

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

Diversidade de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas à cultura de canola (*Brassica napus* L.) cultivada no município de Vacaria, Rio Grande do Sul.

Roberto Farina

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Maria Pereira Passaglia

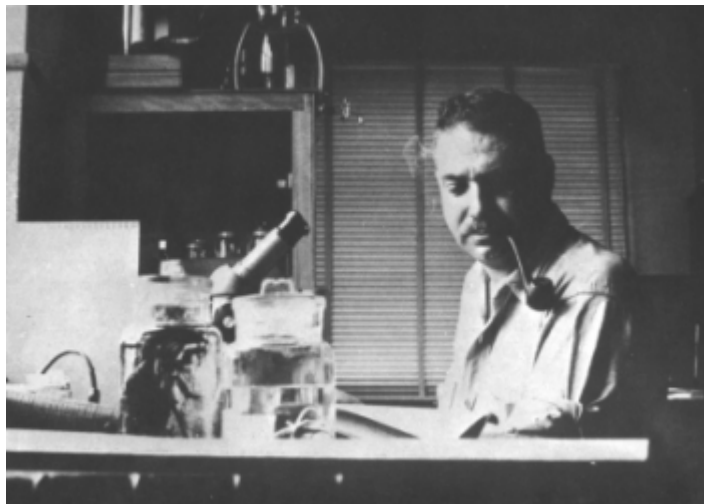
Co-orientador: Dr. Luciano Kayser Vargas

Porto Alegre, março de 2012

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Genética Molecular Vegetal do Departamento de Genética desta Universidade. O projeto foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **Volta Por Cima**

Chorei, não procurei esconder  
Todos viram, fingiram  
Pena de mim, não precisava  
Ali onde eu chorei  
Qualquer um chorava  
Dar a volta por cima que eu dei  
Quero ver quem dava  
Um homem de moral não fica no chão  
Nem quer que mulher  
Venha lhe dar a mão  
Reconhece a queda e não desanima  
Levanta, sacode a poeira  
E dá a volta por cima



**Paulo Emílio Vanzolini, zoólogo e compositor brasileiro.**

**Aos meus pais,  
Ervino e Onilce,**

*pelo amor incondicional, dedicação,  
exemplos de vida e por  
estarem sempre ao meu lado.*

**À Jamilla Alves  
Trindade Sampaio,**

*pelo amor de tantos anos, carinho,  
dedicação, amizade e compreensão*

**DEDICO**

## **Agradecimentos**

- À Dra. Luciane Passaglia pela orientação, paciência, apoio, estímulo, amizade e, principalmente, pelo privilégio de fazer parte de sua equipe de pesquisa.
- Ao Dr. Luciano Kayser Vargas, pela amizade, apoio durante o desenvolvimento do trabalho e pelas inúmeras vezes que me fez rir e, ao mesmo tempo, ser mais crítico com seus geniosos cartuns.
- Aos professores do Laboratório de Genética Molecular Vegetal.
- Aos Drs. Volker Wendisch e Jung-Won Youn, atualmente na Universidade de Bielefeld, Alemanha, pela colaboração com os experimentos do microarranjo.
- Ao MSc. Bruno Brito Lisboa, por toda ajuda nos experimentos *in vivo*, pelas muitas cuias de chimarrão e pela amizade.
- A todos os colegas do Núcleo de Microbiologia Agrícola do Departamento de Genética, em especial às Doutoradas Anelise Beneduzi da Silveira e Samanta Campos, pelos muitos auxílios durante o desenvolvimento do trabalho.
- A todos os colegas que passaram pelo Laboratório de Genética Molecular Vegetal durante minha longa permanência no mesmo, em especial ao Alexandro Cagliari, João Frederico Mangrich dos Passos, Júlio Cezar Lima, Lauro Bucker Neto, Rafael Augusto Arenhart, Rafael de Oliveira, René Soares e Ronei Machado.
- Às professoras Carmen Romero Saavedra e Lavínia Schuler-Faccini pelo auxílio no estágio docente em decorrência da bolsa do Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI)/CAPES.
- Ao Elmo Cardoso pela eficiência e por estar sempre pronto a nos auxiliar com a parte burocrática.
- Aos membros da banca examinadora, Dras. Zaida Inês Antonioli, Irene Silveira Schrank e Maria Hekena B. Zanettini por terem aceitado a tarefa de avaliar esse trabalho e à Dra. Loreta Freitas por ter sido a relatora do mesmo.
- CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro.

**MUITO OBRIGADO!**

## Sumário

Agradecimentos.....	5
Lista de Abreviaturas.....	8
Resumo.....	11
Abstract.....	12
1 Introdução .....	13
1.1 Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal ( <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i> ou PGPR) .....	14
1.2 Benefícios diretos das PGPRs para as plantas .....	15
1.2.1 Fixação biológica do nitrogênio.....	15
1.2.2 Produção de sideróforos.....	17
1.2.3 Solubilização de fosfato.....	18
1.2.4 Produção de reguladores de crescimento vegetal.....	19
1.3 Diversidade das comunidades microbianas associadas às raízes.....	21
1.4 Microarranjos de DNA.....	23
1.4.1 Arranjos Gênicos Funcionais (FGA).....	26
1.4.2 Arranjos de Comunidades Genômicas (CGA).....	28
1.4.3 Arranjos de Oligonucleotídeos para Filogenia (POA).....	29
1.4.4 Cuidados na confecção e na aplicação do microarranjo.....	30
1.4.4.1 Projeção das sondas.....	30
1.4.4.2 Outros pontos a serem abordados.....	31
1.4.5 Microarranjos e o sequenciamento de última geração.....	33
1.4.6 Microarranjos utilizando o gene <i>nifH</i> .....	34
1.5 Canola.....	38
2 Objetivos.....	41
3 Estruturação da tese.....	42
3.1 Parte I <i>Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth</i> (Artigo publicado na revista <i>Applied Soil Ecology</i> ).....	43
3.2 Parte II Avaliação da comunidade bacteriana associada ao solo rizosférico e raízes de canola através de análises de microarranjos.....	53
3.2.1 Metodologia empregada.....	54
3.2.1.1 Escolha das sequências de oligonucleotídeos para o microarranjo.....	54

3.2.1.2 Extração de DNA de culturas puras, amplificação do gene 16S rRNA e extração de DNA de bactérias endofíticas de raízes de canola.....	54
3.2.1.3 Confeção do microarranjo.....	56
3.2.1.4 Marcação do DNA genômico.....	57
3.2.1.5 Hibridizações e Lavagens.....	58
3.2.1.6 Escaneamento e análise.....	59
3.2.2 Resultados e Discussão.....	60
3.2.2.1 Sequências utilizadas como sondas.....	60
3.2.2.2 O microarranjo.....	61
3.2.2.3 As hibridizações.....	62
3.2.2.4 Comparação entre métodos.....	70
4 Considerações finais.....	72
5 Referências bibliográficas.....	76
6 Anexos.....	88

## Lista de abreviaturas

ACC desaminase	1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase
AIA	Ácido indol-acético
ATP	Trifosfato de adenosina
BACs	Cromossomos Bacterianos Artificiais ( <i>Bacterial Artificial Chromosomes</i> )
BLAST	Ferramenta de Busca e Alinhamento Local Básica ( <i>Basic Local Alignment and Search Tool</i> )
C	Carbono
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CGA	Arranjos de Comunidades Genômicas ( <i>Community Genome Arrays</i> )
Cy3	Cianina-3
Cy5	Cianina-5
G + C	Guanina + Citosina
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante ( <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ePGPR	Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal extracelulares ( <i>Extracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i> )
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
Fe	Ferro
Fe <sup>3+</sup>	Íon férrico
FGA	Arranjo Gênico Funcional ( <i>Functional Gene Array</i> )
FISH	Hibridização <i>in situ</i> com Fluorescência ( <i>Fluorescence in situ Hybridization</i> )
GPMs	Microarranjos de Sondagem Genômica ( <i>Genome-Probing Microarrays</i> )
iPGPR	Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal intracelulares ( <i>intracellular Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i> )
LACs	Bactérias de Ácido Lático ( <i>Lactic Acid Bacteria</i> )
M	mol



MDA	Amplificação por Deslocamento Múltiplo ( <i>Multiple Displacement Amplification</i> )
Mg	Micrograma
Mg <sup>2+</sup>	Íon magnésio
ml	Mililitros
mM	Micromolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
N	Nitrogênio
N <sub>2</sub>	Nitrogênio atmosférico
ng	Nanogramas
nm	Nanômetro
NGS	Sequenciamento de Última Geração ( <i>Next-Generation Sequencing</i> )
P	Fósforo
pb	Par de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PGPR	Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal ( <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria</i> )
pH	Potencial Hidrogeniônico
POA	Arranjos de Oligonucleotídeos para Filogenia ( <i>Phylogenetic Oligonucleotide Arrays</i> )
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
RSGP	Sondagem Genômica por Amostragem Reversa ( <i>Reverse Sample Genome Probing</i> )
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa ( <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> )
S	Enxofre
T-RFLP	Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição Terminal ( <i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
UV	Ultravioleta

V	Volt
WCGA	Amplificação da Comunidade Genômica Total ( <i>Whole-Community Genome Amplification</i> )
YIB	Bactérias que Aumentam o Rendimento ( <i>Yield Increasing Bacteria</i> )
μL	Microlitro

## Resumo

Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPR) podem estimular o crescimento da planta hospedeira através da produção de determinadas substâncias, supressão de organismos deletérios, disponibilidade e captura de nutrientes minerais, entre outras atividades. Essas bactérias têm sido objeto de estudos devido aos efeitos produzidos em importantes culturas comerciais. A canola é uma opção de planta para cobertura de solo, para rotação de culturas e para produção de óleo, tanto comestível quanto biodiesel. No entanto, estudos sobre a diversidade de micro-organismos associados com culturas de canola e seu potencial para promover o crescimento das plantas são escassos. Dois estudos foram conduzidos nesse trabalho com os seguintes objetivos: i) isolar e identificar bactérias cultiváveis associadas ao solo rizosférico e raízes de canola (*Brassica napus*) para verificar se possíveis mudanças nas comunidades microbianas estão associadas com os diferentes estágios de rotação de culturas e com as diferentes fases do crescimento da planta; ii) avaliar as habilidades de promoção de crescimento vegetal dos isolados bacterianos; iii) utilizar isolados selecionados em experimentos *in vivo* em casa de vegetação; iv) desenvolver um microarranjo para identificação de bactérias diazotróficas cultiváveis e conhecidas de diferentes ambientes. Os resultados obtidos pelo isolamento tradicional indicaram a presença de diferentes populações de PGPRs no solo rizosférico e no interior das raízes de canola nos diferentes estágios de rotação de cultura. Além disso, a estrutura da comunidade microbiana foi influenciada pela variação sazonal, como indicado pelos diferentes gêneros identificados nos diferentes estágios de desenvolvimento da planta, havendo, também, uma correlação positiva entre a diversidade bacteriana e a quantidade de precipitação mensal. *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* foram os gêneros bacterianos predominantes entre todos os identificados. Muitas das bactérias isoladas foram capazes de produzir compostos indólicos e sideróforos, solubilizar fosfato e algumas também foram capazes de fixar nitrogênio. Alguns dos isolados promoveram o crescimento da planta em casa de vegetação. Com relação ao microarranjo para identificação de bactérias diazotróficas cultiváveis e conhecidas de diferentes ambientes, apesar de terem sido realizados apenas testes preliminares, acredita-se que o microarranjo apresente um bom potencial para atingir o seu objetivo. Esse facilitará a busca por bactérias com propriedades de promoção de crescimento vegetal para a produção de um inoculante para as culturas de canola do sul do Brasil.

