmente com uma solução de cloramina T 1% por um período de 15 min.

Precipitação anual*

Temperatura média*

*Média de 30 anos (1931 – 1990)

FIGURA 1. Mapa do Estado do Rio Grande do Sul mostrando as diferenças climáticas e as cinco regiões amostradas. Os números indicam os 30 locais de amostragem das plantas de milho utilizadas neste trabalho. As medidas de temperatura média máxima e precipitação anual foram obtidas junto ao oitavo distrito da Rede Regional Meteorológica do Rio Grande do Sul (Instituto de Meteorologia / Ministério da Agricultura). Os valores apresentados representam a média acumulativa dos últimos 30 anos de informação.

Após este período, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada esterilizada por 10 min. cada lavagem. As amostras do colmo foram lavadas em água destilada e desinfestadas superficialmente com uma solução de álcool 70% por 5min. Dez gramas das amostras foram homogeneizadas em 90mL de uma solução de NaCl 0,5%. No caso das raízes e colmo as amostras foram previamente maceradas em liquidificador. Após a homogeneização inicial, as amostras foram submetidas a diluições em série até 10^{-4} . Alíquotas de 100 μ L da diluição 10^{-4} foram inoculadas em frascos de 6 mL contendo o meio de enriquecimento NFb semi-sólido, sem adição de nitrogênio (Döbereiner, 1992). Os meios de cultura foram incubados a 30°C e após sete dias procedeu-se a análise que foi baseada na presença ou ausência de película característica indicativa do provável crescimento de bactérias diazotróficas. Os tubos que continham película foram utilizados no processo seguinte que consistiu na purificação e isolamento bacteriano. Parte da película, contendo células bacterianas, foi inoculada em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura acrescido de 20 mgL⁻¹ de extrato de levedura. As colônias formadas foram novamente transferidas para o meio NFb semi-sólido e este processo foi repetido até a obtenção de apenas colônias puras nas placas. Os microrganismos isolados foram analisados quanto a morfologia celular em microscópio óptico e submetidos ao teste de Gram.

5.3.3 Extração do DNA bacteriano, amplificação e seqüenciamento do gene *nifH* dos isolados

O DNA bacteriano foi extraído usando o kit FastDNA® (Qbiogene, Inc., Calif.) seguindo as instruções do fabricante. Após a extração do DNA, fragmentos do gene *nifH* foram amplificados utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (PoIF/PoIR) desenhados por Poly et al. (2001). Estes oligonucleotídeos iniciadores amplificam cerca de 360 pb do gene *nifH* a partir do DNA isolado de microrganismos diazotróficos. A mistura de PCR utilizada continha tampão de reação 1X, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase de alta fidelidade (Biotools B&M Labs), 200 nM de cada deoxinucleotídeo e os oligonucleotídeos

iniciadores PoIF/PoIR a uma concentração de 1mM. A reação final continha 25_μL da mistura de PCR e 100ng do DNA molde purificado.

Após a desnaturação inicial que consistiu em 5 min. a 94°C, foram aplicados 30 ciclos, conforme o seguinte: desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 55°C por 45s e extensão a 72°C por 45s e extensão final de 72°C por 5min. Ao final da amplificação, as amostras foram resfriadas e mantidas a 4°C. A concentração e a qualidade dos produtos amplificados foram analisadas em gel de agarose ultrapura a 1,5% (Invitrogen, Carlsbad, California).

O produto da PCR foi purificado utilizando o kit para purificação de PCR QIAquick (Qiagen, Valencia, Calif.) e posteriormente seqüenciados em ambas as direções utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados na reação de PCR e o kit para seqüenciamento DYEnamic ET (GE Healthcare) em um termociclador do tipo PTC200 (BioRad) em placas de 96 poços acoplado a um seqüenciador capilar do tipo MegaBACE 1000 (GE Healthcare).

5.3.4 Análise filogenética

Para a construção das relações filogenéticas, as seqüências de nucleotídeos obtidas neste estudo foram comparadas com todas as seqüências do banco de genes do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando a ferramenta Blast (Altschul et al., 1997). Para a análise das proteínas codificadas pelo gene seqüenciado foi usado o programa Blastx, que realizou a tradução conceitual das seqüências de nucleotídeos seguida da busca pela proteína traduzida no mesmo banco de dados. Os resultados obtidos foram utilizados para determinar se as seqüências obtidas eram de fato pertencentes ao gene *nifH*. Para a reconstrução filogenética, as seqüências obtidas neste estudo foram agrupadas em um banco de dados contendo outras seqüências do mesmo gene, retiradas do banco de genes NCBI, pertencentes a bactérias cultivadas conhecidas. Foi feito o alinhamento múltiplo das seqüências contidas neste banco de dados usando o programa ClustalX versão 1.83 (Thompson et al., 1997). Com base no alinhamento, foi construída uma matriz de distâncias usando o algoritmo do vizinho mais próximo e a árvore consenso foi gerada usando o programa Splits Tree 4 (Huson & Bryant, 2006). O intervalo de

confiança dos agrupamentos obtidos foi testado por meio de 1.000 reamostragens com devolução (bootstrap).

5.3.5 Produção de auxinas e fixação do nitrogênio *in vitro*

Cada isolado obtido foi crescido em caldo nutritivo contendo 5gL^{-1} de glicose e 10gL^{-1} de peptona (GPM) por 24h a 30°C . Após o período de incubação o caldo nutritivo foi centrifugado a 5.000g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet contendo as células bacterianas foi re-suspendido em solução de NaCl 0,5% em quantidade suficiente para que fosse atingida uma densidade óptica de 0,1. Uma alíquota 100 μL desta solução foi utilizada como inóculo nos meios de cultura NFb, para a quantificação do nitrogênio fixado e GPM, para a quantificação da produção de AIA.

Membros do gênero *Azospirillum* têm sido usados como modelo para investigações da associação entre bactérias diazotróficas e cereais (Zakharova et al., 1999). Como controle, foi utilizado *Azospirillum brasilense* Sp7 ATCC29145 isolado originariamente da rizosfera de *Digitaria decumbens* (Tarrand et al., 1978) e os meios de cultura NFb e GPM sem inoculação.

A quantificação de AIA foi feita com base na metodologia descrita por Asghar et al. (2002). O caldo nutritivo GPM esterilizado contendo o inóculo, conforme descrito anteriormente, foi incubado por 96h a 30°C com agitação. Após a incubação, o caldo foi centrifugado por 20 min. a 5.000g para a separação das células. O sobrenadante (3mL) foi transferido para tubos contendo 2mL do reagente de Salkowski (2mL FeCl_3 0,5 M + 98 mL HClO_4 35%) e a produção de AIA foi medida pela intensidade da cor produzida pela reação do corante e o AIA presente no meio de cultura. A intensidade da cor foi medida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 535 nm após 30 min. de reação. Para a calibração da análise, foi utilizada uma curva padrão, contendo diferentes concentrações de AIA (Sarwar et al., 1992).

A quantidade de nitrogênio fixado *in vitro* foi medida por digestão sulfúrica e destilação dos meios NFb inoculados conforme descrito por Soares et al (2006). Os meios semi-sólidos foram inoculados conforme descrito anteriormente e incubados por 72h a 30°C . Após a incubação, o meio de cultura contendo as células bacterianas foram submetidos a digestão sulfúrica com 2mL de H_2SO_4 concentrado ($d = 1,84$), 1mL de H_2O_2 30% e 0,7g de uma

mistura de 100 g de Na_2SO_4 , 10g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 1g de Selênio a uma temperatura de 350 – 375°C. Os produtos da digestão foram destilados com 10mL de NaOH mol L^{-1} e a concentração de amônia foi medida por titulação com H_2SO_4 0,0025 mol L^{-1} .

Para a quantificação da concentração de proteína, foram amostrados 500 μL de cada cultura e a análise foi feita seguindo a metodologia proposta por Bradford (1976).

5.3.6 Resistência a estreptomicina

Os isolados bacterianos foram avaliados quanto a resistência a estreptomicina (10mg mL^{-1}) sob condição de fixação de nitrogênio. Cada isolado obtido foi crescido em caldo nutritivo contendo 5g L^{-1} de glicose e 10g L^{-1} de peptona (GPM) por 24h a 30°C. Após o período de incubação o caldo nutritivo foi centrifugado a 5.000g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e pellet contendo as células bacterianas foi re-suspendido em solução de NaCl 0,5% em quantidade suficiente para que a densidade óptica de 0,1 fosse atingida. Uma alíquota 100 μL desta solução foi utilizada como inóculo nos meios de cultura NFb que continham 10mg mL^{-1} de estreptomicina. Quatro dias após a incubação a 30°C, os frascos inoculados foram analisados quanto a presença ou ausência de película característica indicativa do crescimento microbiano. Os microrganismos que apresentaram crescimento nas três repetições utilizadas foram considerados resistentes a estreptomicina.

5.3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos a partir da quantificação da produção de auxinas e da fixação do nitrogênio foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e ao teste de médias múltiplas de Scott-Knott para a determinação das diferenças entre os isolados quanto ao potencial de produção de cada um dos compostos quantificados (Scott & Knott, 1974). Foram utilizados limites de confiança de 0,05 ou menores. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 pode-se observar as principais propriedades do solo amostrado bem como o número de isolados obtidos neste estudo. A maioria dos solos apresentou pH ácido ($> 6,0$), de moderada a baixa quantidade de matéria orgânica (7 a 56 gkg^{-1}) e grande variabilidade no conteúdo de argila (80 a 700 gkg^{-1}). Foram obtidos ao todo, 224 isolados bacterianos da rizosfera, raízes e colmo de milho. Um total de 152 isolados (67,8%) foi obtido a partir do solo rizosférico, 40 isolados (17,8%) foram obtidos a partir das raízes e 32 isolados (13,1%) foram obtidos a partir do colmo do milho.

Tendo em vista que o teste de um grande número de isolados em condições naturais é extremamente laborioso e necessita de tempo e mão de obra qualificada, este estudo foi baseado em técnicas de cultivo *in vitro* para a seleção dos isolados mais promissores. Tais técnicas fornecem uma base para a seleção inicial de bactérias promotoras de crescimento de plantas e que podem ser usadas então para futuros testes sob condições naturais.

TABELA 1. Localização, propriedades químicas dos solos utilizados na amostragem e número de isolados obtidos.

| Região | Código amostra | Cidade | Isolados (no.) | pH | M.O | Argila |
|--------|----------------|--------------------------|----------------|-----|------------------------------|--------|
| | | | | | ---- g kg ⁻¹ ---- | |
| I | 1 | Eldorado do Sul | 11 | 4,1 | 39 | 140 |
| | 14 | Jaguarí | 5 | 4,9 | 10 | 140 |
| | 15 | Mata | 8 | 4,9 | 7 | 140 |
| | 16 | São Vicente do Sul | 9 | 5,3 | 56 | 190 |
| | 27 | Formigueiro | 2 | 5,6 | 45 | 240 |
| | 28 | Paraíso do Sul | 3 | 5,3 | 17 | 140 |
| II | 2 | Salvador do Sul | 3 | 6,2 | 16 | 180 |
| | 3 | Carlos Barbosa | 8 | 4,9 | 34 | 620 |
| | 4 | Nova Prata | 12 | 5,1 | 40 | 470 |
| | 5 | Casca | 9 | 4,6 | 22 | 700 |
| | 6 | Marau | 10 | 4,8 | 32 | 470 |
| | 7 | Colorado | 6 | 5,1 | 34 | 620 |
| | 8 | Palmeiras das Missões | 4 | 4,1 | 18 | 470 |
| | III | 9 | Santo Augusto | 3 | 5,7 | 47 |
| 10 | | Coronel Barros | 11 | 5,2 | 38 | 80 |
| 11 | | São Luiz Gonzaga | 10 | 5,4 | 29 | 620 |
| 12 | | Sto. Antônio das Missões | 6 | 4,9 | 36 | 470 |
| 13 | | Santiago | 4 | 4,4 | 36 | 290 |
| IV | 17 | Alegrete | 8 | 5,1 | 13 | 80 |
| | 18 | Alegrete | 4 | 4,7 | 14 | 140 |
| | 19 | Rosário do Sul | 5 | 4,8 | 15 | 160 |
| | 20 | Livramento | 7 | 6,1 | 29 | 140 |
| | 21 | Dom Pedrito | 10 | 6,9 | 21 | 190 |
| | 22 | Bagé | 7 | 5,1 | 41 | 190 |
| V | 23 | Pinheiro Machado | 9 | 4,5 | 34 | 220 |
| | 24 | Pelotas | 10 | 5,0 | 39 | 170 |
| | 25 | Canguçu | 11 | 4,6 | 36 | 240 |
| | 26 | Santana da Boa Vista | 9 | 5,7 | 44 | 210 |
| | 29 | Minas do Leão | 12 | 5,2 | 13 | 140 |
| | 30 | Arroio Grande | 8 | 5,0 | 33 | 150 |

A capacidade dos isolados em fixar nitrogênio atmosférico foi determinada pela quantificação do nitrogênio total presente nos meios NFb semi-sólidos após 72h de incubação e foi expressa em μg de N mg^{-1} proteína. A produção de AIA foi determinada colorimetricamente e foi expressa em μg de AIA mg^{-1} proteína. Entre os 224 isolados obtidos, 121 apresentaram capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e produzir AIA. Os 30 isolados que apresentaram maiores quantidades de ambos compostos quantificados assim como o isolado *A. brasilense* Sp7, são apresentados na Tabela 2.