## Abstract

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) can stimulate host plant growth through the production of plant-growth substances, suppression of deleterious organisms, availability and uptake of mineral nutrients and other activities. These bacteria have been the object of studies due to the effects produced in commercially important crops. Canola is an option for ground cover plant for crop rotation and the production of oil both as food and biodiesel. However, studies on the diversity of such microorganisms associated with canola crops and their potential to promote plant growth are scarce. Two studies were conducted in this work with the following objectives: i) isolate and identify culturable bacteria associated with rhizospheric soil and roots of canola (*Brassica napus*) to verify if possible changes in microbial communities were associated with different stages of crop rotation and the different stages of canola growth; ii) evaluate the PGP abilities of bacterial isolates iii) test some of the isolates for *in vivo* experiments in a greenhouse, iv) develop a microarray for identification of culturable diazotrophs in different environments. The results obtained by traditional isolation indicated the presence of a diverse population of PGPR in the rhizospheric soil and inside the roots of canola at different stages of crop rotation. Moreover, the microbial community structure was influenced by seasonal variation, as indicated by the different genera identified at different stages of canola development. There was also a relationship between bacterial diversity and monthly rainfall. *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, and *Pseudomonas* were the prominent bacterial genera among all identified. Several of the isolated bacteria could produce indolic compounds and siderophores, to solubilize phosphate and some could also fix nitrogen. Some of the isolates were able to promote plant growth. Regarding the microarray, although only preliminary tests were performed, it was possible to show that the microarray has a good potential to achieve its goal. It will make easy the search for bacteria with properties of plant growth promotion for the production of an inoculant for canola cultivated in southern Brazil.

## **1 Introdução**

### **1.1 Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (*Plant Growth Promotion Rhizobacteria* ou PGPR)**

A rizosfera pode ser definida como o solo influenciado especificamente pelas raízes das plantas e/ou em associação com raízes, pêlos e material produzido pela planta. Este espaço inclui o solo ligado às raízes vegetais e, frequentemente, se estende uns poucos milímetros da superfície da raiz. Os exsudatos de plantas na rizosfera, tais como aminoácidos e açúcares, provêm uma rica fonte de energia e nutrientes para as bactérias, resultando em uma maior população bacteriana nesta área do que fora da mesma (Gray e Smith, 2005). De fato, a concentração de bactérias (por grama de solo) que é encontrada em volta das raízes (i.e., na rizosfera) é geralmente muito maior do que a densidade bacteriana, ou concentração, que é encontrada em outras porções do solo (Glick, 1995). No entanto, embora haja um grande número de bactérias na rizosfera, somente 7-15% da superfície total da raiz é ocupada por células microbianas (Gray e Smith, 2005).

A interação entre bactérias e as raízes das plantas pode ser benéfica, nociva, ou neutra para a planta e, às vezes, o efeito de uma bactéria em particular pode variar como consequência das condições do solo (Lynch, 1990). Assim, por exemplo, é pouco provável que um organismo em particular, que facilite o crescimento vegetal por fixar nitrogênio, irá beneficiar a planta caso nitrogênio fixado exógeno seja adicionado ao solo (Glick, 1995).

As bactérias que beneficiam as plantas são de dois tipos gerais. Existem as que estabelecem uma relação simbiótica com a planta hospedeira e aquelas que vivem livremente no solo, mas que frequentemente são encontradas perto ou até mesmo dentro das raízes das plantas. Os simbioses, especialmente rizóbios, têm sido extensivamente estudados e desenvolvidos como alternativa para aumentar a produção das lavouras. As bactérias benéficas de vida livre no solo são geralmente chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, ou, como definido por um grupo de pesquisadores da China, bactérias que aumentam a produção (*Yield Increasing Bacteria* ou YIB) (Piao et al., 1992). Porém, para Gray e Smith (2005), PGPRs também incluem os rizóbios, devido à bem caracterizada simbiose legume-rizóbio. Independentemente dos mecanismos de promoção do crescimento vegetal, as PGPRs têm que colonizar a rizosfera em volta das raízes, o rizoplane (superfície da raiz) ou a raiz (dentro dos tecidos radiculares). Entre as rizobactérias há um gradiente de proximidade da raiz e

intimidade: (i) bactérias vivendo no solo perto das raízes, utilizando metabólitos excretados pela raiz como fontes de C e N, (ii) bactérias colonizando o rizoplane (superfície radicular), (iii) bactérias residindo no tecido radicular, habitando os espaços entre células corticais, (iv) bactérias vivendo dentro das células em estruturas radiculares especializadas, ou nódulos. Nessa última categoria encontram-se dois grupos: os rizóbios associados com legumes e espécies de *Frankia* associadas às plantas lenhosas. Cianobactérias simbiotes fixadoras de nitrogênio das cicadáceas são, também, consideradas PGPRs (Gray e Smith, 2005). Ainda, uma variedade de bactérias diferentes pode ser considerada PGPR, incluindo espécies de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* e bacilos (Brown, 1974; Elmerich, 1984; Kloepper et al., 1988; 1989; Bashan e Levanony, 1990; Okon e Labandera-González, 1994; Tang, 1994).

Gray e Smith (2005) também adotaram duas divisões de PGPRs: PGPRs intracelulares – iPGPR, que englobam as bactérias que residem dentro das células vegetais, produzem nódulos e estão localizadas dentro dessas estruturas especializadas; e PGPRs extracelulares – ePGPR, bactérias que vivem fora das células vegetais e não produzem nódulos, mas acentuam o crescimento da planta, através da produção de compostos sinalizadores que estimulam diretamente o crescimento vegetal, aumentam a resistência das plantas ou melhoram a mobilização dos nutrientes do solo. A categoria ePGPR pode ser subdividida em três tipos, baseados no grau de associação com as raízes das plantas: bactérias que vivem perto, mas não em contato com as raízes; bactérias que colonizam a superfície radicular e bactérias que vivem nos espaços entre as células do córtex radicular.

A promoção do crescimento vegetal pode ocorrer direta ou indiretamente (Glick, 1995). Há várias maneiras pelas quais bactérias promotoras de crescimento vegetal podem afetar diretamente o crescimento da planta: através da fixação de nitrogênio atmosférico, da solubilização de minerais, tais como fósforo, produção de sideróforos (moléculas que solubilizam e sequestram ferro), ou pela produção de reguladores de crescimento vegetal (hormônios), que acentuam o crescimento vegetal em vários estágios de desenvolvimento. A promoção indireta de crescimento ocorre quando a PGPR diminui ou impede os efeitos deletérios de um ou mais organismos fitopatogênicos (Glick, 1995). A bactéria pode afetar o crescimento vegetal por um ou mais desses mecanismos, e também utilizar diferentes habilidades para promover o crescimento da planta em vários estágios durante o seu ciclo de vida (Glick et al., 1999).

## **1.2 Benefícios diretos das PGPRs para as plantas**

### **1.2.1 Fixação biológica do nitrogênio**

O nitrogênio é um dos principais constituintes das biomoléculas e, em sua forma molecular ( $N_2$ ), compõe quase 80% da atmosfera. Apesar de abundante, o nitrogênio do ar é quimicamente inerte e poucos são os organismos capazes de utilizá-lo. Determinadas bactérias utilizam como fonte de nitrogênio para o seu metabolismo o enorme reservatório gasoso da atmosfera e estas possuem a capacidade de catalisar a redução do nitrogênio molecular à amônia e incorporar esse nitrogênio em suas moléculas orgânicas (aminoácidos e proteínas), processo denominado de Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN, Newton, 2000).

A capacidade de fixar nitrogênio é determinada pelo complexo enzimático da nitrogenase e as bactérias que o possuem são chamadas de diazotróficas. Até o homem conseguir realizar a fixação do nitrogênio industrialmente, as bactérias diazotróficas eram responsáveis pela fixação de cerca de 90% do nitrogênio do planeta, enriquecendo os oceanos e os solos com formas de nitrogênio assimiláveis pelas algas e plantas e, desta forma, sustentando toda a biosfera. Com o aumento explosivo da população humana no último século o homem passou a interferir significativamente nesta equação, colocando fertilizantes nitrogenados nas lavouras para suprir a crescente demanda de alimentos (Newton, 2000).

O nitrogênio, por ser essencial, é frequentemente limitante na produção agrícola. Muitos são os processos que podem levar à perda desse importante elemento em agroecossistemas: desnitrificação, volatilização da amônia, queimadas (processos que retornam o nitrogênio à forma gasosa) e lixiviação de nitratos para as camadas profundas do solo. Para repor o nitrogênio perdido são usados fertilizantes nitrogenados ou a FBN (Neves e Rumjanek, 1998). No entanto, o uso extensivo de fertilizantes nitrogenados na agricultura representa um problema econômico, social, ambiental e de saúde pública. Grande parte dos fertilizantes nitrogenados adicionados ao solo é volatilizada, consumida por bactérias quimiolitotróficas (que voltam a reduzir o nitrato, liberando óxido nítrico e óxido nítrico na atmosfera) ou lixiviada, sendo levada pela água até o lençol freático. Contaminando o lençol freático, o excesso de nitrogênio pode chegar a rios e lagoas e causar a eutroficação destes ambientes (Lewis et al., 1984).

A produção de soja no Brasil é um exemplo da eficiência da FBN, pois, desde que foram realizados programas para o incremento da fixação de  $N_2$ , que resultaram no desenvolvimento de inoculantes com linhagens de *Bradyrhizobium*, requerendo poucas

aplicações de fertilizantes nitrogenados (Alves et al., 2004). Entretanto, nem todas as PGPRs são diazotróficas. Muitas fixam nitrogênio somente em quantidades limitadas, que, na maioria das vezes, não é suficiente para o seu próprio consumo, muito menos para os requerimentos de nitrogênio da planta hospedeira (Hong et al., 1991). Algumas PGPRs diazotróficas fornecem às suas plantas hospedeiras uma parte da quantidade do nitrogênio fixado que elas precisam; entretanto, o nitrogênio fixado é somente um componente menor do benefício geral para a planta (Chanway e Holl, 1991).

Os micro-organismos fixadores de nitrogênio são muito diversos, com representantes cultiváveis em todos os grupos filogenéticos de procariotes (Gram positivos, Gram negativos, Archaea e Cianobactérias). Os genes de fixação de nitrogênio não são distribuídos entre todos os representantes relacionados filogeneticamente, isto é, os genes de fixação de nitrogênio são encontrados em diversos grupos filogenéticos, mas gêneros fixadores e não fixadores podem estar em grupos fortemente relacionados (Affourtit et al., 2001).

Apesar da variedade de organismos capazes de fixar nitrogênio, o complexo da nitrogenase é muito similar na maioria destes. A nitrogenase é formada por duas proteínas sensíveis ao oxigênio. O componente I ou dinitrogenase é uma proteína ferro-molibdênio, formada por duas subunidades. O componente II ou dinitrogenase redutase é uma proteína ferro-enxofre, que transfere os elétrons para a dinitrogenase. Estas proteínas, juntamente com ATP,  $Mg^{+2}$  e uma fonte de elétrons são essenciais para a atividade de fixação de nitrogênio (Moat e Foster, 1995).

Um ambiente anaeróbio ou microaeróbico é exigido para a atividade da nitrogenase, devido à sensibilidade desta ao oxigênio. Assim, uma hidrogenase acoplada a uma rota bioquímica que consome oxigênio, ajuda a manter a anaerobiose do sistema. A fixação de nitrogênio é energeticamente muito dispendiosa e é inibida pela presença de nitrogênio fixado, principalmente amônia (Zehr et al., 2000).