Todos os isolados obtidos eram móveis quando observados ao microscópio óptico após 48h de incubação a 30°C e Gram negativos. Para julgar o potencial competitivo dos isolados foi feita a avaliação da resistência a estreptomicina (Tabela 2). A resistência a antibióticos pode ser usada como um indicador de competitividade e sobrevivência, pois muitos dos microrganismos presentes no solo são capazes de produzirem antibióticos (Levy, 2006). Entre todos os isolados obtidos, 53% apresentaram resistência a 10 mgL^{-1} de estreptomicina.

TABELA 2. Produção de ácido indol acético (AIA), fixação biológica do nitrogênio e resistência a estreptomicina das 30 bactérias diazotróficas mais promissoras isoladas do solo rizosférico, raízes e colmo de plantas de milho.

| Código amostra | Isolados | Fonte de isolamento | AIA | | Fixação de N ₂ | | Resistência a estreptomicina |
|----------------|----------|---------------------|-----------------------------|---|---------------------------|---|------------------------------|
| | | | μg mg protein ⁻¹ | | | | |
| 2 | SS-R | Raiz | 28,70 | d | 51,98 | c | + |
| 11 | LG-R | Raiz | 26,11 | d | 38,67 | d | + |
| 11 | LG1-R | Raiz | 246,69 | a | 63,45 | b | + |
| 11 | LG2-R | Raiz | 13,13 | d | 45,01 | c | + |
| 8 | P-S | Rizosfera | 30,06 | d | 47,90 | c | - |
| 26 | SB-S | Rizosfera | 53,55 | c | 11,49 | e | - |
| 21 | DP-S | Rizosfera | 27,45 | d | 10,46 | e | - |
| 1 | EL-S | Rizosfera | 150,29 | b | 65,01 | b | + |
| 25 | CG-S | Rizosfera | 234,66 | a | 32,55 | d | + |
| 1 | EL1-S | Rizosfera | 86,02 | c | 55,75 | b | - |
| 4 | NP-S | Rizosfera | 11,07 | d | 27,41 | d | - |
| 1 | EL2-S | Rizosfera | 3,51 | d | 47,03 | c | + |
| 1 | EL3-S | Rizosfera | 52,36 | c | 24,38 | d | + |
| 1 | EL4-S | Rizosfera | 35,00 | d | 27,95 | d | - |
| 20 | L-S | Rizosfera | 242,74 | a | 83,81 | a | + |
| 2 | SS1-C | Colmo | 94,29 | c | 32,96 | d | + |
| 2 | SS-C | Colmo | 74,95 | c | 33,05 | d | + |
| 2 | SS2-C | Colmo | 41,77 | d | 63,56 | b | + |
| 16 | VS-C | Colmo | 10,15 | d | 53,93 | c | + |
| 2 | SS3-C | Colmo | 70,22 | c | 27,78 | d | + |
| 1 | EL5-S | Rizosfera | 70,62 | c | 43,95 | c | - |
| 6 | M-S | Rizosfera | 212,79 | a | 95,21 | a | + |
| 19 | RS-S | Rizosfera | 26,66 | d | 5,17 | e | - |
| 19 | RS1-S | Rizosfera | 32,07 | d | 49,48 | c | - |
| 1 | EL6-S | Rizosfera | 40,21 | d | 5,25 | e | - |
| 1 | EL7-S | Rizosfera | 64,44 | c | 15,11 | e | - |
| 21 | DP-C | Colmo | 5,53 | d | 60,98 | b | - |
| 5 | C-C | Colmo | 29,92 | d | 38,62 | d | - |
| 25 | CG-C | Colmo | 78,30 | c | 5,10 | e | - |
| 1 | EL-R | Raiz | 38,81 | d | 15,43 | e | + |
| Controle | Sp7 | Rizosfera | 86,36 | c | 76,20 | b | |
| | CV (%) | | 22,45 | | 14,38 | | |

(+) Crescimento em meio NFb semi-sólido com adição de 10 mgmL⁻¹ de estreptomicina após 4 dias de incubação; (-) ausência de crescimento. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si. (p<0,05, n=3).

Tem-se verificado que o AIA excretado pelas bactérias que vivem em associação com a rizosfera é responsável pela estimulação do crescimento e proliferação das raízes secundárias ou pela patogênese em diversas plantas. Muitos grupos microbianos, incluindo aqueles de vida livre ou que vivem em associação com o tecido das plantas podem produzir AIA (Patten & Glick, 1996). Os resultados obtidos neste estudo revelaram que isolados provenientes de diferentes tipos de solo e clima, ou de diferentes partes da planta e do solo rizosférico foram capazes de produzir AIA e que a produção deste fitohormônio não foi dependente do local e nem da parte da planta de onde as bactérias foram isoladas. Os 30 isolados mais promissores produziram AIA variando de 3,51 a 246,69 $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$ proteína após 96h de incubação (período correspondente ao final da fase estacionária de crescimento das culturas) (Tabela 2). De acordo com Ona et al. (2005), a produção de AIA só ocorre sob condições de estresse incluindo deficiência de carbono e estresse por oxigênio na fase final de crescimento das bactérias. Os isolados LG1-R proveniente das raízes, CG-S, L-S e M-S, provenientes do solo rizosférico, apresentaram a maior produção de AIA. Em média estes isolados produziram 234,22 $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$ proteína. Tais isolados sintetizaram, em média, 2,7 vezes mais AIA quando comparados com o controle Sp7, o qual sintetizou 86,36 $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$ proteína.

Entre esses mesmos 30 isolados, a fixação de nitrogênio variou de 15,43 (isolado EL-R) a 95,21 $\mu\text{g de N mg}^{-1}$ proteína (isolado M-S). O isolado M-S, proveniente do solo rizosférico, fixou a maior quantidade de nitrogênio atmosférico em torno de 25% maior do que a quantidade fixada pelo controle *A. brasilense* Sp7 (76,20 $\mu\text{g de N mg}^{-1}$ proteína). O segundo isolado maior produtor L-S (proveniente do solo rizosférico), fixou 83,81 $\mu\text{g de N mg}^{-1}$ proteína, cerca de 10% a mais do que a quantidade de N fixada pelo isolado controle. Ambos isolados apresentaram características desejáveis para a utilização na forma de inoculante sob as condições edafoclimáticas do Rio Grande do Sul.

Para a identificação da espécie dos 30 isolados, o DNA genômico bacteriano foi extraído e uma porção do gene *nifH* foi amplificada e seqüenciada. O gene *nifH* foi selecionado pois está presente na maioria dos sistemas biológicos capazes de fixar nitrogênio atmosférico bem como

apresenta regiões altamente conservadas entre a maioria das bactérias diazotróficas. Além disso, tem sido reportado que a análise filogenética obtida por esse gene é largamente consistente com a filogenia do gene ribossomal do 16S (Zehr et al., 2003) e o banco de dados dos genes que codificam a enzima nitrogenase está aumentando representando atualmente o maior banco de dados não ribossomal de microrganismos não cultivados (Zehr et al., 2003). Em adição, a amplificação do gene *nifH* pode ser utilizada para confirmar o caráter diazotrófico dos microrganismos isolados.

Todos os 30 isolados testados produziram um produto de amplificação de tamanho esperado (≈ 360 pb) com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados (dados não apresentados). A análise filogenética dos genes seqüenciados pode ser observada na Figura 2. Por meio da árvore filogenética pode-se observar a formação de três grupos distintos. O primeiro grupo foi formado por 20 isolados que se agruparam com as bactérias da espécie *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense*. Os baixos valores obtidos pela análise “bootstrap” apresentados nos ramos internos da árvore filogenética indicaram que a análise do gene *nifH* não foi adequada para a diferenciação entre as duas espécies entretanto, o grande grupo, formado por ambas espécies foi fortemente validado pelos valores da análise “bootstrap” (99%).

O segundo grupo observado foi formado por nove isolados similares a espécie *Azospirillum oryzae*. Esta espécie foi originalmente isolada de raízes de arroz e recentemente foi reconhecida como uma nova espécie do gênero *Azospirillum* baseado na análise do gene ribossomal do 16S e em suas características fisiológicas (Xie & Yokota, 2005). Finalmente, o terceiro grupo foi formado por um isolado bacteriano similar a espécie *Herbaspirillum seropedicae*. A formação de ambos grupos foi fortemente validada pelos valores da análise bootstrap (94% e 100%, respectivamente). Bactérias do gênero *Azospirillum* e *Herbaspirillum* já foram detectadas em associação com plantas de milho por vários estudos incluindo aqueles baseados no cultivo dos microrganismos (Baldani & Döbereiner, 1980; Baldani et al., 1986; Palus et al., 1996) e em estudos independentes de cultivo (Chelius & Triplett, 2001). Os mesmos gêneros também tem sido detectados em associação com muitas gramíneas e cereais (Reis et al., 2000), o que indica que ambos os gêneros podem ser inoculados em diferentes espécies de plantas. Os isolados obtidos

foram distribuídos ao acaso entre as amostras mostrando não haver relação entre a presença das espécies isoladas com as características do solo ou o local de amostragem.

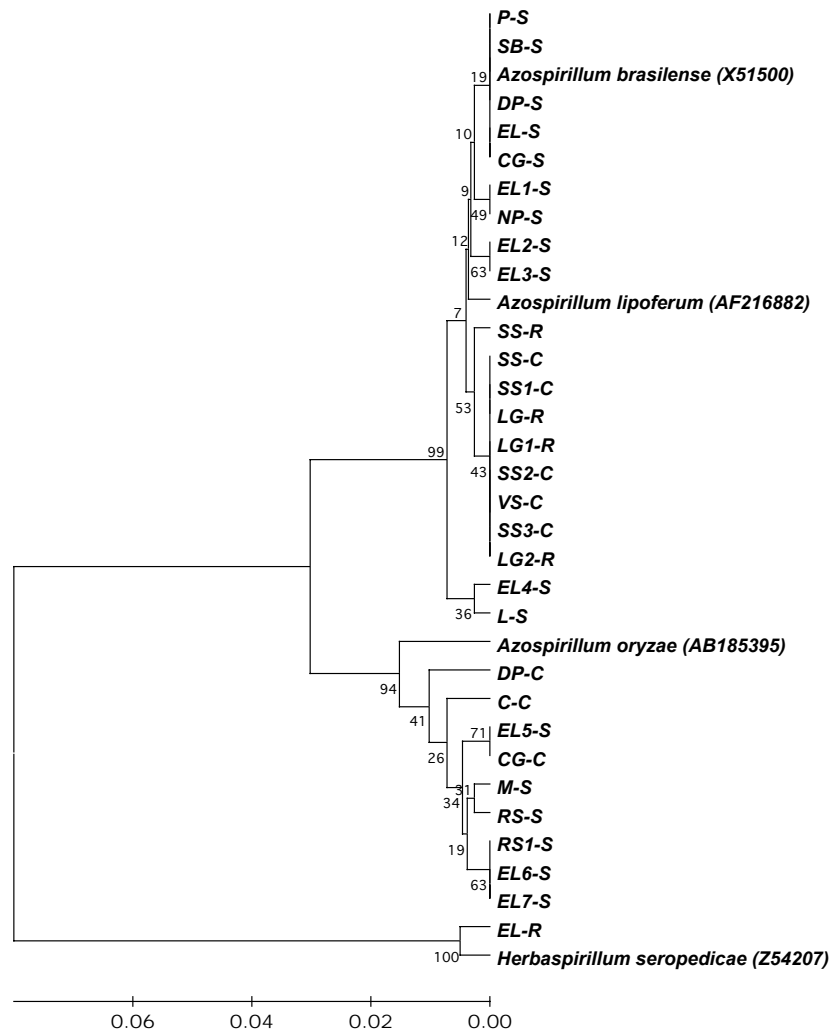


FIGURA 2. Árvore filogenética mostrando a relação entre os genes *nifH* amplificados e seqüenciados de bactérias diazotróficas isoladas do solo rizosférico, raízes e colmo de plantas de milho e genes *nifH* de referência de bactérias diazotróficas identificadas extraídos do Banco de Genes. Filogenia inferida usando o algoritmo do vizinho mais próximo e árvore consenso gerada pelo programa Splits Tree 4 (Huson & Bryant, 2006). Números localizados nos ramos da árvore indicam a porcentagem de 1.000 reamostragens bootstrap. A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos.

5.5 CONCLUSÕES

Os isolados bacterianos identificados neste estudo como *Azospirillum* spp. e *Herbaspirillum seropedicae* apresentaram potencial em produzir auxinas e fixar nitrogênio atmosférico. Tais organismos apresentaram características desejáveis e podem ser bons candidatos para a produção de inoculantes sob as condições edafoclimáticas do Estado do Rio Grande do Sul. Os resultados representam a base para a produção de inoculantes, porém existe a necessidade contínua da seleção de bactérias bem adaptadas capazes de promover um aumento no crescimento das plantas aumentando o rendimento das culturas.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Microbial - Production of plant hormones. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 133, n. 1, p. 1-8, 1991.

ASGHAR, H. et al. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica jucea* L. **Biology and Fertility of Soil**, New York, v. 35, n. 4, p. 231-237, 2002.

BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980.

BALDANI, V.L.D. et al. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 90, n. 3, p. 35-46, 1986.

BASHAN, Y. et al. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004.

BODDY, R. M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent progress and perspectives for the future. **Fertility Research**, Dordrecht, v. 42, n. 1, p. 241-250, 1995.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Review in Microbiology**, Boca Raton, v. 21, n. 1, p. 1-18, 1995.

DOBBELAERE, S. et al. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 22, n. 2, p.107-149, 2003.

DÖBEREINER, J. 1992 History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, n. 1, p. 1-13, 1992.

HUSON, D.H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 254-267, 2006.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Review in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, n. 1, p. 77-119, 1997.

KENNEDY, I. R., et al. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 8, p.1229-1244, 2004.

LEVY, S. B. Mechanisms for resistance in soil. **Science**, Washington, v. 312, n. 5773, p. 529 – 529, 2006.

ONA, O. et al. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 246, n. 1, p. 125-132, 2005.

PALUS, J.A. et al. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Illis and Doebley. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 186, n. 1, p. 135-142, 1996.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, n. 3, p. 207-220, 1996.

POLY, F. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2255-2262, 2001.

REIS, V.M. et al. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 19, n. 3, p. 227-247, 2000.

SARWAR, M. et al. Tryptophan-dependent biosynthesis of auxins in soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.147, n. 2, p. 207-215, 1992.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M., A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

SOARES, R.A. et al. Occurrence and Distribution of Nitrogen Fixing Bacterial Community Associated with Oat (*Avena sativa*) Assessed by Molecular and Microbiological Techniques. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 221-234, 2006.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 24, n.4, p. 487-506, 2000.

SUMNER, M. E., Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Advances in Soil Science**, New York, v. 12, n. 1, p. 53-123, 1990.

TARRANT, J. et al. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, n. 8, p. 967-980, 1978.

TEDESCO, L.M. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174p.

THOMPSON, J. D., et al. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

WELBAUM, G.E. et al. Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 23, n. 2, p. 175-193, 2004.

XIE, C.; YOKOTA, A, *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 55, n. 4, p. 1435-1438, 2005.

ZAKHAROVA, E. A. et al. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense* - Insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, Oxon, v. 259, n. 3, p. 572-576, 1999.

ZEHR, J.P. et al. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, New York, v. 5, n. 7, p. 539-554, 2003.

CAPÍTULO V

SISTEMA INTEGRADO DE SEQÜENCIAMENTO GENÔMICO BASEADO EM PIROSEQÜENCIAMENTO APLICADO A AVALIAÇÃO DA BIODIVERSIDADE TOTAL DO SOLO

6.1 RESUMO

O uso de técnicas de biologia molecular foi significativo para o avanço no estudo da diversidade microbiana, mas não o suficiente para detecção da totalidade de espécies em um determinado ecossistema. Para que esta meta seja atingida, é necessário aumentar significativamente o número de seqüências para além dos reportados na literatura (máximo de 1.033 seqüências), suficiente para detectar o número total de espécies presentes neste ambiente. Deste modo, o presente trabalho objetivou avaliar a biodiversidade integral de bactérias presentes em um grama de solo (todos os indivíduos de uma comunidade biológica), adaptando um sistema integrado de seqüenciamento genômico (454 Machine Life Sciences®) para seqüenciar mais de 25.000 fragmentos do gene ribossomal 16S amplificado a partir do DNA bacteriano extraído diretamente de quatro tipos distintos de solos coletados no Brasil, Canadá e Estados Unidos. O número total de espécies bacterianas presentes no solo foi verificado com o seqüenciamento de 26.115 a 53.245 seqüências e este número foi dependente do tipo de solo amostrado nos diferentes países e sob diferentes coberturas vegetais. O número máximo de espécies encontradas foi de 6.543 por grama de solo, utilizando-se um coeficiente de similaridade entre as seqüências de 100%. A maior diversidade de espécies foi verificada em um solo de floresta natural do Canadá que não teve influência antrópica. Em todos os solos foi detectada dominância generalizada de bactérias pertencentes ao filo Proteobactéria (mais de 50%). Com relação a detecção de bactérias diazotróficas nas amostras de solo, verificou-se a presença de 57 a 62 gêneros bacterianos cultiváveis fixadores de nitrogênio. Embora a diversidade das bactérias diazotróficas tenha sido elevada nas amostras de solo, houve a presença de gêneros dominantes nas comunidades avaliadas. Com base nos resultados, conclui-se que a adaptação da técnica do seqüenciamento genômico baseado em piroseqüenciamento permitiu avaliar a biodiversidade do solo na sua totalidade, confirmado pela análise de suficiência amostral, curvas de extinção (rarefação) e por indicadores paramétricos e não paramétricos de diversidade.

6.2 INTRODUÇÃO

Apesar do estudo da biodiversidade microbiana ter evoluído consideravelmente com a introdução do uso de técnicas de biologia molecular, a “real” diversidade é ainda uma vaga idéia, e geralmente superestimada por índices que variam de 1.000 vezes ou mais. Até o momento, o maior levantamento da diversidade microbiana do solo, citado na literatura, foi baseado em uma amostragem de apenas 1.033 seqüências (Schloss & Handelsman, 2006).

As investigações sobre a comunidade bacteriana requerem um grande número de amostras (superior a 80% de todos os indivíduos de uma comunidade) para refletir a “real” diversidade da comunidade em estudo (Curtis, 2006). Estimativas deste nível são limitadas pelo tempo, custo e técnica, assim como podem se tornar impraticáveis devido ao elevado número de microrganismos presentes no ambiente (Gans et al., 2005). Para o solo, estas limitações são ainda maiores, pois o mesmo abriga a maior e mais diversa população bacteriana do planeta, bem como apresenta múltiplos microhabitats que dificultam a estimativa do número de espécies bacterianas presentes. A estimativa adequada desta diversidade representa o primeiro passo para o entendimento da microbiota do solo e a partir disso, compreender mais efetivamente as relações e funções que desempenha no ambiente.

O primeiro levantamento bacteriano para avaliar a diversidade do solo foi conduzido por Torsvik et al. (1990), onde o número de genomas bacterianos presentes em uma amostra composta foi estimado usando a técnica de hibridização DNA:DNA. Por meio desta técnica e admitindo o risco de prováveis erros causados pela extrapolação dos resultados, Torsvik et al. (1990) estimaram que o número de espécies bacterianas presentes em um grama de solo era de aproximadamente 10 mil. Mais recentemente, Gans et al.

(2005) re-avaliaram esta metodologia e estimaram em aproximadamente 10 milhões de espécies microbianas presentes em um grama de solo. Todavia, estes autores concluíram que tal estimativa não poderia ser verificada na prática com a atual tecnologia de seqüenciamento de DNA.

Com base em extrapolações, alguns pesquisadores tentaram estimar o número de espécies bacterianas em um grama de solo a partir da clonagem e do seqüenciamento do RNA ribossomal 16S amplificado a partir do DNA microbiano extraído diretamente do solo. Schloss & Handelsman (2006) definiram uma unidade taxonômica (UT) (ou espécie bacteriana) como aquelas seqüências que apresentaram 97% de similaridade entre si. Usando esta definição e dois bancos de dados contendo seqüências clonadas, os pesquisadores estimaram a presença de 2.000 UTs para o solo coletado no Alaska e 5.000 UTs para o solo coletado em Minnesota, sendo esta estimativa obtida a partir de 1.033 e 600 seqüências do gene ribossomal 16S, respectivamente. Utilizando o mesmo procedimento e com base em cálculos não paramétricos, Hong et al. (2006) analisaram 556 seqüências do gene ribossomal 16S e concluíram que um grama de sedimentos marinhos continha entre 2.000 e 3.000 espécies bacterianas.

Até o presente, a magnitude de tais estudos tem se demonstrado insuficiente para revelar a diversidade integral de microorganismos presentes no ambiente. Recentemente, Margulies et al. (2005) desenvolveram um sistema integrado (454 Life Sciences®) baseado em um método de emulsão (EmPCR) para isolar e amplificar fragmentos de DNA *in vitro*, e no piroseqüenciamento otimizado pelo uso de um suporte sólido construído em fibra óptica. O piroseqüenciamento é uma técnica de seqüenciamento de DNA baseada na detecção de pirofosfato liberado durante a síntese de DNA. Este sistema foi desenvolvido para a análise de genoma e permite o seqüenciamento de mais de 20 milhões de bases em 4,5 horas com precisão de 99% ou mais e com a vantagem de dispensar as etapas de clonagem e seleção de clones. Sogin et al. (2006) adaptaram este sistema para o seqüenciamento parcial do 16S rRNA amplificado a partir de DNA microbiano de ambiente aquático marinho. Estes autores utilizaram oito amostras e amplificaram de 5.000 a 17.660 seqüências, mas o número de seqüências amostradas não foi suficiente para revelar o número total de espécies

presentes neste ambiente, conforme ficou demonstrado pelas curvas de extinção (rarefação) que não atingiram, em nenhuma das amostras, o platô indicativo da detecção total das espécies presentes neste ambiente.