A bactéria de vida livre *Klebsiella pneumoniae* foi o primeiro micro-organismo diazotrófico a ter os genes envolvidos na FBN identificados e caracterizados, inclusive o processo de FBN primeiramente estudado (Arnold et al., 1988). Nela, os genes de fixação do nitrogênio (*nif*, do inglês, *nitrogen fixation*), encontram-se agrupados em uma região cromossômica abrangendo 24.206 pares de base (Arnold et al., 1988), onde estão dispostos 20 genes, organizados em 8 operons: *nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVWZ*, *nifM*, *nifF*, *nifLA* e *nifBQ*.



Como mencionado anteriormente, o complexo da enzima nitrogenase é composto de duas proteínas conservadas: a proteína ferro-molibdênio, um tetrâmero composto de quatro subunidades codificadas pelos genes *nifD* e *nifK* e a ferro-proteína, um dímero com duas subunidades idênticas, codificadas pelo gene *nifH*. O gene da ferro-proteína, *nifH*, é um dos genes funcionais mais antigos da história da evolução e as relações entre as bactérias baseadas nas divergências de sequências deste gene tem estado de acordo com a filogenia inferida pelas sequências do gene do rRNA 16S. Esta característica do gene *nifH* tem possibilitado o estudo da diversidade dos genes de fixação de nitrogênio em bactérias de interesse, bem como a caracterização de tais genes em comunidades microbianas do solo (Rosado et al., 1998).

Sequências do gene *nifH* têm sido amplificadas e sequenciadas de um grande número de ambientes, incluindo raízes de arroz, solos, oceanos e invertebrados (Zani et al., 2000). A amplificação do *nifH* pode fornecer informações sobre quais tipos de organismos podem estar envolvidos na fixação de N<sub>2</sub>, confirmar a presença dos genes em um determinado organismo que se espera ser fixador ou identificar a presença de organismos que são suspeitos de serem pequenos contribuintes na fixação de N<sub>2</sub> (Zehr et al., 1996).

### **1.2.2 Produção de sideróforos**

Algumas ePGPRs podem produzir e secretar moléculas de baixo peso molecular que se ligam ao ferro com uma alta afinidade, denominadas de sideróforos (Gray e Smith, 2005). Embora o ferro seja um dos minerais mais abundantes na Terra, ele está relativamente indisponível no solo para a assimilação direta pelos micro-organismos. A razão é que em solos aeróbios, o Fe é encontrado predominantemente na forma Fe<sup>3+</sup>, principalmente como constituinte de polímeros oxihidroxi com uma solubilidade extremamente baixa, 10<sup>-18</sup> M em pH neutro. As concentrações mínimas requeridas para o crescimento normal das plantas são de 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-4</sup> M e, para muitos micro-organismos, de aproximadamente 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-7</sup> M. Para superar esse problema, os micro-organismos do solo secretam os sideróforos. Esses compostos se ligam ao ferro, são transportados de volta à célula microbiana e, então, o ferro fica disponível para o desenvolvimento da bactéria (Dobbelaere et al., 2003). Essa ligação ferro-sideróforo também impede a proliferação de patógenos, devido ao sequestro do ferro do meio ambiente. Exemplos de ePGPRs com esta atividade incluem *Pseudomonas putida* e *P. aeruginosa*. *P. putida* inibe o crescimento de *Fusarium oxysporum*, um patógeno de tomate (Vandendergh e

Gonzalez, 1984), enquanto *P. aeruginosa* inibe o crescimento de *Pythium*, também um patógeno do tomate (Buysens et al., 1995).

Ao contrário dos fitopatógenos microbianos, as plantas não são prejudicadas com a depleção de ferro pelas ePGPRs. Algumas plantas podem capturar o complexo ferro-sideróforo bacteriano, transportando-o para dentro de suas células, onde o ferro é liberado do sideróforo e fica disponível para a planta (Crowley et al., 1988). A produção de sideróforos também tem sido estudada em *Azospirillum lipoferum* (Saxena et al., 1986; Shah et al., 1992), *Azospirillum brasilense* (Bachhawat e Ghosh, 1987) e *Azotobacter vinelandii* (Knosp et al., 1984; Demange et al., 1988).

### **1.2.3 Solubilização de fosfato**

O fósforo existe na natureza em uma variedade de formas orgânicas (derivadas de micro-organismos e plantas) e inorgânicas (originada de fertilizantes fosfatados), que são muito pouco solúveis (Paul e Clarck, 1989). Na verdade, o fósforo é um dos nutrientes menos solúveis no ambiente, com menos do que 5% do fosfato total do solo estando disponível para as plantas (Dobbelaere et al., 2003). Sendo o fósforo um elemento nutricional essencial para o crescimento das plantas, a adição de fertilizantes fosfatados é uma prática comum na agricultura moderna. Entretanto, uma grande porção do fosfato inorgânico solúvel aplicado ao solo como fertilizante é rapidamente imobilizada pelo ferro e pelo alumínio, em solos ácidos, e por cálcio, em solos calcáreos, logo depois da aplicação, tornando-se, assim, indisponível para as plantas (Holford, 1997). Micro-organismos presentes no solo são capazes de solubilizar fosfato mineral insolúvel pela produção de vários ácidos orgânicos que acidificam o solo, liberando íons ortofosfato solúveis, que podem ser captados pelas plantas (Jones, 1998). Adicionalmente, tais micro-organismos são capazes de mineralizar compostos orgânicos fosfatados pela liberação de enzimas fosfatases (Garcia et al., 1992). A presença de quantidades significativas de atividade de fosfatases tem sido reportada e a maior fonte dessa atividade no solo é considerada como sendo de origem microbiana. Esta atividade é substancialmente aumentada na rizosfera (Rodríguez e Fraga, 1999).

Frequentemente, a solubilização de fosfato tem sido citada como um possível mecanismo de promoção de crescimento vegetal por ePGPRs. Um grande número de bactérias solubilizadoras de fosfato tem sido isolado da rizosfera de várias lavouras. Foi estimado que esses micro-organismos possam constituir de 20 a 40% da população de micro-organismos cultiváveis do solo e que uma proporção significativa deles possa ser isolada do solo da rizosfera (Chabot et al., 1993). Embora haja uma boa evidência para

a solubilização de fosfato por estes micro-organismos em culturas puras, é difícil demonstrar a solubilização de fosfato nos sistemas planta-micro-organismo. A produção por estas linhagens bacterianas de outros metabólitos benéficos para as plantas tais como fito-hormônios, antibióticos ou sideróforos, entre outros, tem criado confusão sobre o papel específico da solubilização de fosfato no crescimento vegetal e na estimulação da produção vegetal (Kloepper et al., 1989).

Experimentos feitos com diazotróficos solubilizadores de fosfato são poucos e os resultados obtidos são muito diversos, variando de acordo com a planta ou a espécie bacteriana. *Bacillus megaterium* e *Paenibacillus polymyxa* são capazes de acentuar o crescimento e a produção, mas não a captação de fósforo em canola, indicando que a solubilização de fosfato não é o principal mecanismo responsável pela resposta positiva de crescimento (de Freitas et al., 1997). Entretanto, estudos com *Bacillus firmus* (Datta et al., 1982) e *P. polymyxa* (Gaur e Ostwal, 1972) comprovaram o aumento na captação do fósforo e na produção em lavouras de arroz e trigo, respectivamente, depois da inoculação destas bactérias.

Vários estudos têm examinado a habilidade de diferentes espécies bacterianas em solubilizar compostos fosfatados inorgânicos insolúveis, tais como fosfato tricálcio, fosfato dicálcio, hidroxiapatita e fosfato rochoso. Entre os gêneros bacterianos com esta capacidade estão *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* e *Erwinia*, sendo que *Rhizobium*, *Pseudomonas* e *Bacillus* são os mais poderosos solubilizadores, enquanto o fosfato tricálcio e a hidroxiapatita são os substratos mais degradáveis. Como mencionado anteriormente, existe uma enorme quantidade de bactérias solubilizadoras de fosfato no solo e na rizosfera. Estas incluem linhagens aeróbias e anaeróbias, sendo que a maior concentração de bactérias solubilizadoras de fosfato é encontrada na rizosfera, em comparação com solo não rizosférico (Rodríguez e Fraga, 1999).

#### **1.2.4 Produção de reguladores de crescimento vegetal**

Os reguladores de crescimento vegetal são hormônios vegetais (fito-hormônios), os quais são reguladores naturais do crescimento das plantas, influenciando os processos fisiológicos. Os reguladores de crescimento vegetal podem ser classificados como auxinas (diferenciação celular, crescimento radicular, crescimento de frutos e controle da abscisão), citocininas (regulação do crescimento, diferenciação celular e senescência vegetal), giberilinas (divisão e alongamento celular, interrupção da dormência e aumento do desenvolvimento dos frutos), ácido abscísico (regulação da

transpiração, quebra de dormência e desenvolvimento inicial das sementes) e etileno (amadurecimento dos frutos, promoção da abscisão de folhas, frutos e flores e influência na expressão do sexo feminino) (Raven et al., 1996; Arshad e Frankenberger-Jr, 1998). A produção destes reguladores já foi relatada em bactérias dos gêneros *Gluconoacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Methylobacterium*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (Fuentes-Ramirez et al., 1993; Patten e Glick, 1996; Lucangeli e Bottini, 1997; Bastián et al., 1998; Cassán et al., 2001; Verma et al., 2001; Koenig et al., 2002;), sendo, portanto, essa habilidade amplamente encontrada em bactérias associadas às plantas.

A produção de fito-hormônios é um mecanismo de interação bactéria-planta, sendo influenciada por vários fatores, como o genótipo da planta e do próprio micro-organismo. Este fato foi relatado por Jain e Patriquin (1985), que mostraram que linhagens endofíticas puras de *Azospirillum*, ou filtrados das culturas, induzem a ramificação da raiz de trigo. Esses autores observaram que este fenômeno era influenciado pelo genoma bacteriano, em nível de linhagem, e pelo genoma da planta, em nível de cultivar. Nesse mesmo trabalho foi isolada e caracterizada uma auxina, ácido indol-acético (AIA), produzida pela bactéria, a qual apresentou relação com o efeito de ramificação da raiz (ver adiante).

As auxinas (do grego *auxein*= aumentar) são hormônios vegetais originárias do aminoácido triptofano, sendo a auxina natural chamada de ácido indol-acético (AIA) (Raven et al., 1996). A habilidade para sintetizar fito-hormônios é amplamente distribuída entre bactérias associadas a plantas – 80% dos isolados bacterianos de rizosferas são capazes de produzir AIA (Zakharova et al., 1999). Os primeiros estudos datam do final da década de 70. Tien e colaboradores (1979) demonstraram que uma linhagem de *Azospirillum brasilense*, quando exposta ao triptofano, produzia AIA e ácido láctico e a produção de AIA aumentava com a idade da cultura. *Bacillus* spp., isolado da rizosfera de *Phaseolus vulgaris* produz quantidades significativas de AIA (Srinivasan et al., 1996). Os isolados de rizosfera dos gêneros *Enterobacter*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Acetobacter* e *Agrobacterium* produzem uma maior quantidade de AIA do que os isolados de solo não associados à raiz (Asghar et al., 2002). Em bactérias fito-patogênicas, tais como *Agrobacterium tumefaciens* e patovares de *Pseudomonas syringae*, o AIA é produzido do triptofano via o intermediário indol-acetoamida e tem sido relacionado a tumores em plantas. As

bactérias benéficas sintetizam AIA predominantemente por um caminho alternativo dependente de triptofano, através do ácido indol-pirúvico.