Apesar desta iniciativa, o editorial da Revista Nature (Curtis, 2006) faz um desafio aos ecologistas microbianos ao afirmar que é tempo de pensar e agir grande. O editor salienta que o diagnóstico da biodiversidade é dependente de vários fatores, sendo o número amostral o maior entrave. O desafio consiste em identificar o maior número possível de seqüências para que seja atingida a suficiência amostral e, conseqüentemente, detectar a diversidade total do ambiente, superando as estimativas existentes na literatura. A partir deste desafio, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a biodiversidade integral de bactérias presentes em um grama de solo, adaptando o sistema integrado de seqüenciamento genômico desenvolvido por Margulies et al. (2005) para seqüenciar mais de 25.000 fragmentos do gene ribossomal 16S amplificado a partir do DNA bacteriano extraído diretamente de solos coletados no Brasil, Canadá e Estados Unidos.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1 Locais de estudo e amostragem do solo

Para o presente estudo, foram utilizados quatro tipos de solo: um solo proveniente do Canadá, um do Brasil e dois dos Estados Unidos. Teve-se como objetivo amostrar solos provenientes de diferentes locais, coberturas vegetais e regiões climáticas para a obtenção da maior variabilidade possível da comunidade microbiana (Tabela 1). Foram coletadas amostras de aproximadamente 500g de solo da camada superficial (0 a 20 cm de profundidade). As amostras foram armazenadas em sacos plásticos esterilizados e mantidas a 4°C até o momento da extração do DNA. O DNA bacteriano foi isolado do solo usando o kit para a extração de DNA FastDNA® (Qbiogene, Inc., Calif.). Após a extração do DNA, as amostras foram purificadas usando o kit DNeasy Tissue (Qiagen, Valencia, Calif.) seguindo as instruções do fabricante.

TABELA 1. Local de amostragem, classificação e tipo de vegetação dos solos amostrados.

| Local de amostragem | Localização Geográfica | Classificação do solo | Tipo de vegetação |
|---------------------|------------------------|-----------------------|-------------------|
| Brasil | 55° 06' 45" O | Latossolo Vermelho | Milho |
| | 29° 32' 38" S | Distrófico | |
| Canadá | 91° 43' 10" O | Argissolo Amarelo | Floresta Natural |
| | 52° 44' 59" N | Distrófico | |
| Florida | 80° 62'84" O | Organossolo Háptico | Cana-de-açúcar |
| | 26° 66'31" N | | |
| Illinois | 88° 13'59" O | Nitossolo Vermelho | Milho |
| | 40° 06'27" N | Eutroférico | |

6.3.2 Seleção dos oligonucleotídeos iniciadores, amplificação e seqüenciamento do DNA

Para a seleção dos oligonucleotídeos iniciadores usados na amplificação das seqüências de DNA do gene 16S de Eubactéria foram examinadas áreas conservadas dos genes depositados no banco de dados ribossomal RDP II (<https://rdp.cme.msu.edu>). A seleção dos oligonucleotídeos iniciadores baseou-se na necessidade de obtenção fragmentos menores que 800 pb e na presença de uma região altamente variável em uma das extremidades das seqüências de no mínimo 100 pb. Buscaram-se também, dados recentes sobre o grau de variabilidade e número de bases de diversos pares de oligonucleotídeos iniciadores já publicados e desenhados para a amplificação das regiões variáveis V1-V9.

Seqüências representativas de cada filo bacteriano foram alinhadas usando ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) e regiões conservadas presentes em todos os filios foram analisadas. Com base nestes procedimentos foram selecionados os oligonucleotídeos iniciadores 780f e uma modificação do oligonucleotídeo iniciador 1492r. O oligonucleotídeo iniciador 1492r tem sido largamente utilizado desde sua publicação por Lane (1991). Entretanto, a seqüência original do mesmo (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') não é conservada em todas as posições. O primeiro nucleotídeo G e o primeiro T são variáveis conforme observado pelo alinhamento de seqüências representativas dos filios bacterianos existentes disponíveis em um banco de dados mais recente (RDP II). Assim, o oligonucleotídeo iniciador 1492r foi redesenhado para: 5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3' (N = A, C, G ou T) onde a posição 3' corresponde a posição 1492 de *E. coli*. O novo oligonucleotídeo iniciador apresenta um par de bases a menos do que o oligonucleotídeo iniciador original. A seqüência do oligonucleotídeo iniciador com a modificação proposta foi encontrada em 36.850 seqüências de Eubactéria em um banco de dados de 262.030 seqüências do gene 16S do RDP II enquanto que apenas 10.860 seqüências foram encontradas usando o oligonucleotídeo iniciador 1492r original. A modificação proposta por este estudo foi apta a capturar um maior número de seqüências do que qualquer outra modificação da região 1492

proposta pela literatura até o presente. Para o segundo oligonucleotídeo iniciador, foi selecionada a região 787f. Este oligonucleotídeo iniciador (5'-AATAGATACCCNGGTAG-3') capturou 157.088 seqüências num banco de dados de 262.030 seqüências do gene 16S depositadas no RDPII.

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizou-se 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador, 5 unidades de Turbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA), 1X tampão de reação e 200 μ M de dNTPs (Pierce Nucleic Acid Technologies, Milwaukee, WI) a um volume final de 100 μ L. A quantidade de DNA molde utilizada foi calculada com base no número de células bacterianas presentes em um grama de solo. Assumiu-se uma comunidade microbiana de 10^9 células por grama de solo, e um genoma bacteriano médio de 3Mb. Assim, calculou-se que um grama de solo pode conter aproximadamente 3,12 μ g de DNA bacteriano. Para a obtenção da amplificação de todo DNA presente em um grama de solo optou-se pela utilização de 96 reações para a obtenção de aproximadamente 3 μ g de produto final em 20 ciclos de amplificação. O programa de PCR utilizado foi desenvolvido para produzir um produto final a uma elevada temperatura de anelamento em um número mínimo de ciclos possível requerido para a obtenção de uma concentração final de DNA suficiente para ser utilizada no processo de piroseqüenciamento após as etapas de purificação. Após uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, procederam-se 20 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto seguido de 72°C por 6 minutos para a extensão final. Ao final do processo de amplificação o produto produzido nos 96 tubos utilizados foi misturado em uma só amostra, concentrado e purificado utilizando o kit MinElute para purificação de PCR (Qiagen, Valencia, CA). A qualidade e a quantidade dos produtos da amplificação final foram analisadas em Agarose ultrapura a 1,5% (Invitrogen, Carlsbad, California).

Para o seqüenciamento do DNA microbiano amplificado seguiu-se a metodologia proposta por Margulies et al. (2005) com modificações. Havia a necessidade de ajuste do sistema utilizado no seqüenciamento genômico de um organismo, para o seqüenciamento de fragmentos múltiplos de DNA oriundos de diferentes organismos. Este ajuste foi possível por meio da inserção da seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores nos adaptadores originais permitindo assim a ligação ao DNA amplificado usando dois ciclos de

PCR. Os fragmentos do DNA foram ligados através de uma reação de PCR de dois ciclos aos novos adaptadores A (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCCCATC TGTTCCCTCCCTGTCTCAGGITACCTTGTTACGACTT-3' e B (5'-BioTEG/CCTATCCCCTGTGTGCCTTGCCTATCCCCTGTTGCGTGTCTCAGATTAGATACCCIGGTAG-3'). A ligação dos fragmentos amplificados aos adaptadores permitiu, numa etapa posterior, o seqüenciamento unidirecional do DNA. Optou-se pela amplificação dos fragmentos gerados pelo oligonucleotídeo iniciador reverso 1492r devido a presença de regiões hipervariáveis. Uma vez inseridos os adaptadores, os fragmentos foram ligados a microesferas carregadas. O DNA fita dupla foi desnaturado por meio de uma reação alcalina e as fitas que continham o adaptador B ficam ligadas as microesferas. Foi feita a lavagem do material e, as fitas simples, que continham o adaptador A que não estavam ligadas as esferas, foram recuperadas. O DNA fita simples recuperado foi novamente capturado por meio do uso de microesferas previamente ligadas a seqüências de oligonucleotídeos complementares ao adaptador A. Por hibridização, as fitas simples de DNA amplificadas foram ligadas as microesferas em condições que permitiram a ligação de apenas uma fita por microesfera. As microesferas foram então capturadas em gotículas de uma mistura de reação de PCR em óleo emulsificante (EmPCR). A re-amplificação do DNA ocorreu em cada gotícula resultando em microesferas contendo 10 milhões de cópias de um único DNA molde. Este procedimento foi necessário para a amplificação do DNA ligado as microesferas e geração de um elevado número de cópias de DNA suficiente para a obtenção de um sinal forte no seqüenciamento. A emulsão foi quebrada, as fitas de DNA foram desnaturadas e as microesferas contendo os clones de DNA fita simples foram depositadas em uma placa confeccionada com tubos de fibra óptica tipo PicoTiter (Life Sciences) para o piroseqüenciamento em um seqüenciador tipo 20 system (Roche, Basel, Switzerland).

6.3.3 Determinação das unidades taxonômicas e estimativas de riqueza e diversidade de espécies

Para minimizar os efeitos aleatórios do seqüenciamento foram eliminadas aquelas seqüências que: a) não apresentavam, em sua região terminal, a seqüência do oligonucleotídeo iniciador; b) apresentavam menos do que 50 nucleotídeos; c) apresentavam mais de um nucleotídeo não determinado (N). Também foi eliminada a região do oligonucleotídeo iniciador das seqüências obtidas.

As seqüências obtidas de cada um dos quatro solos foram agrupadas de acordo com sua similaridade usando o programa computacional DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005). Inicialmente, as seqüências foram alinhadas usando o programa MUSCLE (Edgar, 2004) (com os parâmetros -maxiters 1, -diags1 e -sv). Com base no alinhamento das seqüências, foi construída uma matriz de distâncias usando o programa DNAdist do pacote de programas PHYLIP versão 3.6 (Felsensten, 1989). A matriz de distâncias foi usada como arquivo de entrada de dados no programa DOTUR que agrupou as seqüências em Unidades Taxonômicas (UTs) definidas de acordo com a percentagem de similaridade entre as mesmas. As seqüências foram agrupadas utilizando quatro critérios: seqüências únicas (100% similares), 99%, 93% e 91% similares. Uma vez agrupadas em UTs, a distribuição de freqüências em cada nível de similaridade foi utilizada para a construção de curvas de rarefação, riqueza de espécies (índices não paramétricos Chao1 e ACE) e índices de diversidade (Shannon-Weaver e Eqüitabilidade) conforme descrito em Schloss & Handelsman (2005). Também foi aplicado um segundo grupo de procedimentos estatísticos para estimar a riqueza de espécies com base em procedimentos paramétricos. Utilizou-se o modelo Log-normal descrito por Chao & Bunge (2002) para a estimativa da riqueza.

6.3.4 Probabilidade da descoberta de novas unidades taxonômicas e análise da suficiência amostral

A estimativa da probabilidade de descoberta de uma nova unidade taxonômica foi determinada utilizando a metodologia proposta por Clayton & Frees (1987). Nessa metodologia, a probabilidade de que uma nova UT seja descoberta na próxima amostragem foi calculada pela equação: $\sum p_i q_i^n$ onde p_i = número de seqüências na UT i dividido pelo número total de seqüências amostrado (n) e $q_i = 1 - p_i$. O número de seqüências necessário para que uma nova UT seja amostrada foi calculado pelo inverso da probabilidade estimada acima. Para a análise de suficiência amostral utilizou-se a metodologia descrita por Mullins et al. (1995). A cobertura do número de seqüências amostradas (C) é igual a $1 - (n_1/N)$ onde n_1 é o número de seqüências que ocorreram apenas uma vez (seqüências únicas) e N é o número total de seqüências amostradas.