A promoção do crescimento radicular é um dos marcadores pelo qual o efeito benéfico das bactérias promotoras de crescimento é medido. O estabelecimento rápido de raízes por alongamento das raízes primárias ou por proliferação de raízes laterais e adventícias é vantajoso para plantas jovens. Com muitas raízes, essas plantas aumentam a sua habilidade de se ancorar ao solo e obter água e nutrientes do ambiente, acentuando, assim, as suas chances de sobrevivência. Muitas bactérias promotoras do crescimento sintetizam AIA, e seu efeito na planta mimetiza o do AIA exógeno (Patten e Glick, 2002). O ácido indol-acético aparentemente não funciona como um hormônio em células bacterianas e sua produção pelas bactérias pode ter surgido devido à sua importância na relação bactéria-planta. Este regulador, quando secretado por bactérias, poderia promover o crescimento da raiz diretamente pela estimulação do alongamento da célula vegetal ou divisão celular, pela influência da ACC desaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato, um precursor do etileno) (Patten e Glick, 2002). Segundo esses autores, o papel do AIA bacteriano na promoção do crescimento vegetal ainda não está totalmente esclarecido.

### **1.3 Diversidade das comunidades microbianas associadas às raízes**

Estudos que busquem investigar a ecologia de micro-organismos associados com as raízes das plantas são de fundamental importância para a compreensão do impacto que novas tecnologias agrícolas terão sobre a ecologia do solo, as transformações de nutrientes e a sucessão vegetal. Entre essas tecnologias destaca-se a utilização de inoculantes, sendo necessário o conhecimento prévio das populações nativas a fim de avaliar o impacto produzido pelo uso (Di Cello et al., 1997). Por exemplo, Gilbert e colaboradores (1996) verificaram que a inoculação de *Bacillus cereus* UW85nl alterou a composição e/ou a diversidade de comunidades da rizosfera em três de quatro experimentos com soja.

Vários são os aspectos que influenciam na composição da comunidade microbiana na rizosfera. Dentre eles destacam-se o tipo da planta, o estágio de crescimento da mesma, variação na exsudação de compostos orgânicos pelas raízes, variações sazonais e diferentes práticas de cultivo.

As plantas exercem claramente um efeito significativo sobre a estrutura da comunidade bacteriana que habita a rizosfera, como demonstrado em diversos trabalhos (Weiland e Sundsbak, 2000; Marschner et al 2001; Smalla et al 2001; Kuske et al 2002;

Dunfield e Germida 2003; Garbeva et al 2004). Germida e colaboradores (1998) avaliaram a diversidade de bactérias endofíticas e do rizoplano associadas a plantas de canola cultivadas em três diferentes locais. Além disso, compararam as comunidades do rizoplano de canola e trigo em um desses locais, a fim de verificar se o tipo de planta influenciaria significativamente na composição da comunidade no mesmo solo. No trabalho, os autores verificaram que o tipo de planta influenciou a diversidade das bactérias associadas às raízes, sendo que a canola desempenhou um grande papel no controle da diversidade dessas bactérias.

Dados mais recentes sugerem que as variações observadas na atividade sazonal e abundância relativa de comunidades microbianas da rizosfera são planta-dependentes, afirmando que a determinação das comunidades de fungos e bactérias residentes na rizosfera é influenciada não apenas pela planta, mas também quanto ao seu estágio de desenvolvimento. A mudança de uma planta jovem, em florescimento ou em senescência pode influenciar a estrutura da comunidade microbiana, sendo observada uma maior variabilidade de micro-organismos quando associados a plantas jovens (Houlden et al., 2008). Entretanto, o efeito do estágio de desenvolvimento da planta em comunidades microbianas da rizosfera, não tem sido tão amplamente investigado (Di Cello et al., 1997; Dunfield e Germida, 2003; Mougél et al, 2006; Houlden et al., 2008)

Outro aspecto que influencia na composição da comunidade microbiana na rizosfera é rizodeposição de nutrientes pelas raízes das plantas, suportando um maior crescimento microbiano em regiões próximas das raízes em comparação com as demais regiões do solo. Isso resulta em um enriquecimento de micro-organismos próximo às raízes, formando agregados biológicos complexos, um fenômeno muitas vezes referido como o "efeito rizosfera" (Rovira et al., 1965; Dunfield e Germida, 2003; Mougél et al, 2006). A diferença de exudação depende tanto da espécie vegetal (Sørensen, 1997; Jaeger et al., 1999) como do estágio em que a planta se encontra (Di Cello et al., 1997), podendo haver a seleção de genótipos de micro-organismos que se adaptam a essas mudanças.

A prática de cultivo, como, por exemplo, a rotação de cultura também afeta composição da comunidade microbiana associada às raízes (Di Cello et al., 1997; Lupwayi et al., 1998; Smalla et al., 2001; Dunfield and Germida, 2003; Houlden et al., 2008). Esse aspecto também está diretamente ligado ao tipo de planta presente e, conseqüentemente, aos exsudados liberados pelas raízes das mesmas.

Variações sazonais também foram encontradas quando foi analisada a diversidade microbiana no solo. Estudos em que as comunidades microbianas foram examinadas ao longo de uma temporada de campo muitas vezes indicaram essa variação sazonal (Di Cello et al, 1997; Grayston et al, 2001; Smalla et al, 2001; Dunfield e Germida, 2003; Houlden et al., 2008). Smalla e colaboradores (2001) apresentaram evidências demonstrando que a abundância e a composição das populações de bactérias da rizosfera associadas com morango, batata e canola mudaram ao longo da temporada. Grayston e colaboradores (2001) demonstraram que o crescimento microbiano do solo e sua atividade metabólica frequentemente aumentaram na primavera e no verão em conjunto com temperaturas mais elevadas do solo, maior mobilização da matéria orgânica acumulada e um crescimento da raiz mais acelerado. Além da temperatura, outro fator que influencia a diversidade bacteriana é a precipitação (Wardle, 1998). Wylie et al., (1994) demonstraram que a distribuição de chuvas e umidade do solo foram os principais fatores que regularam a diversidade de micro-organismo no solo. Nogueira e colaboradores (2006) relataram que o solo que apresentou uma maior atividade microbiana também apresentou um maior teor de água.

#### **1.4 Microarranjos de DNA**

Os micro-organismos representam o grupo mais diverso em termos de filogenia e funcionalidade, compreendendo a maior parte da diversidade dos três domínios da vida: Archaea, Bacteria e Eukarya (Whitman et al., 1998; Curtis et al., 2002). Eles mediam quase todos os processos biológicos do planeta, tais como ciclos biogeoquímicos do carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo e metais (ferro, cobre e zinco) e biodegradação ou estabilização de ambientes contaminados. Além disso, estes organismos estão amplamente distribuídos em vários ambientes, mesmo os mais extremos. Numerosos mecanismos enzimáticos lhes permitiram adaptar-se a quase todos os nichos ecológicos e tirar vantagem de qualquer condição ambiental (Øvreås, 2000; Guerrero e Berlanga, 2006).

A ecologia microbiana é um amplo estudo da relação entre micro-organismos e seus ambientes bióticos e abióticos, compreendido, predominantemente, pela análise da composição, abundância e atividade das comunidades microbianas. Apesar de nosso conhecimento crescente do papel dos micro-organismos no funcionamento dos ecossistemas, a nossa visão atual do mundo microbiano ainda está incompleta e várias questões permanecem sem solução. Isto é parcialmente explicado (i) pela enorme diversidade de genes e metabolismos das espécies existentes, mas, também, de nichos

ecológicos e (ii) por limites tecnológicos, tais como a nossa incapacidade de cultivo para a maioria dos micro-organismos (Amann et al., 1995; Pace, 1997). A caracterização, identificação e análises quantitativas de comunidades microbianas diversas em ambientes naturais é um grande desafio. Existe uma consciência de que a baixa abundância de determinados micro-organismos, chamados “biosfera rara”, é ofuscada pelas populações dominantes. Entretanto, tais bioferas raras são altamente diversas e largamente inexploradas (Sogin et al, 2006) e podem representar a chave para a resiliência do ecossistema.

A tecnologia do microarranjo é uma das ferramentas atualmente mais utilizadas para o estudo da ecologia microbiana. Juntamente com o sequenciamento de última geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*), essas metodologias possibilitaram a percepção de que a diversidade e densidade populacional de comunidades microbianas que habitam a biosfera são muito maiores que as estimativas anteriores, baseadas em bactérias cultiváveis e sequências da subunidade pequena do rDNA (16S rDNA).

O princípio básico da tecnologia do microarranjo de DNA é simplesmente a identificação de uma mistura de ácidos nucleicos desconhecidos (alvos) pela hibridização com numerosos ácidos nucleicos conhecidos (sondas), que são imobilizados ordenadamente em uma superfície sólida, geralmente lâminas de vidro, plástico ou náilon (Loy et al, 2006). As sondas podem ser sintetizadas a partir de DNA (utilizando-se PCR) ou a partir de RNA (utilizando RT-PCR para obter cDNA). Ainda é possível fazer a síntese *in situ* de oligos, como é o caso das tecnologias Affymetrix e Agilent. As sondas são sintetizadas e, então, depositadas na superfície da matriz. Um procedimento comum para essa deposição utiliza um conjunto de pinos ou agulhas finas controlado por um braço robótico que é mergulhado em poços contendo as sondas de DNA e que, em seguida, deposita cada conjunto de sondas em locais designados na superfície da matriz. Tais robôs podem produzir, de forma simultânea, centenas de microarranjos contendo conjuntos idênticos de sondas.

O microarranjo é utilizado para responder uma pergunta relacionada aos DNA impressos na sua superfície. A resposta é obtida através da incubação do microarranjo com uma solução contendo DNAs, cDNAs ou RNAs que são gerados/obtidos da amostra biológica particular em estudo. Entretanto, antes da incubação, os DNAs ou RNAs utilizados para a hibridação no microarranjo são marcados com um corante fluorescente (ou em certos casos, um elemento radioativo). Dessa forma, as



hibridizações entre os DNAs ou RNAs com sequências complementares às sequências depositadas na superfície do microarranjo podem ser facilmente detectadas e quantificadas pelo princípio da complementaridade (Draghici, 2003).

A tecnologia do microarranjo foi originalmente desenvolvida por Schena e colaboradores (1995) para verificar padrões de expressão gênica. Essa foi desenvolvida visando combinar uma maior eficiência da tecnologia de Hibridização *in situ* com Fluorescência (FISH, do inglês *Fluorescence in situ Hybridization*) com a técnica de Southern *blot*, em um pacote menor e mais compacto (Schena et al., 1995; Shalon et al., 1996). Posteriormente, diversos trabalhos utilizaram a técnica em estudos visando a detecção de genes e a quantificação da expressão gênica (Loy et al., 2002; Lemarchand et al., 2004). Subsequentemente, a tecnologia foi adaptada para verificar o perfil de comunidades ambientais, buscando diferentes aspectos da ecologia microbiana, incluindo o ciclo do metano, a diversidade microbiana total e uma série de funções biogeoquímicas (Wilson et al., 2002; Zhou, 2003; Bae e Park, 2006). Nos últimos anos, a tecnologia do microarranjo surgiu como uma ferramenta muito poderosa para a detecção e identificação de bactérias em diversos níveis taxonômicos. Essa permite a identificação de linhagens puras e a análise simultânea de muitos organismos alvos em comunidades microbianas complexas, bem como o monitoramento de mudanças temporais e espaciais na estrutura de comunidades microbianas (Bodrossy e Sessitsch, 2004; Gentry et al., 2006; Loy e Bodrossy, 2006; Wagner et al., 2007).

A primeira grande divisão que pode ser feita em relação aos tipos de microarranjos é quanto ao tipo de sonda imobilizada na lâmina: microarranjos de DNA - constituídos de fragmentos de DNA tipicamente gerados utilizando PCR (Shena et al., 1995; DeRisi et al., 1997; Marshall e Hodgson, 1998); e microarranjos de oligonucleotídeos - constituídos de sequências de oligonucleotídeos curtas (10 a 40 nucleotídeos) ou longas (maior que 120 nucleotídeos), que são projetadas para serem complementares às regiões codificadoras de interesse. Microarranjos baseados em sondas oriundas de DNA possuem certas vantagens sobre microarranjos de oligonucleotídeos, especialmente para monitorar os padrões de expressão gênica. Uma dessas vantagens é a maior sensibilidade dos microarranjos baseados em sondas oriundas de DNA quando comparados a microarranjos de oligonucleotídeos, podendo esses últimos ser de 10 a 100 vezes menos sensíveis que os primeiros (Wu et al., 2001; Deneff et al., 2003; Rhee et al., 2004; Wu et al., 2004). Além disso, arranjos de DNA não necessitam do prévio conhecimento das sequências, diferentemente dos arranjos de

oligonucleotídeos. Isso porque os fragmentos de DNA com sequências desconhecidas podem ser amplificados de clones utilizando-se *primers* vetor-específicos. Entretanto, microarranjos de oligonucleotídeos também possuem vantagens quando comparados com microarranjos de DNA. Entre tais vantagens pode-se citar a maior facilidade com relação ao desenho das sondas, a vantagem de minimizar os efeitos confusos da hibridização-cruzada (Wodicka et al., 1997) e a capacidade de evitar regiões conservadas de genes ou regiões contendo estruturas secundárias estáveis. Além disso, estes arranjos são adequados para a detecção de mutações genéticas e polimorfismos, sendo que sondas de oligonucleotídeos curtos (~20 nucleotídeos) podem identificar um único mau pareamento de bases em uma hibridização sonda-alvo (Wilson et al., 2002; Urakawa et al., 2003).

Outra classificação dos microarranjos, descrita por Zhou e Thompson (2002), é baseada no tipo de sonda e sua potencial aplicação: i) Arranjos Gênicos Funcionais (FGA, do inglês *Functional Gene Arrays*) são usados para avaliar as atividades microbianas e são baseados no uso de sondas para genes codificadores de proteínas envolvidas em funções específicas; ii) Arranjos de Comunidades Genômicas (CGA, do inglês *Community Genome Arrays*) contêm sondas de grandes fragmentos de DNA e são utilizados para a detecção de genes-alvo e organismos; iii) Arranjos de Oligonucleotídeos para Filogenia (POA, do inglês *Phylogenetic Oligonucleotide Arrays*) são utilizados para avaliar a diversidade microbiana e são baseados em sondas de genes rDNA. Tais microarranjos são discutidos com mais detalhes a seguir.

#### **1.4.1 Arranjos Gênicos Funcionais (FGA)**

FGAs são um tipo especial de microarranjo contendo sondas para genes-chave envolvidos em processos microbianos funcionais de interesse, tais como ciclos biogeoquímicos de carbono (C), nitrogênio (N), enxofre (S), fósforo (P) e metais, resistência a antibióticos, biodegradação de ambientes contaminados e resposta a estresses (He et al., 2011). É uma ferramenta específica, sensível e quantitativa para análise rápida de comunidades microbianas para diferentes habitats, tais como água, solo, ambientes extremos, bioreatores e microbiomas humanos. Estes são utilizados, principalmente, para a análise funcional da atividade de comunidades microbianas em ambientes naturais (Wu et al., 2001).

O primeiro FGA foi construído com 89 sondas para quatro genes funcionais envolvidos no ciclo do nitrogênio (*nirS*, *nirK*, *amoA* e *pmoA*). Essas sondas foram amplificadas por PCR a partir de culturas puras e clones de bibliotecas (Wu et al.,

2001). Em seguida, vários FGAs foram desenvolvidos com *amplicons* de PCR ou oligonucleotídeos para alvos específicos de genes envolvidos em outros processos funcionais (Taroncher-Oldenburg et al., 2003, Steward et al., 2004, Bontemps et al., 2005; Zhang et al., 2007). Dessa forma, esses são FGAs mais específicos, que visam a detecção e identificação de comunidades microbianas de determinados ecossistemas ou processos funcionais de interesse. Nos últimos anos foram desenvolvidos FGAs mais abrangentes, chamados *Geochips*, com o objetivo de um levantamento de comunidades microbianas diversas. Várias versões dos *Geochips* foram desenvolvidas e usadas para comunidades microbianas para análises da diversidade funcional, composição, estrutura e atividade/capacidade metabólica para uma variedade de habitats, incluindo solos (Yergeau et al., 2007; Zhou et al., 2008; He et al., 2010a, He et al 2010b). Esses *Geochips*, constituídos de oligonucleotídeos de 50 nucleotídeos, foram desenvolvidos em várias gerações. A primeira geração de *Geochip* (*GeoChip 1.0*) foi construída com 763 sondas de genes envolvidos no ciclo do nitrogênio, oxidação do metano e redução de sulfito (Tiquia et al., 2004) e 2.402 sondas de genes envolvidos na biodegradação de contaminantes orgânicos e resistência a metal (Rhee et al., 2004). Devido ao fato do *GeoChip 1.0* ter apenas um conjunto limitado de sondas, um FGA mais abrangente, *GeoChip 2.0*, foi desenvolvido com 24.243 sondas de 150 categorias de genes (He et al., 2007). Três anos depois, o *GeoChip 3.0* foi desenvolvido com categorias de genes adicionais e várias características distintas (He et al., 2010<sup>1</sup>). Baseado no *GeoChip 3.0*, a mais recente geração, o *GeoChip 4.0* no formato *NimbleGen* foi desenvolvido, contendo não só aquelas categorias funcionais presentes no *GeoChip 3.0*, mas, também, incluindo novas categorias. Além disso, o *GeoChip 4.0* contém 36.062 sondas de genes derivados do microbioma humano (He et al., 2011).

A tecnologia do FGA revolucionou o estudo da ecologia microbiana. Ela tem sido considerada como sendo uma poderosa ferramenta para fornecer uma análise sensível, específica e potencialmente quantitativa de comunidades microbianas de diferentes ecossistemas. Embora as tecnologias de sequenciamento de última geração estejam disponíveis, FGAs são especificamente úteis para fornecer conhecimento sobre a nossa compreensão da diversidade funcional, composição e estrutura de comunidades microbianas e suas ligações com fatores ambientais e funcionamento do ecossistema. Isso é, em grande parte, devido às suas características únicas, incluindo os conjuntos de sondas definidas com funções conhecidas de comunidades para comparações, operações rápidas e facilidade na análise de dados.

#### 1.4.2 Arranjos de Comunidades Genômicas (CGA)

O CGA é conceitualmente análogo à técnica de Sondagem Genômica por Amostragem Reversa (RSGP, do inglês *Reverse Sample Genome Probing*, Voordouw, 1998), que utiliza genomas bacterianos inteiros (adequadamente fragmentados) como sonda e DNA ambiental marcado como alvo. A diferença entre as duas técnicas é com relação ao substrato e estratégias do sinal de detecção, visto que a RSGP utiliza membranas de náilon ou nitrocelulose e tem seu alvo marcado radiativamente, enquanto que o CGA utiliza uma superfície não-porosa (vidro) como substrato e tem seus alvos marcados por fluorescência.

A capacidade de acurácia e miniaturização robotizada precisa em substratos não-porosos são dois dos avanços-chave das tecnologias genômicas baseadas em microarranjo. O formato minúsculo dos microarranjos, juntamente com a detecção pela fluorescência, representa uma revolução fundamental nas análises biológicas. Como a RSGP, a principal desvantagem do CGA é que apenas componentes cultiváveis de uma comunidade microbiana podem ser monitorados, pois a construção do microarranjo requer a disponibilidade de isolados puros e individualizados (Voordouw, 1998). Com os recentes avanços da genômica ambiental, DNAs de alto peso molecular de organismos não cultiváveis podem ser acessados através de Cromossomos Bacterianos Artificiais (BACs, do inglês *Bacterial Artificial Chromosomes*). Dessa forma, os BACs podem ser utilizados para fabricar CGAs, permitindo a investigação de componentes não-cultiváveis de uma comunidade microbiana complexa.

O primeiro CGA foi desenvolvido por Wu e colaboradores (2004) e tinha como sonda o DNA genômico inteiro de 67 espécies bacterianas diferentes, incluindo  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -Proteobacteria e bactérias Gram-positivas, onde a maioria dos organismos era formada por membros dos gêneros *Azoarcus*, *Pseudomonas* e *Shewanella*. As estirpes foram selecionadas de diferentes ambientes. Como alvos foram utilizadas amostras de sedimentos marinhos, rio e solo, locais esses que os autores pretendiam caracterizar a composição microbiana complexa. Os resultados sugeriram que a hibridização por CGA tem potencial de uma ferramenta específica, sensível e quantitativa para a detecção e identificação de micro-organismos em amostras ambientais. Em outro trabalho, o mesmo grupo de pesquisa testou esse CGA quanto à capacidade de ser utilizado como um método alternativo para determinar o parentesco entre muitos micro-organismos (Wu et al., 2008). Como alvo foi utilizado estirpes de diferentes grupos de bactérias, incluindo três estirpes de *Shewanella*, duas de *Azoarcus*, nove de *Pseudomonas*, e uma

de *Halomonas*, de *Bacillus*, de *Marinobacter* e de  $\alpha$ -proteobactéria. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados de métodos tradicionais de hibridização DNA-DNA e indicaram que a hibridização baseada no CGA é comparável com esses métodos em termos de identificação de espécies. O CGA pode, então, servir como uma poderosa ferramenta para discriminar espécies relacionadas de micro-organismos.

Bae e colaboradores (2005) monitoraram alimentos vegetais fermentados ao longo do processo de fermentação utilizando um CGA, nesse caso denominado de GPMs (do inglês *genome-probing microarrays*). Para isso utilizaram o genoma de 149 bactérias, sendo 137 LACs (do inglês *lactic acid bacteria*). Como alvo foi utilizado DNA total extraído de *Kimchi*, uma tradicional comida coreana constituída de conservas de vegetais fermentados com vários tipos de temperos. Com isso os autores puderam observar a diversidade das comunidades LAC (mais de 100 espécies) envolvidas na fermentação do *Kimchi* e sua maturação durante o armazenamento.

#### **1.4.3 Arranjos de Oligonucleotídeos para Filogenia (POA)**

POAs, muitas vezes referidos como *Phylochips*, são microarranjos onde as sondas são compostas por sequências derivadas de genes de ácido ribonucleico ribossomal (rRNA), e são utilizados, principalmente, para análises filogenéticas da composição e estrutura de comunidades microbianas. Esses não apenas permitem a identificação de linhagens puras, mas, também, a análise simultânea de muitos organismos alvos em comunidades microbianas complexas, bem como o monitoramento de mudanças temporais e espaciais na estrutura de comunidades microbianas (Bodrossy e Sessitsch, 2004; Gentry et al., 2006; Loy e Bodrossy, 2006; Wagner et al., 2007). A molécula-alvo mais utilizada para detecção de espécies e análises filogenéticas dos micro-organismos é o gene da subunidade menor do ribossomo, o 16S rRNA (Guschin et al., 1997; Loy et al., 2005; Sanguin et al., 2005). *Phylochips* têm sido aplicados com sucesso em diversas áreas, incluindo a indústria de alimentos (Lehner et al., 2005; Eom et al., 2007), bioterrorismo (Doran et al., 2007) e estudos ambientais (Loy et al., 2002; Peplies et al., 2004; Palmer et al., 2006; Sessitsch et al., 2006; DeSantis et al., 2007).