Para os cálculos de suficiência amostral, probabilidade de descoberta de uma nova unidade taxonômica e do número de seqüências necessárias para a identificação de uma nova unidade taxonômica foram utilizadas seqüências parciais do gene 16S agrupadas pelo critério de 99% de homologia.

6.3.5 Classificação taxonômica

As seqüências do gene 16S rRNA obtidas nesse estudo foram classificadas de acordo com sua taxonomia utilizando uma ferramenta on-line denominada classificador taxonômico automático (<http://greengenes.lbl.gov>). Esta ferramenta não faz a reconstrução filogenética das seqüências submetidas, entretanto faz uma busca da seqüência mais similar depositada em um banco de dados e previamente classificada. As seqüências submetidas são inicialmente alinhadas uma a uma em relação a um banco de dados de referência composto por mais de 100.000 seqüências do gene ribossomal do 16S utilizando NAST: um servidor para alinhamentos múltiplos por análise comparativa de genes 16S rRNA (DeSantis et al., 2006). Uma vez alinhadas, as seqüências foram submetidas ao classificador que faz a categorização das

seqüências de acordo com a seqüência mais similar no banco de dados de referência.

6.3.6 Diversidade de bactérias diazotróficas cultiváveis

A análise da diversidade das bactérias diazotróficas cultiváveis presentes nas amostras de solo foi feita com base na classificação taxonômica das seqüências do gene ribossomal do 16S conforme descrito no item 5.3.5. Foram utilizadas seqüências parciais já amplificadas e seqüenciadas neste estudo que apresentaram similaridade superior a 90% com seqüências do gene ribossomal do 16S pertencentes aos gêneros bacterianos reconhecidamente fixadores de nitrogênio. Os gêneros bacterianos e o número de seqüências obtidas para cada gênero foram utilizados para os cálculos do índice de diversidade de Shannon-Weaver e Equitabilidade. O índice de Shannon-Weaver foi calculado pela seguinte equação: $H = -\sum(P_i \ln[P_i])$ onde; P_i é igual ao número organismos de um determinado gênero dividido pelo número total de organismos observados. O índice de Equitabilidade foi definido pelo quociente entre H e o logaritmo natural de S ($E = H/\ln[S]$) onde; H é o índice de Shannon-Weaver e S é o número total de gêneros observados.

6.3.7 Números de acesso das seqüências de nucleotídeos

Todas as seqüências do gene ribossomal do 16S obtidas neste estudo foram submetidas ao Banco de Genes NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e receberam os seguintes números de acesso: Brasil - EF222481 a EF248596; Canadá - EF308591 a EF361836; Florida - EF248597-EF276844 e Illinois - EF276845-EF308590.

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atualmente existe um consenso entre ecologistas microbianos de que a chave para estimar a diversidade microbiana é evitar o isolamento focalizando os estudos no DNA microbiano (Curtis & Sloan, 2005). Tal consenso emerge do conceito de que seqüências de DNA podem ser usadas na identificação de microrganismos. A estimativa da biodiversidade de bactérias presentes no solo tem sido um desafio persistente em microbiologia. Devido a características morfológicas e fisiológicas das bactérias, há necessidade da utilização de análises indiretas, envolvendo o cultivo *in vitro* ou o seqüenciamento de genes marcadores, para a condução de censos microbianos nos ecossistemas. Neste estudo, seqüências amplificadas do gene 16S de bactérias que habitam o solo foram agrupadas com base na distância genética entre os pares de seqüências. Utilizou-se o gene ribossomal 16S como ferramenta para a classificação filogenética de bactérias (Pace, 1997) e para a definição de espécies com base na similaridade entre as seqüências (Schloss & Handelsman, 2004). Embora tais comparações sejam baseadas em aproximações, seqüências que apresentam cerca de 97% similaridade ou mais foram consideradas pertencentes a uma mesma espécie (Stackebrandt & Goebel, 1994; Schloss & Handelsman, 2006). Todavia, tal distinção tem sido considerada arbitrária e controversa (Ward, 1998; Rossello-Mora, 2003), mas de grande utilidade para comparações entre diferentes comunidades. Neste estudo, utilizou-se para a definição de espécie desde critérios mais rígidos (100% similaridade) até critérios menos rígidos (91%) para estimar o número de bactérias em um grama de solo (Tabela 2).

Foram obtidas 53.245 seqüências do solo coletado em uma floresta natural do Canadá, ao passo que para os solos cultivados com milho no Brasil e Illinois foram obtidas 26.115 e 31.745 seqüências, respectivamente (Tabela

2). No solo da Flórida, cultivado com cana-de-açúcar foram obtidas 28.247 seqüências. Os fragmentos do gene 16S seqüenciados apresentaram em média 110 pb. Embora tenham sido amplificados fragmentos de aproximadamente 800 pb, o comprimento máximo das seqüências geradas pelo equipamento utilizado varia de 80pb a 120pb (Margulies et al., 2005).

TABELA 2. Número de seqüências amostradas, unidades taxonômicas (UTs) observadas, riqueza de espécies e índices de diversidade de espécies calculados para quatro diferentes critérios de agrupamento entre as seqüências do gene 16S extraído de bactérias dos solos do Brasil, Canadá, Florida e Illinois.

| Similaridade (%) | Seqüências amostradas | UTs | Riqueza de espécies | | | Índices de diversidade | |
|------------------|-----------------------|-------|---------------------|------------------------|-------|------------------------|-------|
| | | | Modelo Paramétrico | Modelo não paramétrico | | H^1 | E^2 |
| | | | Log-normal | Chao1 | ACE | | |
| Brasil | 26.115 | | | | | | |
| 100 | | 4.241 | 3.628 ± 84 | 4.241 | 4.241 | 7,072 | 0,846 |
| 99 | | 3.816 | 3.088 ± 80 | 3.816 | 3.816 | 6,952 | 0,842 |
| 97 | | 2.160 | 1.938 ± 68 | 2.160 | 2.160 | 6,304 | 0,821 |
| 91 | | 866 | 929 ± 53 | 866 | 866 | 5,324 | 0,787 |
| Canadá | 53.245 | | | | | | |
| 100 | | 6.543 | 6.820 ± 121 | 6.543 | 6.545 | 7,466 | 0,849 |
| 99 | | 5.627 | 6.111 ± 123 | 5.627 | 5.628 | 7,326 | 0,848 |
| 97 | | 3.261 | 4.652 ± 125 | 3.261 | 3.261 | 6,781 | 0,838 |
| 91 | | 1.614 | 3.145 ± 118 | 1.614 | 1.614 | 5,891 | 0,797 |
| Florida | 28.247 | | | | | | |
| 100 | | 4.259 | 4.345 ± 86 | 4.259 | 4.272 | 6,954 | 0,832 |
| 99 | | 3.770 | 3.866 ± 96 | 3.770 | 3.780 | 6,831 | 0,829 |
| 97 | | 2.300 | 2.391 ± 91 | 2.300 | 2.307 | 6,343 | 0,819 |
| 91 | | 1.232 | 1.309 ± 77 | 1.232 | 1.235 | 5,552 | 0,780 |
| Illinois | 31.745 | | | | | | |
| 100 | | 4.307 | 4.435 ± 128 | 4.307 | 4.326 | 7,083 | 0,846 |
| 99 | | 3.738 | 3.866 ± 128 | 3.738 | 3.752 | 6,952 | 0,845 |
| 97 | | 2.192 | 2.289 ± 87 | 2.192 | 2.220 | 6,453 | 0,838 |
| 91 | | 1.031 | 1.111 ± 80 | 1.031 | 1.036 | 5,579 | 0,804 |

¹Shannon–Weaver; ²Equitabilidade

6.4.1 Riqueza e biodiversidade de bactérias no solo

De acordo com Hughes et al. (2001), em qualquer comunidade, o número de unidades taxonômicas observadas aumenta com o aumento do número de amostras até que todas as unidades amostrais sejam observadas. Uma forma de se saber a amplitude da amostragem realizada é plotar curvas de rarefação. O cálculo de curvas de rarefação requer dados quantitativos e qualitativos de todas as seqüências tipo de um banco de dados (Chelius & Triplett, 2001) e resultam da média de amostragens aleatórias cumulativas das seqüências tipo, ou unidades taxonômicas observadas, plotadas no eixo das ordenadas, pelo número total de amostras tomadas plotadas no eixo das abscissas. Se os erros causados pela manipulação do DNA não forem considerados então a curva de rarefação poderá refletir a diversidade taxonômica do ecossistema amostrado (Stackebrandt & Goebel, 1994).

Mesmo quando foi utilizada a máxima distância genética (100% similaridade) para a definição do agrupamento das seqüências em unidades taxonômicas, observou-se nos quatro solos utilizados neste estudo, uma tendência das curvas de rarefação (Figura 1) em atingir um platô. O platô indica que mesmo que novas seqüências fossem amostradas, a probabilidade de se observar uma nova unidade taxonômica é muito baixa, isto é, o número de seqüências amostradas foi suficiente para revelar a diversidade total das bactérias presentes nos quatro ecossistemas amostrados. Tais resultados foram corroborados pela análise de suficiência amostral cujos dados são apresentados na Tabela 3. Pode-se verificar que em todos os solos mais de 99% das unidades taxonômicas foram amostradas. De acordo com a metodologia proposta por Clayton & Frees (1987), a probabilidade de descoberta de uma nova unidade taxonômica caso uma nova amostra seja tomada foi de 2,4% para o solo da Florida e 1,6% para o solo do Canadá. Para o solo coletado no Brasil a probabilidade de descoberta de uma nova unidade taxonômica foi de 1,9% e para o solo coletado em Illinois esta probabilidade foi de 2,0% (Tabela 3).

Por meio da plotagem de curvas de rarefação também se pode verificar que o solo coletado de uma floresta natural do Canadá apresentou maior número de unidades taxonômicas. O solo coletado em uma lavoura de cana-

de-açúcar no estado da Florida apresentou o segundo maior número de unidades taxonômicas seguido dos solos de Illinois e Brasil, ambos coletados em lavoura de milho.

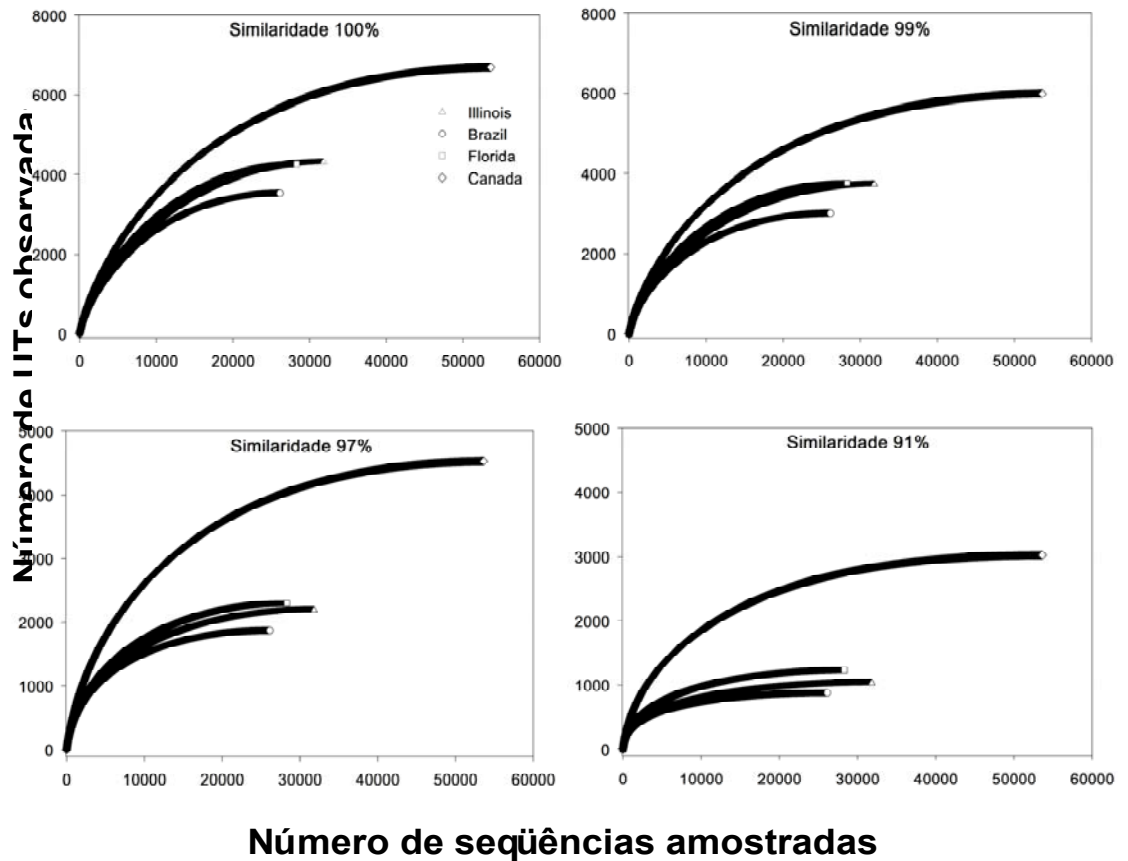


FIGURA 1. Curvas de rarefação calculadas pelo programa DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005) para seqüências do gene ribossomal 16S amplificado de amostras de solos do Brasil, Canadá, Florida e Illinois.

Curvas de rarefação são apenas uma forma, entre muitas outras, de analisar e comparar a diversidade de bactérias entre comunidades. Um conjunto de outras ferramentas, incluindo Chao1, ACE, Log-normal, Shannon-Weaver e Equitabilidade foram aplicados neste estudo para a avaliação da biodiversidade bacteriana do solo (Tabela 3). Como se pode observar pelos resultados apresentados na Tabela 3, o número de unidades taxonômicas observado atingiu valores próximos aos calculados pelas estimativas de

riqueza independente do critério de similaridade utilizado. Tais resultados indicam que a amostragem foi suficiente para revelar o número total de espécies presentes em cada solo amostrado já que os valores observados se aproximam dos valores estimados. Os resultados consistentemente indicaram que o solo que não sofreu ação antrópica coletado em floresta natural (Canadá), possuía maior biodiversidade bacteriana do que o restante dos solos amostrados (Tabela 2). Neste mesmo solo, os índices não paramétricos Chao1 e ACE, que estimam que o número de unidades taxonômicas, variou de 6.545 a 1.614 quando foram utilizados 100% a 91% de similaridade entre as seqüências, respectivamente. O restante dos solos que apresentaram ação antrópica, apresentou número de espécies similar. Segundo o índice Chao1 e considerando 100% de similaridade entre seqüências, o solo do Brasil apresentou 4.241 UTs, o solo coletado na Florida apresentou 4.259 UTs e o solo de Illinois apresentou 4.307 UTs. Os três índices utilizados (Chao1, ACE e Log-normal) apresentaram valores de riqueza similares dentro de cada solo analisado.

TABELA 3. Análise de suficiência amostral, probabilidade de descoberta de uma nova unidade taxonômica ($\sum p_i q_i^n$) e número de seqüências necessárias para a observação de uma nova unidade taxonômica ($1/\sum p_i q_i^n$). Resultados obtidos utilizando a distribuição de freqüências das unidades amostrais agrupadas com 99% de similaridade.

| Amostras | Suficiência amostral | $\sum p_i q_i^n$ | $1/\sum p_i q_i^n$ |
|----------|----------------------|------------------|--------------------|
| | ----- % ----- | | |
| Brasil | 99.9 | 1,9 | 53 |
| Canadá | 99.7 | 1,6 | 60 |
| Florida | 99.8 | 2,4 | 40 |
| Illinois | 99.8 | 2,0 | 48 |

Utilizando uma definição menos rigorosa, que considera seqüências que apresentem 97% de similaridade como pertencentes à mesma espécie, (Stackebrandt & Goebel, 1994; Schloss & Handelsman, 2006), detectou-se a presença de 2.160 espécies g^{-1} de solo coletado no Brasil, 3.261 espécies g^{-1} de solo coletado no Canadá, 2.300 espécies g^{-1} de solo coletado na Florida e 2.192 espécies g^{-1} de solo coletado em Illinois.

Índices ecológicos padrão (Shannon-Weaver e Equitabilidade) que estimam a diversidade de espécies foram aplicados aos dados obtidos. O índice de Shannon-Weaver (H) é um índice de diversidade sensível a riqueza e a abundância de espécies (Atlas & Bartha, 1998). Equitabilidade (E) indica se há dominância de espécies dentro de cada comunidade analisada. Considerando um critério mais rígido (100% de similaridade entre as seqüências) foi detectada maior diversidade bacteriana no solo coletado no Canadá ($H = 7,466$) (Tabela 3). A menor diversidade foi detectada no solo proveniente da Florida ($H = 6,954$) enquanto que os solos coletados de lavoura de milho do Brasil e de Illinois apresentaram índices de diversidade similares ($H = 7,072$ e $7,083$ respectivamente). Entretanto, os valores calculados de Equitabilidade indicaram que houve a dominância de espécies em todos os solos amostrados.

6.4.2 Classificação taxonômica

A avaliação adequada da funcionalidade do ecossistema depende estritamente do conhecimento da biodiversidade total. Conforme apresentado anteriormente, este conhecimento foi possível a partir da adaptação da técnica de seqüenciamento genômico. Além disso, esta técnica permite inúmeros exercícios de filogenia, que auxiliam na identificação e classificação das espécies bacterianas presentes. Como exemplo, e utilizando o nível hierárquico de filo foi possível identificar e avaliar a freqüência dos principais filios bacterianos detectados pela análise comparativa das seqüências do gene 16S rRNA (Figura 2). Dos 52 filios atualmente existentes (Rappé & Giovannoni, 2003) foram detectadas seqüências em 23, 24, 26 e 22 diferentes filios nos solos do Brasil, Canadá, Florida e Illinois, respectivamente. Entretanto,

independente do local de origem do solo, clima ou vegetação predominante, observou-se grande dominância de bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria em todos os solos analisados.

Na amostra de solo coletada no Brasil, o filo Proteobacteria correspondeu a 50,61% das seqüências amostradas sendo composto pelas proporções das seguintes classes: Alpha (12,17%), Beta (13,16%), Delta (4,04%), Epsilon (0,02%) e Gamma (21,23%). Também foram detectadas proporções substanciais de seqüências classificadas como pertencentes aos filios Acidobacteria (12,99%), Actinobacteria (5,05%) e Bacteroidetes/Chlorobi (19,45%). Na amostra de solo proveniente do Canadá, o filo Proteobacteria compreendeu 50,66% das seqüências amostradas, sendo composto pelas proporções das seguintes classes Alpha (6,64%), Beta (21,61%), Delta (12,82%), Epsilon (0,10%) e Gamma (9,49%). Além das Proteobacterias, observou-se a dominância de bactérias pertencentes aos filios: Acidobacteria (9,69%), Actinobacteria (9,38%), Bacteroidetes/Chlorobi (5,81%) e Firmicutes (6,14%).

Na amostra de solo proveniente da Florida, o filo Proteobacteria correspondeu a 52,31% das seqüências amostradas sendo composto pelas proporções das seguintes classes Alpha (8,54%), Beta (24,19%), Delta (7,58%), Epsilon (0,05%) e Gamma (11,95%). Neste solo, também houve dominância de bactérias pertencentes aos filios: Acidobacteria (5,19%), Bacteroidetes/Chlorobi (21,00%). O filo Proteobacteria compreendeu em 43,56% das seqüências amostradas no solo de Illinois, sendo composto pelas proporções das seguintes classes Alpha (11,70%), Beta (17,07%), Delta (7,08%) e Gamma (7,71%). Ao contrario do restante dos solos analisados, no solo de Illinois, não foram detectadas seqüências de bactérias pertencentes a classe Epsilonproteobacteria. Neste solo, também houve dominância de bactérias pertencentes aos filios: Acidobacteria (7,34%), Actinobacteria (8,70%), Bacteroidetes/Chlorobi (21,05%), Chlamidiae/Verrucomicrobia (5,20%) e Firmicutes (7,84%).

Em todos os solos amostrados foram detectadas seqüências de bactérias cuja filogenia não pode ser identificada (Figura 2), sendo que o solo coletado no Canadá apresentou a maior proporção de seqüências (5,49%) que não apresentaram similaridade com nenhum dos filios atualmente conhecidos.

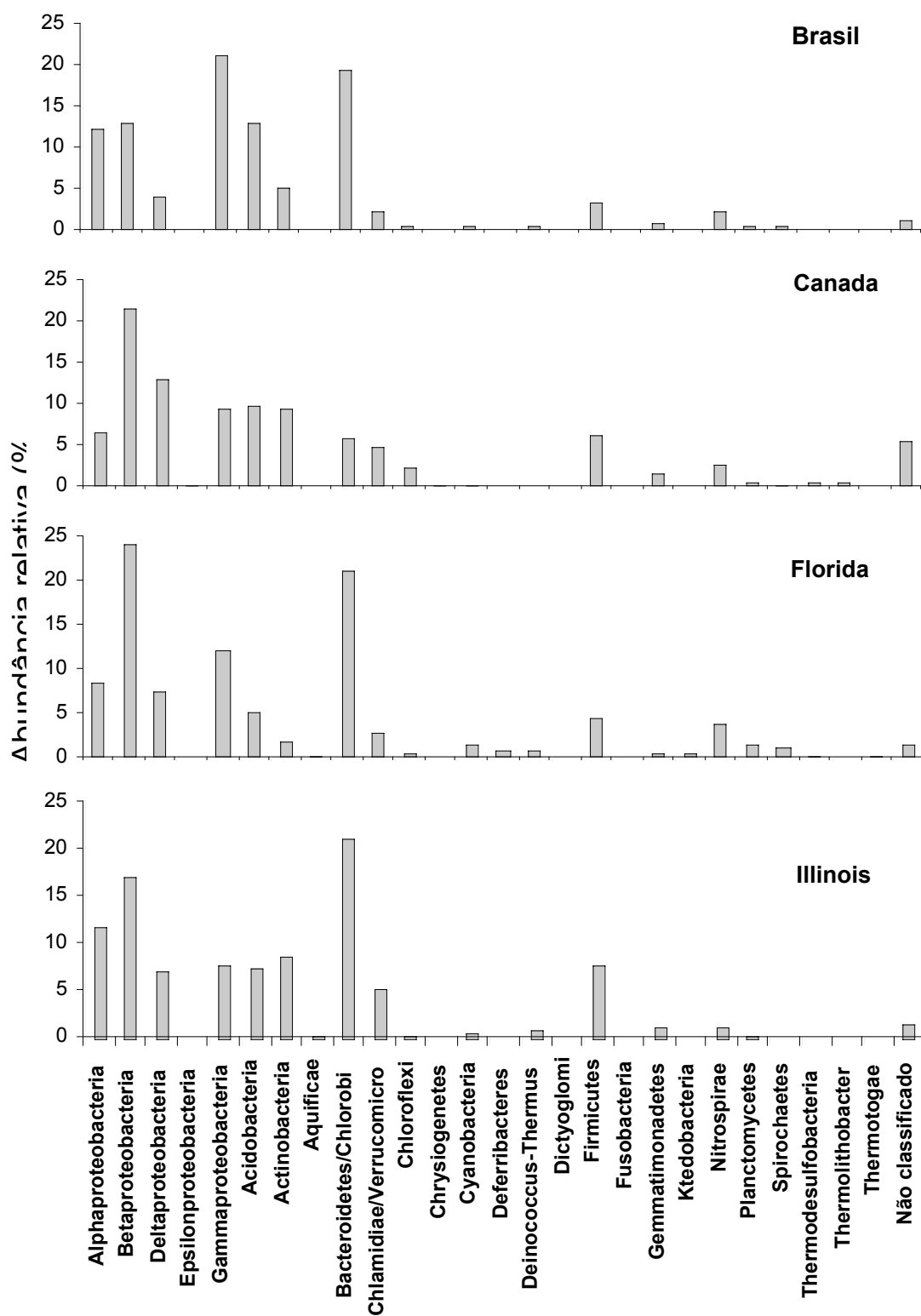


FIGURA 2. Abundância relativa dos filos bacterianos detectados em Latossolo Vermelho distrófico (cultivo de milho – Brasil), Argissolo Amarelo distrófico (floresta natural – Canadá), Organossolo Háplico (cultivo de cana-de-açúcar – Flórida) e Nitossolo Vermelho Eutrófico (cultivo de milho – Illinois).