Dois tipos principais de *Phylochips*, que se diferem no número total de sondas, são normalmente utilizados para diagnósticos microbianos. *Phylochips* de alta densidade consistem de milhares de sondas de oligonucleotídeos que fazem uso excessivo do alto paralelismo do formato do microarranjo e com sofisticados métodos computacionais para o projeto de milhares de sondas e para análise do complexo padrão de hibridização (DeSantis et al., 2007). Em contraste, *Phylochips* de baixa-densidade

consistem de até algumas centenas de sondas de oligonucleotídeos e, geralmente, têm como alvo micro-organismos conhecidos por executar um metabolismo específico (Loy et al., 2002), pertencentes a um táxon específico (Lehner et al., 2005) ou que vivem em um habitat/ecossistema de interesse (Neufeld et al., 2006). Devido ao fácil acesso para a produção de microarranjos e, geralmente, os baixos custos, *Phylochips* de baixa densidade têm encontrado aplicações consideráveis em estudos de microbiologia e diagnósticos (Loy e Bodrossy, 2006).

#### **1.4.4 Cuidados na confecção e na aplicação do microarranjo**

##### **1.4.4.1 Projeção das sondas**

Uma das fases mais crítica na confecção de microarranjos de oligonucleotídeos dedicados à ecologia microbiana é a etapa da projeção das sondas. Isso porque as sondas deverão combinar sensibilidade (as sondas devem detectar alvos com baixa abundância em misturas complexas), especificidade (as sondas não devem sofrer hibridização-cruzada com sequências não-alvo) e uniformidade (sondas devem exibir comportamentos de hibridização similares) (Loy e Bodrossy, 2006; Wagner et al., 2007). A natureza altamente conservada de muitos genes e a grande quantidade de sequências de dados desconhecidas em amostras ambientais tornam difícil a tarefa de projetar e validar sondas de microarranjo específicas a uma determinada sequência alvo (Gentry et al., 2006). Além da porcentagem de similaridade, longos trechos de uma sonda que são complementares a uma sequência não-alvo podem levar a hibridizações inespecíficas substanciais e devem ser considerados durante o projeto da sonda (Kane et al., 2000; Hughes et al., 2001). Essa dificuldade pode ser aliviada, em grande parte, através do uso de sondas múltiplas para cada taxa-alvo (Loy e Bodrossy 2006).

Apesar de numerosos programas que auxiliam no desenho de sondas estarem disponíveis gratuitamente para acadêmicos (Lemoine et al 2009), apenas poucos podem ser utilizados na aplicação de estudos de ecologia microbiana (Dugat-Bony et al., 2011), fazendo com que esta etapa deva ser realizada manualmente.

Ainda é recomendado testar cada sonda para todos os destinos incluídos em um experimento de microarranjo. Entretanto, testes experimentais de sondas se tornam ambiciosos quando se trabalha com amostras ambientais contendo comunidades microbianas altamente diversificadas. Custos consideráveis e demanda de tempo devem ser considerados para a síntese individual de vários milhares de sondas candidatas, sua deposição nas lâminas de vidro e sua validação contra uma grande quantidade de metas, a fim de realizar um *screening* exaustivo (Duc et al 2009).

Outro aspecto que deve ser levado em conta no momento da projeção das sondas é quanto ao tamanho das mesmas, pois isso influenciará diretamente na sensibilidade e na especificidade do microarranjo. Sondas curtas (20-25 nucleotídeos) permitem melhorar a especificidade significativa para a identificação de micro-organismos presente em amostras ambientais. Entretanto, apresentam a desvantagem da sensibilidade muito menor que arranjos com oligonucleotídeos longos, sob as mesmas condições experimentais (Religio et al., 2002) e, portanto, requerem a amplificação do gene alvo. Chou e colaboradores (2004) verificaram que sondas de 60 nucleotídeos podem detectar alvos com oito vezes mais sensibilidade que sondas com 25 nucleotídeos. Guschin e colaboradores (1997) utilizando um microarranjo baseado em sequências da subunidade pequena do rRNA de bactérias nitrificantes demonstraram que com o aumento do comprimento da sonda perde-se a discriminação dos mau-pareamentos, enquanto que com a diminuição do tamanho da sonda, a intensidade do sinal de hibridização (sensibilidade) é sacrificada. Ou seja, sondas de oligonucleotídeos curtas são mais específicas, permitindo a discriminação dos polimorfismos de nucleotídeo único em condições ótimas, mas ao custo de sensibilidade reduzida (Religio et al., 2002).

Para verificar a especificidade da sonda, programas de computador geralmente usam resultados produzidos por algoritmos, como BLAST, para procurar hibridações cruzadas contra bancos de dados construídos de acordo com a aplicação do microarranjo. Nesta etapa, a previsão de potenciais hibridações cruzadas é geralmente baseada nas recomendações de Kane e colaboradores (2000), onde a sonda não deverá ter uma porcentagem de identidade maior que 75-80% com uma sequência não-alvo, ou trechos contíguos de identidade maiores que 15 nucleotídeos com uma sequência não-alvo. Além disso, regiões de baixa complexidade, tais como aquelas contendo homopolímeros longos também podem contribuir para afetar a especificidade da sonda e, portanto, devem ser evitadas no momento de projeção da sonda (Wang e Seed, 2003; Leparc et al., 2009).

#### **1.4.4.2 Outros pontos a serem abordados**

Mesmo experimentos de microarranjo meticulosamente projetados e executados podem ser difíceis para correlacionar quantitativamente as diferenças de sinais de hibridação com as mudanças em populações específicas, devido à grande quantidade de sequências desconhecidas de ácidos nucleicos em amostras ambientais. É tipicamente assumido que a intensidade do sinal de hibridização é diretamente proporcional à

abundância do organismo alvo, mas hibridação inespecífica devido à presença de microorganismos não caracterizados em amostras ambientais pode ocorrer e confundir a interpretação. A análise de genes-chave com outros métodos, como PCR em tempo real, pode ajudar a validar a precisão quantitativa de observações importantes e fortalecer as conclusões tiradas a partir de dados de microarranjo (Rhee et al., 2004).

Uma das maiores necessidades para a análise de microarranjos de comunidades microbianas é o desenvolvimento de métodos normalizados de análise e interpretação dos dados. Está se tornando cada vez mais difícil analisar os resultados de microarranjo como matrizes mais abrangentes, que são necessárias para entender comunidades complexas. Métodos estatísticos desenvolvidos para a genômica funcional podem não ser apropriados para analisar os conjuntos de dados complexos, muitas vezes produzidos a partir de análise de microarranjos de amostras ambientais. Novos métodos estatísticos devem ser criados e/ou métodos existentes adaptados para enfrentar os desafios específicos colocados por estes tipos de matrizes. O desenvolvimento de padrões universais também auxiliará na análise de dados e permitirá a comparação dos dados de matrizes entre experimentos e laboratórios (Gentry et al., 2006). Alguns trabalhos desenvolvem abordagens onde quantidades conhecidas de oligonucleotídeos marcados ou fragmentos de DNA são colocados na solução de hibridização como um controle (Cho e Tiedje, 2002; Dudley et al., 2002; Bodrossy et al., 2003). Os resultados desses microarranjos são, então, normalizados com base na intensidade do sinal resultante da hibridização do DNA controle com as sondas-controle correspondentes no arranjo (Gentry et al., 2006).

A tecnologia do microarranjo oferece a oportunidade de identificar milhares de genes microbianos ou populações simultaneamente, mas a baixa biomassa microbiana, muitas vezes, impede a aplicação desta tecnologia para muitas comunidades microbianas naturais. Para genes de cópia única, DNA genômico de aproximadamente  $10^7$  células é necessário para obter uma hibridização razoavelmente forte utilizando-se microarranjos com sondas de 50 nucleotídeos (Rhee et al., 2004). Contudo, populações individuais em algumas amostras ambientais particulares, mesmo de solos superficiais, onde a biomassa é tipicamente alta, geralmente consistem em menos de  $10^7$  células por grama de solo. Isso leva a grandes dificuldades na análise de comunidades microbianas naturais. A amplificação do DNA da comunidade anteriormente à hibridização se faz, então, necessária. Entretanto, é desafiador amplificar esses genes de maneira quantitativa e representativa (Zhou e Thompson, 2002; Vora et al., 2004). Segundo os



autores, métodos de amplificação baseados em PCRs tradicionais sofrem de problemas inerentes associados ao viés e artefatos e sua natureza de amplificação gene por gene faz com que a análise do método de microarranjo seja impraticável. Para contornar esse impedimento, Wu e colaboradores (2006) utilizando a estratégia de amplificação por deslocamento múltiplo (MDA, do inglês *multiple displacement amplification*, Dean et al., 2002) realizaram a amplificação da comunidade genômica total (WCGA, do inglês *whole-community genome amplification*) anteriormente à aplicação da técnica do microarranjo. Com isso foi possível aos autores analisar a estrutura de comunidades microbianas de águas profundas com baixa biomassa e demonstrar a aplicação do microarranjo nessas condições.

#### **1.4.5 Microarranjos e o sequenciamento de última geração**

O sequenciamento de última geração (NGS, do inglês *Next-Generation Sequencing*), incluindo o pirosequenciamento introduzido pela plataforma do *454 Live Sciences, Inc.*, bem como outras plataformas, como a *Solexa (Illumina, Inc.)* e *SOLID (ABI, Inc.)* realizam o sequenciamento de um grande número de fragmentos de DNA, a partir de amostras complexas ou transcritomas de maneira rápida e com alto custo benefício. O pirosequenciamento é particularmente adequado para estudos de ecologia microbiana por fornecer fragmentos relativamente longos em comparação com outras tecnologias de NGS, e, portanto, tem sido amplamente adotado por pesquisadores dessa área (Angly et al., 2006; Edwards et al., 2006; Warnecke et al., 2007; Brown et al., 2009). No entanto, outras plataformas também estão sendo aplicadas atualmente para esse campo (Lazarevic et al., 2009). Apesar do NGS e o microarranjo serem consideradas tecnologias concorrentes, cada ferramenta apresenta características distintas e complementares adequadas para diferentes aplicações em ecologia microbiana.

O NGS é adequado para catalogar a diversidade genética (incluindo a descoberta de novos genes) sem uma informação de sequência *a priori*, através do sequenciamento de genes de 16S rRNA e genes funcionais amplificados (dada a limitação dos *primers* utilizados na PCR) ou sequenciar genomas completos de comunidades microbianas. Como tal, as tecnologias NGS podem ser consideradas sistemas abertos. Por outro lado, microarranjos podem avaliar apenas sequências que são capazes de hibridizar com as sondas no arranjo, e, portanto, representam sistemas fechados (Roh et al., 2010).

Para a maioria dos estudos de pirosequenciamento, os pesquisadores necessitam apenas preparar os produtos de PCR dos genes alvo ou extrair DNA de amostras

biológicas. Já para as novas aplicações das análises do microarranjo, entretanto, é necessário preparar as lâminas, bem como processar e marcar as amostras-alvo para a hibridização. Cada um desses passos pode ser demorado e caro. Todavia, uma vez pronta, a plataforma é adequada para a análise de centenas de amostras, particularmente para a análise de genes funcionais com a diversidade relativamente baixa (por exemplo, o gene *pmoA*) (Roh et al., 2010).