6.4.3 Diversidade de bactérias diazotróficas cultiváveis presentes no solo

Embora a análise do gene ribossomal do 16S não seja o único critério para a determinação de espécies ou gêneros bacterianos, é possível a detecção e identificação de diversos organismos presentes no ambiente por meio de análises comparativas deste gene. Análises computacionais de seqüências de genes ribossomais têm mostrado que certos nucleotídeos são encontrados unicamente em determinados grupos de organismos (Madigan et al., 1997). Tais seqüências são conhecidas como “seqüências marcadoras” (signature sequences). Em muitos casos, um único nucleotídeo pode ser utilizado como uma seqüência marcadora. Um exemplo é a presença de uma adenina na posição 657 no gene ribossomal do 16S de todas as espécies do domínio Bacteria ao passo que esta base nitrogenada nunca foi detectada na mesma posição em espécies pertencentes ao domínio Archaea e é encontrada apenas raramente (2% dos organismos analisados) em espécies do domínio Eukarya (Madigan et al., 1997).

Não existem seqüências marcadoras para a identificação de bactérias diazotróficas com base na análise do gene do 16S. Neste caso a identificação dos organismos diazotróficos pode ser feita pela comparação simples das seqüências obtidas com as seqüências de organismos diazotróficos conhecidos. Esta análise pode ser usada como indicativo para comparação de organismos diazotróficos cultiváveis presentes em cada um dos solos amostrados e para o estabelecimento de relações entre eles. Entretanto, a diversidade detectada será limitada a identificação de organismos fixadores de nitrogênio conhecidos já que tal metodologia não permite a identificação de bactérias diazotróficas não cultiváveis.

Os gêneros bacterianos cultiváveis, que apresentam espécies fixadoras de nitrogênio e que foram detectados pela metodologia proposta são apresentados na Tabela 4. No solo coletado em uma lavoura de milho no Brasil foram detectados 57 gêneros fixadores de nitrogênio ao passo que no solo de floresta natural coletado no Canadá foram detectados 62 gêneros bacterianos que contém espécies fixadoras de nitrogênio. Nos solos coletados nos Estados da Flórida, cultivado com lavoura de cana-de-açúcar, e de Illinois, cultivado com lavoura de milho, foram detectados 64 e 62 gêneros respectivamente.

TABELA 4. Diversidade de gêneros bacterianos cultiváveis fixadores de nitrogênio detectados pela análise do gene ribossomal do 16S amplificado a partir do DNA microbiano extraído dos solos do Brasil, Canadá, Florida e Illinois.

| Brasil | S' | Canadá | S | Florida | S | Illinois | S |
|--------------------------|-----------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|
| <i>Acetobacter</i> | 27 | <i>Acetobacter</i> | 47 | <i>Acetobacter</i> | 5 | <i>Acetobacter</i> | 8 |
| <i>Agrobacterium</i> | 2 | <i>Agrobacterium</i> | 3 | <i>Agrobacterium</i> | 2 | <i>Alcaligenes</i> | 83 |
| <i>Alcaligenes</i> | 103 | <i>Alcaligenes</i> | 69 | <i>Alcaligenes</i> | 76 | <i>Azoarcus</i> | 18 |
| <i>Azoarcus</i> | 30 | <i>Anabaena</i> | 1 | <i>Arcobacter</i> | 2 | <i>Azorhizobium</i> | 1 |
| <i>Azospirillum</i> | 70 | <i>Arcobacter</i> | 3 | <i>Azoarcus</i> | 40 | <i>Azospirillum</i> | 74 |
| <i>Bacillus</i> | 108 | <i>Azoarcus</i> | 11 | <i>Azospirillum</i> | 23 | <i>Bacillus</i> | 394 |
| <i>Beijerinckia</i> | 1 | <i>Azorhizobium</i> | 1 | <i>Bacillus</i> | 33 | <i>Beijerinckia</i> | 3 |
| <i>Bradyrhizobium</i> | 606 | <i>Azospirillum</i> | 201 | <i>Bradyrhizobium</i> | 213 | <i>Bradyrhizobium</i> | 195 |
| <i>Burkholderia</i> | 109 | <i>Bacillus</i> | 100 | <i>Burkholderia</i> | 156 | <i>Burkholderia</i> | 75 |
| <i>Chlorobium</i> | 1 | <i>Beijerinckia</i> | 4 | <i>Chlorobium</i> | 2 | <i>Chloroflexus</i> | 3 |
| <i>Chloroflexus</i> | 4 | <i>Bradyrhizobium</i> | 1314 | <i>Clostridium</i> | 22 | <i>Clostridium</i> | 10 |
| <i>Clostridium</i> | 16 | <i>Burkholderia</i> | 334 | <i>Cyanothece</i> | 2 | <i>Cyanothece</i> | 2 |
| <i>Cyanothece</i> | 3 | <i>Chlorobium</i> | 3 | <i>Dechloromonas</i> | 1 | <i>Dechloromonas</i> | 1 |
| <i>Dechloromonas</i> | 3 | <i>Clostridium</i> | 41 | <i>Delftia</i> | 1 | <i>Desulfomicrobium</i> | 1 |
| <i>Desulfobacterium</i> | 1 | <i>Cyanothece</i> | 2 | <i>Desulfobacter</i> | 1 | <i>Desulfomonile</i> | 2 |
| <i>Desulfomicrobium</i> | 4 | <i>Dechloromonas</i> | 3 | <i>Desulfomonile</i> | 16 | <i>Desulfonema</i> | 1 |
| <i>Desulfomonile</i> | 2 | <i>Desulfomicrobium</i> | 8 | <i>Desulfonema</i> | 9 | <i>Desulfosporosinus</i> | 2 |
| <i>Desulfotomaculum</i> | 5 | <i>Desulfomonile</i> | 16 | <i>Desulfosporosinus</i> | 3 | <i>Desulfotomaculum</i> | 63 |
| <i>Desulfovibrio</i> | 1 | <i>Desulfonema</i> | 1 | <i>Desulfotomaculum</i> | 15 | <i>Desulfovibrio</i> | 18 |
| <i>Devosia</i> | 36 | <i>Desulfotomaculum</i> | 16 | <i>Desulfovibrio</i> | 13 | <i>Devosia</i> | 23 |
| <i>Ensifer</i> | 3 | <i>Desulfovibrio</i> | 13 | <i>Devosia</i> | 25 | <i>Ensifer</i> | 3 |
| <i>Enterobacter</i> | 1 | <i>Devosia</i> | 59 | <i>Ensifer</i> | 4 | <i>Enterobacter</i> | 2 |
| <i>Geobacter</i> | 22 | <i>Ensifer</i> | 2 | <i>Geobacter</i> | 36 | <i>Erwinia</i> | 2 |
| <i>Gluconacetobacter</i> | 4 | <i>Geobacter</i> | 170 | <i>Gluconacetobacter</i> | 1 | <i>Geobacter</i> | 3 |
| <i>Herbaspirillum</i> | 42 | <i>Gluconacetobacter</i> | 29 | <i>Halomonas</i> | 4 | <i>Gluconacetobacter</i> | 3 |
| <i>Leptospirillum</i> | 6 | <i>Hellobacterium</i> | 1 | <i>Herbaspirillum</i> | 59 | <i>Halomonas</i> | 1 |
| <i>Magnetospirillum</i> | 104 | <i>Herbaspirillum</i> | 66 | <i>Ideonella</i> | 2 | <i>Herbaspirillum</i> | 108 |
| <i>Mesorhizobium</i> | 44 | <i>Leptolyngbya</i> | 4 | <i>Leptospirillum</i> | 18 | <i>Leptospirillum</i> | 1 |
| <i>Methylobacterium</i> | 58 | <i>Leptospirillum</i> | 13 | <i>Magnetospirillum</i> | 100 | <i>Magnetospirillum</i> | 26 |
| <i>Methylocapsa</i> | 4 | <i>Magnetospirillum</i> | 52 | <i>Mesorhizobium</i> | 2 | <i>Mesorhizobium</i> | 25 |
| <i>Methylocella</i> | 2 | <i>Mesorhizobium</i> | 77 | <i>Methylobacter</i> | 2 | <i>Methylobacterium</i> | 121 |
| <i>Methylocystis</i> | 1 | <i>Methylobacterium</i> | 18 | <i>Methylobacterium</i> | 34 | <i>Methylocaldum</i> | 1 |
| <i>Methylosinus</i> | 15 | <i>Methylocapsa</i> | 5 | <i>Methylocaldum</i> | 53 | <i>Methylocella</i> | 11 |
| <i>Micrococcus</i> | 202 | <i>Methylocystis</i> | 2 | <i>Methylocella</i> | 3 | <i>Methylococcus</i> | 1 |
| <i>Nitrobacter</i> | 158 | <i>Methylosinus</i> | 4 | <i>Methylocystis</i> | 1 | <i>Methylocystis</i> | 1 |
| <i>Nitrosomonas</i> | 5 | <i>Microbacterium</i> | 485 | <i>Methylosinus</i> | 2 | <i>Nitrobacter</i> | 16 |
| <i>Nitrospira</i> | 62 | <i>Nitrobacter</i> | 619 | <i>Micrococcus</i> | 90 | <i>Nitrosomonas</i> | 5 |
| <i>Nitrospira</i> | 522 | <i>Nitrosomonas</i> | 9 | <i>Microcoleus</i> | 2 | <i>Nitrospira</i> | 27 |
| <i>Novosphingobium</i> | 156 | <i>Nitrospira</i> | 19 | <i>Nitrobacter</i> | 10 | <i>Nitrospira</i> | 350 |
| <i>Ochrobactrum</i> | 1 | <i>Nitrospira</i> | 164 | <i>Nitrosomonas</i> | 88 | <i>Novosphingobium</i> | 310 |
| <i>Oscillatoria</i> | 3 | <i>Nostoc</i> | 1 | <i>Nitrospira</i> | 10 | <i>Ochrobactrum</i> | 5 |
| <i>Paenibacillus</i> | 63 | <i>Novosphingobium</i> | 88 | <i>Nitrospira</i> | 782 | <i>Oscillatoria</i> | 4 |
| <i>Phaeospirillum</i> | 3 | <i>Ochrobactrum</i> | 8 | <i>Nostoc</i> | 2 | <i>Paenibacillus</i> | 137 |
| <i>Phyllobacterium</i> | 3 | <i>Oscillatoria</i> | 2 | <i>Novosphingobium</i> | 22 | <i>Pantoea</i> | 1 |