Usando um arranjo que compreende algumas centenas de sondas diferentes que tenham como alvo um gene funcional (p. ex. microarranjo para análise do gene *pmoA* de bactérias metanotróficas) um pesquisador hábil pode analisar até 40 amostras ambientais por dia a um baixo custo por amostra (\$45 USD). Isso resulta em uma análise fácil dos dados que representam a maior parte da diversidade genética. Em contraste, a mesma análise utilizando-se NGS pode custar mais (\$15,000 USD) e envolver um maior tempo de espera para receber as sequências de dados. Além disso, a análise a jusante dos dados resultantes do pirosequenciamento requer sistemas de computador sofisticados, ferramentas de bioinformática e uma significativa demanda de tempo (Roh et al., 2010).

As duas técnicas, tanto o microarranjo como o pirosequenciamento, podem ser combinadas, o que resulta na melhoria da cobertura dos alvos do microarranjo e permite a confirmação da especificidade dos resultados baseados no microarranjo.

#### **1.4.6 Microarranjos utilizando o gene *nifH***

A diversidade de micro-organismos fixadores de nitrogênio (bactérias diazotróficas) tem sido amplamente estudada em ambientes aquáticos e terrestres utilizando abordagens moleculares com base no gene marcador *nifH* (Zehr et al., 1995; Widmer et al., 1999; Zani et al., 2000; Steppe e Paerl, 2002; Church et al., 2005; Langlois et al., 2005; Deslippe e Egger, 2006; Izquierdo e Nusslein, 2006; Bostrom et al., 2007). Este gene codifica a dinitrogenase redutase, também chamada ferro-proteína, do complexo da nitrogenase (Raymond et al., 2004). Nos últimos anos, alguns estudos (Steward et al., 2004; Moisaner et al., 2006; Zhang et al., 2007; Duc et al., 2009) focaram no desenvolvimento de microarranjos com oligonucleotídeos sintetizados a partir de regiões do gene *nifH*. Esses arranjos facilitaram a caracterização das comunidades diazotróficas com alto rendimento quando comparados com outros métodos *fingerprinting* [Polimorfismo no Tamanho do Fragmento de Restrição Terminal (T-RFLP, do inglês *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE, do inglês *Denaturing Gradient*

*Gel Electrophoresis*)] e com uma resolução filogenética similar às abordagens de clonagem-sequenciamento (Duc et al., 2009).

Steward e colaboradores (2004) confeccionaram macroarranjos de baixo custo para facilitar o exame da diversidade dos genes da nitrogenase no ambiente, em particular os genes *nifH* em ambientes aquáticos. Macroarranjo é um termo utilizado para os antecessores dos microarranjos, geralmente utilizando-se membranas de náilon com um número reduzido de pontos (sondas). Nesse trabalho, as sequências dos genes de *nifH* foram obtidas a partir de bibliotecas de clones geradas pela amplificação de amostras de DNA genômico extraídas de amostras de água do Rio Choptank e da Baía de Chesapeake, na península Deimarva, na costa leste dos Estados Unidos. Foram incluídos, também, genes *nifH* de micro-organismos de referência. Os resultados indicaram que o procedimento de macroarranjos era altamente reprodutível e, pelo menos, um método semiquantitativo para avaliar a diversidade genética de uma mistura de produtos de PCR. No mesmo ano, Jenkins e colaboradores (2004) utilizaram o mesmo macroarranjo desenvolvido pelo trabalho anteriormente citado (Steward et al., 2004) para comparar a distribuição de filotipos do gene *nifH* em amostras de um transecto de amostras de águas superficiais da Baía de Chesapeake. Os resultados mostraram que macroarranjos de DNA têm grande potencial para o mapeamento da variabilidade espacial e temporal da diversidade de genes funcionais no ambiente.

Molsander e colaboradores (2006) descreveram o projeto de um microarranjo gene-funcional visando o gene *nifH* e o uso desse arranjo para verificar o perfil da diversidade e expressão desse gene em tapetes microbianos marinhos coletados em Guerrero Negro, Baixa Califórnia do Sul, no México, com e sem carga de nutrientes. As sondas utilizadas para confecção desse microarranjo foram sequências de *nifH* de 60 nucleotídeos, sendo elas: (i) sequências obtidas em dois trabalhos de Omoregie e colaboradores (2004 a, b), ambas oriundas de tapetes de cianobactérias marinhas coletadas em Guerrero Negro, visto que esta seria a aplicação inicial para este microarranjo; (ii) sequências de ambientes de estuário, costa e oceano aberto, a fim de ampliar a aplicabilidade do microarranjo para outros ambientes marinhos (iii) algumas sequências de micro-organismos cultivados de diferentes ambientes, para representar grupos filogenéticos distintos. Pode se perceber que a grande parcela das sequências de *nifH* utilizadas para confecção desse microarranjo tem origem em ambientes marinhos, tornando esse específico para bactérias diazotróficas de tapetes microbianos de tais ambientes. Após sete meses de experimentos, que consistiram na manipulação de

nutrientes em tapetes microbianos de Guerrero Negro, os autores constataram que não houve expressão dos genes relacionados à fixação de nitrogênio (gene *nifH*) quando houve suplementação com nitrogênio, entretanto a comunidade de bactérias diazotróficas foi detectada. Outra observação interessante foi que a diversidade de comunidades de bactérias diazotróficas foi maior quando a população expressava o gene *nifH*, ocorrendo diferenças específicas em resposta aos nutrientes. Com esse trabalho, os autores demonstraram que o microarranjo de *nifH* foi uma ferramenta poderosa para analisar comunidades diazotróficas em ambientes marinhos.

No ano seguinte, esse mesmo grupo de pesquisa publicou outro trabalho avaliando a variabilidade espaço-temporal de bactérias diazotróficas na Baía de Chesapeake (Molsander et al., 2007). Embora o projeto das sondas do microarranjo tenha sido idêntico ao microarranjo de *nifH* anterior (Molsander et al., 2006), o número de sondas *nifH* aumentou de 96 para 706. Os autores afirmaram que o aumento do número de sondas no arranjo foi necessário devido ao surgimento de novas sequências do gene *nifH* oriundas de sequenciamento ambiental, demonstrando a colaboração das tecnologias de NGS no aprimoramento dos microarranjos. A maioria das sondas utilizadas nesse novo microarranjo foram oriundas de sequências de 60 pb do gene *nifH* depositadas no GenBank. Nessas incluem-se algumas sequências de Bactéria e Archaea cultivadas, enquanto que a maioria das sondas representa sequências derivadas de genomas de organismos não cultivados encontrados em vários ambientes, incluindo mar aberto, saídas de mar, estuários (incluindo um número significativo de sequências provenientes da baía de Chesapeake), tapetes marinhos microbianos, pântanos, lagos e solos. Cento e trinta e duas sondas foram selecionadas de uma biblioteca de clones gerada em um trabalho anterior (Jenkins et al., 2004), oriundas do rio Choptank e da baía de Chesapeake. Da mesma forma que o microarranjo anterior, percebe-se que a maioria das sequências de *nifH* utilizadas para confecção desse novo microarranjo teve origem em ambientes aquáticos, especialmente marinhos. Dessa maneira, esse microarranjo também resultou específico para bactérias diazotróficas de ambientes marinhos. Com esse microarranjo os autores demonstraram que em comunidades de águas profundas a diversidade entre os meses de abril e outubro foi bastante semelhante em cada um dos locais de amostragem, diferentemente de quando essa análise foi realizada para águas da superfície. Os autores também demonstraram que as comunidades de bactérias diazotróficas do norte da baía diferiram das comunidades do centro-sul da baía, havendo uma mudança gradual do norte para o sul.

Zhang e colaboradores (2007) utilizaram um microarranjo de nucleotídeos curtos baseado no gene *nifH* para monitorar a presença (baseado no DNA) e a atividade (baseado no mRNA) de comunidades diazotróficas em amostras de raízes de arroz selvagem da Namíbia. O arranjo compreendia 194 sondas de oligonucleotídeos, na época representando mais de 90% das sequências de *nifH* nos bancos de dados. Esse microarranjo foi baseado, principalmente, em sequências de *nifH* de procariontes ainda não identificados, pelo predomínio esmagador dos fragmentos ambientais de *nifH* de micro-organismos não cultivados em bancos de dados públicos, segundo os autores. Entretanto, os autores afirmaram que o microarranjo se mostrou altamente reprodutível, sendo um método semiquantitativo para mapear a variabilidade de bactérias diazotróficas, permitindo uma rápida comparação da abundância relativa e a atividade de organismos procariontes no ambiente.

Por fim, Duc e colaboradores (2009a) descreveram o desenvolvimento de um microarranjo com oligonucleotídeos de *nifH* (cada sonda com 20 nucleotídeos) para o monitoramento da diversidade de *nifH* em amostras de solo obtidas da geleira Damma, na Suíça. Nesse trabalho, os autores relataram a seleção e validação de 946 sondas de um conjunto elaborado *in silico* a partir de 2.727 candidatas que foram projetadas com auxílio do *software* ARB (Ludwig et al., 2004), usando a síntese *in situ* da plataforma Geniom® One. O projeto das sondas foi baseado em um banco de dados contendo 318 sequências de *nifH* recuperados de amostras de solo da geleira Damma (Duc et al, 2009b), alinhadas com 3.324 sequências recuperadas do banco de dados Pfam Fer4\_NifH (2005) (Bateman et al., 2004) e 4.298 sequências fornecidas pelo pesquisador B .D . Jenkins (do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Rhode Island, em Kingston, Jamaica). Um pequeno número de sondas foi testado usando-se uma segunda plataforma de microarranjo para demonstrar a consistência do microarranjo *nifH*. Finalmente, a aplicabilidade do conjunto de sondas para estudar a diversidade de *nifH* em amostras ambientais foi avaliada pela comparação de microarranjo e dados de clonagem e sequenciamento. Esse microarranjo foi específico para bactérias diazotróficas de ambientes alpinos, visto que todas as sequências utilizadas como sondas provêm desses ambientes. Com esse trabalho os autores demonstram que o conjunto final de sondas foi consistente e adequado para analisar amostras ambientais. Esse representa o primeiro microarranjo *nifH* experimentalmente validado e, portanto, constitui uma ferramenta promissora para

fornecer dados sólidos sobre a diversidade e atividade de bactérias diazotróficas de vida livre em ambiente alpino.

### **1.5 Canola**

No Rio Grande do Sul, as culturas de inverno desempenham um papel fundamental na sustentabilidade dos agroecossistemas. Por um lado, servem como plantas de cobertura, mantendo o solo vegetado ou coberto por palhada, antecedendo as culturas comerciais de verão. Neste sentido, são indispensáveis para o funcionamento do sistema de plantio direto. A cobertura permanente do solo por plantas ou por resíduos vegetais, assegurada pelas culturas de inverno, resulta em reflexos relevantes do ponto de vista ambiental, uma vez que propiciam a redução das perdas de solo e nutrientes por erosão (Guadagnin et al., 2005). Além disso, o aporte constante de resíduos vegetais aumenta a matéria orgânica do solo e promove o sequestro do carbono da atmosfera (West e Post, 2002).

Além dos cereais de inverno, como trigo, cevada, triticale, centeio e aveia, culturas como a canola (*Brassica napus* e *B. rapa*) destacam-se entre as espécies de inverno. Ela é uma opção de planta para cobertura de solo, para rotação de culturas e para produção de óleo, tanto óleo comestível quanto biodiesel. De acordo com Mourad (2006), o potencial para a produção de biodiesel a partir de canola, em termos de volume de óleo por área, é maior do que o de culturas como a soja e a mamona.