| | | | | | | | |
|-------------------------------|------|-------------------------|------|-------------------------|------|-------------------------|------|
| <i>Pseudomonas</i> | 251 | <i>Paenibacillus</i> | 54 | <i>Ochrobactrum</i> | 43 | <i>Phaeospirillum</i> | 1 |
| Continuação (Tabela 4) | | | | | | | |
| <i>Ralstonia</i> | 9 | <i>Phaeospirillum</i> | 4 | <i>Oscillatoria</i> | 13 | <i>Phyllobacterium</i> | 6 |
| <i>Rhizobium</i> | 95 | <i>Phyllobacterium</i> | 3 | <i>Paenibacillus</i> | 24 | <i>Pseudomonas</i> | 144 |
| <i>Rhodobacter</i> | 13 | <i>Pseudomonas</i> | 104 | <i>Pantoea</i> | 1 | <i>Ralstonia</i> | 2 |
| <i>Rhodoferax</i> | 4 | <i>Ralstonia</i> | 1 | <i>Phaeospirillum</i> | 1 | <i>Rhizobium</i> | 135 |
| <i>Rhodopseudomonas</i> | 7 | <i>Rhizobium</i> | 59 | <i>Pseudomonas</i> | 644 | <i>Rhodobacter</i> | 5 |
| <i>Rhodospirillum</i> | 18 | <i>Rhodobacter</i> | 31 | <i>Ralstonia</i> | 5 | <i>Rhodoferax</i> | 8 |
| <i>Sinorhizobium</i> | 6 | <i>Rhodoferax</i> | 19 | <i>Rhizobium</i> | 15 | <i>Rhodopseudomonas</i> | 2 |
| <i>Sphingomonas</i> | 471 | <i>Rhodopseudomonas</i> | 13 | <i>Rhodobacter</i> | 22 | <i>Rhodospirillum</i> | 22 |
| <i>Spirochaeta</i> | 69 | <i>Rhodospirillum</i> | 48 | <i>Rhodoferax</i> | 8 | <i>Rhodovulum</i> | 1 |
| <i>Thiobacillus</i> | 8 | <i>Sinorhizobium</i> | 5 | <i>Rhodopseudomonas</i> | 6 | <i>Serratia</i> | 2 |
| <i>Treponema</i> | 18 | <i>Sphingomonas</i> | 33 | <i>Rhodospirillum</i> | 46 | <i>Sinorhizobium</i> | 8 |
| <i>Xanthobacter</i> | 13 | <i>Spirochaeta</i> | 23 | <i>Sinorhizobium</i> | 14 | <i>Sphingomonas</i> | 940 |
| | | <i>Sulfitobacter</i> | 1 | <i>Sphingomonas</i> | 178 | <i>Spirochaeta</i> | 6 |
| | | <i>Thiobacillus</i> | 8 | <i>Spirochaeta</i> | 8 | <i>Thiobacillus</i> | 24 |
| | | <i>Treponema</i> | 176 | <i>Thermochromatium</i> | 1 | <i>Treponema</i> | 18 |
| | | <i>Xanthobacter</i> | 40 | <i>Thiobacillus</i> | 10 | <i>Xanthobacter</i> | 13 |
| | | <i>Zoogloea</i> | 2 | <i>Treponema</i> | 13 | <i>Zoogloea</i> | 4 |
| | | | | <i>Xanthobacter</i> | 10 | | |
| | | | | <i>Zoogloea</i> | 7 | | |
| Total | 3598 | | 4712 | | 3056 | | 3482 |
| $H^2 = 2,920$ | | $H = 2,780$ | | $H = 2,762$ | | $H = 2,715$ | |
| $E^3 = 0,722$ | | $E = 0,673$ | | $E = 0,664$ | | $E = 0,657$ | |

¹S = Número de seqüências; ²H = índice de Shannon-Weaver; ³E = Equitabilidade

A diversidade estimada pelo índice de Shannon-Weaver (H) foi similar em todas as amostras sendo que a maior diversidade de bactérias diazotróficas foi detectada no solo do Brasil (2,920) e a menor diversidade foi detectada no solo de Illinois (2,715). Embora a diversidade tenha sido similar entre as comunidades, pode-se observar que certos gêneros bacterianos foram encontrados apenas em um tipo de solo. O gênero *Desulfitobacterium* foi encontrado unicamente no solo de lavoura de milho do Brasil. Os gêneros *Anabaena*, *Heliobacterium*, *Leptolyngbya* e *Microbacterium* foram detectados unicamente no solo do Canadá. Já, os gêneros *Delftia*, *Desulfobacter*, *Ideonella*, *Methylobacter*, *Microcoleus* e *Thermochromatium* foram detectados unicamente no solo coletado no Estado da Florida. Finalmente, os gêneros *Erwinia*, *Methylococcus*, *Rhodovulum* e *Serratia* foram detectados apenas no solo de lavoura de milho cultivado no Estado de Illinois – Estados Unidos. Por outro lado, 45 gêneros bacterianos foram detectados em todos os solos independentemente da região geográfica do solo amostrado ou do tipo de

cultivo ao qual o solo era submetido. Os gêneros encontrados foram os seguintes: *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Cyanothece*, *Dechloromonas*, *Desulfomonile*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Devosia*, *Ensifer*, *Geobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Leptospirillum*, *Magnetospirillum*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Methylocystis*, *Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrospira*, *Novosphingobium*, *Ochrobactrum*, *Oscillatoria*, *Paenibacillus*, *Phaeospirillum*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Rhodoferax*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Sinorhizobium*, *Sphingomonas*, *Spirochaeta*, *Thiobacillus*, *Treponema* e *Xanthobacter*.

Com relação ao índice de Equitabilidade, que serve para avaliar a presença de espécies dominantes, verificou-se que os valores calculados para este índice variaram de 0,657 (Illinois) e 0,722 (Brasil). Com base nestes valores é possível concluir que havia gêneros bacterianos dominantes em todas as comunidades microbianas amostradas. Para o solo coletado no Brasil, os gêneros dominantes foram *Pseudomonas* (7%), *Sphingomonas* (13%), *Nitrospira* (14%) e *Bradyrhizobium* (17%). No solo de floresta natural coletado no Canadá os gêneros diazotróficos dominantes foram *Burkholderia* (7%), *Microbacterium* (10%), *Nitrobacter* (13%) e *Bradyrhizobium* (28%). No solo de lavoura de cana-de-açúcar da Florida os gêneros dominantes foram *Bradyrhizobium* (7%), *Pseudomonas* (21%) e *Nitrospira* (26%). E no solo cultivado com lavoura de milho em Illinois os gêneros dominantes foram *Novosphingobium* (9%), *Nitrospira* (10%), *Bacillus* (11%) e *Sphingomonas* (27%).

6.5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados, conclui-se que a adaptação da técnica do seqüenciamento genômico para estimar a diversidade bacteriana dos solos baseado em piroseqüenciamento, permitiu avaliar a diversidade do solo na sua totalidade. A totalidade da biodiversidade microbiana do solo foi atingida quando foram obtidas 26.140 e 53.632 seqüências e este número foi dependente do tipo de solo amostrado. Utilizando-se o critério de 100% de similaridade entre seqüências para a definição de espécie, foi observado que o número máximo de espécies encontradas foi de 6.543 por grama de solo, sendo este valor muito menor do que supunha a literatura. A maior diversidade de espécies foi observada em um solo de floresta natural do Canadá que não teve influência antrópica, verificando-se dominância generalizada em todos os solos de bactérias pertencentes ao filo Proteobactéria. Com relação a detecção de bactérias diazotróficas nas amostras de solo, verificou-se a presença de 57 a 62 gêneros bacterianos cultiváveis fixadores de nitrogênio. Embora a diversidade das bactérias diazotróficas tenha sido elevada nas amostras de solo, houve a presença de gêneros dominantes nas comunidades avaliadas.

6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology**: Fundamentals and applications. 4th ed. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1998. 694p.

CHAO, A.; BUNGE, J. Estimating the number of species in a Stochastic abundance model. **Biometrics**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 531–539, 2002.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n. 3, p. 252 – 263, 2001.

CLAYTON, M.K.; FREES E. W. Nonparametric estimation of the probability of discovering a new species. **Journal of the American Statistical Association**, Alexandria, v.82, n. 379, p. 305-311, 1987.

CURTIS, T.; SLOAN, T. Exploring microbial diversity – A vast below. **Science**, Washington, v. 309, n. 5739, p. 1331 - 1333, 2005.

CURTIS, T. Microbial ecologists: it's time to “go large”. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 4, n. 7, p. 488-488, 2006.

DESANTIS, T.Z. et al. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 34, p. 394 – 399, 2006.

EDGAR, R. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 1792 – 1797, 2004.

FALSENSTEN, J. PHYLIP-Phylogeny inference package (version 3.2). **Cladistics**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 164 – 166, 1989.

GANS, J. et al. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, Washington, v. 309, n. 5739, p.1387-1390, 2005.

HONG, S. et al. Predicting microbial species richness. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.103, n. 1, p.117-122, 2006.

HUGHES, J.B. et al. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 10, p. 4399 – 4406, 2001.

LANE, D J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrand, E.; Goodfellow, M. (ed). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons, 1991.

MADIGAN, M.T. et al. **Brock biology of microorganisms**. 8th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. 986p.

MARGULIES, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, Londres, v.437 n.7057, p. 376-380, 2005.

MULLINS, T. D. et al. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 40, n. 1, p. 148 – 158, 1995.

PACE, N. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Washington, v. 274, n. 5313, p. 734 – 740, 1997.

RAPPÉ, M.; GIOVANNONI, S. The uncultured microbial majority. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, n. 1, p. 369 – 394, 2003.

ROSSELLO-MORA, R. Opinion: the species problem, can we achieve a universal concept? **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 26, n. 3, p. 323–326, 2003.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Status of the Microbial Census. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 68, n. 4, p. 686–691, 2004.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1501-1506, 2005.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Toward a census of bacteria in soil. **PLOS Computational Biology**, Stanford, v.2, n.7, p. 786-793, 2006.

SOGIN, M.L. et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 32, p. 12115 – 12120, 2006.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systemic Bacteriology**, Berks, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

TORSVIK, V. et al. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 3, p. 782-787, 1990.

WARD, D. M. A natural species concept for prokaryotes. **Current Opinion in Microbiology**, Londres v.1, n. 3, p. 271–277, 1998.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Para o avanço no diagnóstico da diversidade das bactérias diazotróficas associadas ao solo rizosférico, raízes e colmo de milho bem como para a detecção da diversidade microbiana total do solo, o uso de técnicas de biologia molecular foi significativo. Embora tais técnicas já tivessem sido utilizadas para estudar a diversidade microbiana, este estudo diferenciou-se dos demais devido ao aumento expressivo no número de amostras dos genes utilizados como marcadores para que fosse atingida a meta proposta pelo mesmo a qual foi a detecção da “real” diversidade microbiana. Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que influências geográficas e ambientais podem gerar a associação de diferentes bactérias diazotróficas endofíticas com plantas de milho e que o solo da rizosfera apresentou maior diversidade de bactérias diazotróficas em relação às raízes e ao colmo do milho. Para a avaliação do potencial dos microrganismos diazotróficos em promover o crescimento das plantas foram realizados o isolamento e a seleção de bactérias sob condições controladas. Os isolados bacterianos obtidos demonstraram possuir potencial para aumentar a produtividade das plantas e podem ser considerados como promissores para inoculação em plantas nas condições edafoclimáticas do Estado do Rio Grande do Sul. Finalmente foi feita a avaliação da diversidade bacteriana do solo na sua totalidade. Para tanto, foi utilizada uma técnica de seqüenciamento genômico baseado em piroseqüenciamento. Esta técnica permitiu a avaliação da biodiversidade bacteriana do solo na sua totalidade, confirmado pela análise de suficiência amostral, curvas de extinção (rarefação) e por indicadores paramétricos e não paramétricos de diversidade. Utilizando-se o critério de 100% de similaridade entre seqüências para a definição de espécie, foi observado que o número máximo de espécies encontradas foi de 6.543 por grama de solo, sendo este

valor muito menor do que supunha a literatura. Com relação a detecção das bactérias diazotróficas do solo que foi baseada no seqüenciamento do gene ribossomal do 16S, verificou-se a presença de 57 a 62 gêneros bacterianos cultiváveis fixadores de nitrogênio. Embora a diversidade das bactérias diazotróficas tenha sido elevada nas amostras de solo, houve a presença de gêneros dominantes em todas as comunidades avaliadas.