Não obstante à importância das culturas de inverno, seu cultivo frequentemente é reduzido em decorrência de sua baixa rentabilidade (Assmann et al., 2003). Um dos principais fatores limitantes à produção de não-leguminosas é a adubação nitrogenada, uma vez que o N é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas. No entanto, ele é suprido, frequentemente, em quantidades insatisfatórias, limitando o rendimento das culturas (Amado et al., 2000). O suprimento inadequado de nitrogênio tem sido apontado como uma das causas que mais contribui para baixas produtividades das culturas (Bortolini et al., 2000). Seu custo é elevado e a eficiência do fertilizante nitrogenado pode ser baixa em decorrência de processos como volatilização, desnitrificação, escoamento superficial, lixiviação e imobilização microbiana (Lara Cabezas et al., 2000).

Em termos mundiais, as pesquisas objetivando o aumento da produção de canola, com a redução dos custos de adubação mineral são escassas. Entretanto, existem alguns trabalhos relatando o isolamento de diversas bactérias promotoras de crescimento vegetal da rizosfera de canola (Kloepper et al., 1988, Siciliano e Germida,

1999, Bertrand et al, 2001, Dunfield e Germida, 2003). No trabalho de Kloepper e colaboradores (1988) 887 linhagens bacterianas, isoladas da rizosfera de canola, foram testadas para características de PGPR. Destas, 35 linhagens foram positivas para atividades de promoção de crescimento e seis destas linhagens apresentaram rendimentos entre 7 a 19% maiores do que os controles não-inoculados, em experimentos a campo, por dois anos consecutivos. Nesse trabalho, os autores destacaram os dois maiores desafios para o emprego de PGPRs como inoculantes agriculturalmente viáveis: o desenvolvimento de uma metodologia de aplicação do inoculante nas sementes e a necessidade do controle na amplitude de variação da resposta da planta a uma determinada linhagem de PGPR. Para eles, a principal fonte dessa variação não parece estar relacionada ao hospedeiro e sim, mais provavelmente, à presença de micro-organismos deletérios, disponibilidade de água e nutrientes e à presença de elementos tóxicos. Esses fatores sugerem a necessidade de um acompanhamento frequente das áreas de cultivo, com o monitoramento adequado dos fatores abióticos e bióticos de cada local.

Por outro lado, Siciliano e Germida (1999) destacaram que a composição e diversidade da comunidade bacteriana associada às raízes de plantas são influenciadas por uma variedade de fatores específicos da planta, tais como densidade de raízes e liberação de exudatos. Tais fatores, por sua vez, são influenciados pelos programas de cultivo. Nesse trabalho, os autores compararam a diversidade de comunidades bacterianas presentes em raízes e na rizosfera de três variedades de canola, em dois campos diferentes, sendo uma delas modificada geneticamente para resistência ao herbicida glifosato. Essa variedade de canola exibiu uma menor diversidade bacteriana nas suas raízes que as outras duas cultivares não modificadas, enquanto que as populações bacterianas das rizosferas das três cultivares foram semelhantes. Bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* responderam por cerca de 12% da comunidade bacteriana identificada nas raízes e rizosferas das cultivares testadas, evidenciando a agressiva capacidade de colonização da superfície das raízes, importância na interação planta-doenças e nas habilidades de promoção de crescimento vegetal deste gênero bacteriano.

Bertrand e colaboradores (2001) isolaram e caracterizaram bactérias Gram-negativas da rizosfera e de raízes de canola utilizando meio de cultura sem nitrogênio. Os efeitos de promoção de crescimento vegetal dessas bactérias também foram testados. Com o posicionamento filogenético baseado em sequências de 16S rRNA verificaram

que pelo menos quatro gêneros estavam representados *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Agrobacterium* e *Phyllobacterium*, sendo o último o que apresentou maior importância quanto ao efeito de rizobactéria promotora de crescimento vegetal.

Dunfield e Germida (2003) também destacaram a importância de um monitoramento constante da comunidade bacteriana em ecossistemas agrícolas, especialmente daqueles em que são cultivadas plantas modificadas geneticamente. Esses autores demonstraram que existe uma variação significativa da comunidade bacteriana durante os períodos de desenvolvimento de plantas de canola modificadas geneticamente. No entanto, as mudanças na estrutura das comunidades bacterianas não foram permanentes, uma vez que nos períodos de pós-colheita e pré-semeadura não foram encontradas diferenças significativas entre as populações. Estudos anteriores (Di Cello et al., 1997, Grayston et al., 2001, Smalla et al., 2001), nos quais comunidades bacterianas foram examinadas durante todo o período de plantio, também indicaram a existência de uma variabilidade sazonal. Tais resultados reforçam, novamente, a necessidade de um acompanhamento constante da comunidade bacteriana em cada área de plantio.

Entretanto, até o momento, não existem trabalhos relatando o isolamento de bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas às culturas de canola do Rio Grande do Sul, estado que mais produz canola no Brasil. Por essa razão, é importante conhecermos tais PGPRs, visando a produção de um inoculante específico para essa cultura nessa região do Brasil.



## 2 Objetivos

Este trabalho teve dois objetivos principais.

1) Isolar e identificar bactérias cultiváveis associadas à rizosfera e às raízes de canola (*Brassica napus*) para verificar se possíveis mudanças nas comunidades microbianas foram associadas com os diferentes estágios de rotação de culturas e com as diferentes fases do crescimento da canola. Além disso, também foram avaliadas as habilidades de promoção do crescimento vegetal dos isolados bacterianos e alguns destes foram selecionados para teste de promoção de crescimento vegetal.

2) Desenvolver um microarranjo de DNA para a identificação de comunidades bacterianas conhecidas e cultiváveis associadas a culturas de canola a fim de direcionar o isolamento de espécies com características de promoção de crescimento vegetal, visando-se, em estudos posteriores, a formulação de um inoculante para essa cultura.

### **3 Estruturação da tese**

Os resultados obtidos nesta tese estão apresentados em duas partes:

A **Parte I** é composta pelo artigo publicado no periódico *Applied Soil Ecology*, intitulado “*Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth*”. Contém introdução, metodologia, resultados e discussão.

A **Parte II** apresenta os dados não publicados sobre o desenvolvimento de um microarranjo específico para a identificação da comunidade de bactérias diazotróficas cultiváveis em um determinado ambiente. Contém metodologia, resultados e discussão.

Na sequência, seguem as considerações finais do trabalho juntamente com as perspectivas para a sua continuidade, a lista da bibliografia utilizada e os anexos.

**3.1 Parte I - *Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth* (Artigo publicado na revista *Applied Soil Ecology*).**



## Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth

Roberto Farina<sup>a</sup>, Anelise Beneduzi<sup>a</sup>, Adriana Ambrosini<sup>a</sup>, Samanta B. de Campos<sup>a</sup>, Bruno Brito Lisboa<sup>b</sup>, Volker Wendisch<sup>c</sup>, Luciano K. Vargas<sup>b</sup>, Luciane M.P. Passaglia<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biotecnologia, Departamento de Genética, Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15.053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Rua Gonçalves Dias 570, 90130-060 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Department of Genetics of Prokaryotes, Bielefeld University, Universitätsstraße 25, 33594 Bielefeld, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 October 2011

Received in revised form

22 December 2011

Accepted 28 December 2011

#### Keywords:

Canola

PGPR abilities

Bacterial diversity

Inoculants

Plant growth response

### ABSTRACT

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) stimulate the growth of their host plant and the presence of the plant clearly has a significant effect on rhizospheric bacterial community structure. In this study, cultivable bacteria associated with soil, rhizosphere and the roots of canola (*Brassica napus*) were isolated and identified by amplifying the V6–V8 region on the 16S rDNA sequence, in order to verify if possible changes in the microbial communities were associated with some stages of crop rotation and canola growth. Several PGP activities of all isolates were also evaluated. The bacterial richness associated to the rhizospheric soil of canola at the rosette stage was more than 20% larger than the other stages indicating that the microbial community structure was influenced by seasonal variation. There was also a relationship between bacterial diversity and monthly rainfall. *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, and *Pseudomonas* were the most abundant among all the bacterial genera identified. Several of those bacteria could produce indolic compounds and siderophores, to solubilize phosphate, and some could also fix nitrogen. Some of the isolates tested for growth-promoting effects of bacterial treatment in canola were able to promote plant growth. The presence of specific PGP traits suggests that these particular organisms can promote plant growth by more than one mechanism and that some of these strains should be tested in further field inoculation experiments.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) stimulate the growth of their host plants (Vessey, 2003). These bacteria can colonize either only the rhizosphere (epiphytic bacteria), or also inside the roots (endophytic bacteria) (Glick, 1995). Endophytic bacteria can be either associative or facultative. Facultative endophytes live in the spaces between the cells of the root cortex (Elmerich and Newton, 2007; Kobayashi et al., 1995), whereas associative bacteria can establish a symbiotic relationship with plant cells, living inside the cells in specialized root structures called nodules (Gray and Smith, 2005).

PGPR stimulate plant growth directly or indirectly. Indirect stimulation occurs when PGPR prevent the deleterious effects of phytopathogenic microorganisms, while direct plant growth

stimulation occurs when PGPR synthesize some plant-growth substances or facilitate the uptake of certain nutrients. Direct stimulation involves nitrogen fixation (performed by diazotrophic organisms), solubilization of phosphate, production of phytohormones (such as auxin and cytokines), and production of siderophore that helps the transportation of ferric iron into plant cells (Ghosh et al., 2003).

While the rhizobacteria may benefit the plant, the presence of the plant clearly has a significant effect on rhizosphere bacterial community structure due to differences in root exudation, rhizodeposition in different root zones and the growth stage of the plant (Di Cello et al., 1997; Smalla et al., 2001; Dunfield and Germida, 2003; Houlden et al., 2008). Furthermore, other factors might influence the composition of the microbial community in the rhizosphere, such as cropping practices (like crop rotation) and seasonal change (Di Cello et al., 1997; Lupwayi et al., 1998; Smalla et al., 2001; Dunfield and Germida, 2003).

Canola is an option for ground cover plant for crop rotation and the production of oil and both as food and biodiesel (Schuchardt et al., 1998; Tomm, 2005). Among the available technologies that increase crop productivity and decrease the use of nitrogen fertilizers is the use of diazotrophs because of their abilities to promote

\* Corresponding author at: Departamento de Genética, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15.053, Prédio 43312, sala 207b, Porto Alegre, RS, CEP 91501-970, Brazil. Tel.: +55 51 3308 9813; fax: +55 51 3308 7311.

E-mail address: [lpassaglia@terra.com.br](mailto:lpassaglia@terra.com.br) (L.M.P. Passaglia).

plant growth. However, studies on the diversity of such microorganisms associated with canola crops are scarce (Germida et al., 1998; Siciliano et al., 1998; Dunfield and Germida, 2003). Likewise, studies towards the isolation of bacteria from canola crops and the evaluation of their potential to promote plant growth are also rare (Hong et al., 1991; Bertrand et al., 2001; Ghosh et al., 2003).

The purpose of this study was to isolate and identify cultivable bacteria associated with soil, rhizosphere and the roots of canola (*Brassica napus*) to verify if possible changes in the microbial communities are associated with some stages of crop rotation and canola growth. Moreover, we also evaluated the PGP abilities of bacterial isolates and selected some as potential PGPR for canola.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sample processing

Both field soil and rhizosphere samples from canola (variety Hyola 60) were collected in Vacaria, a canola producing region of the Rio Grande do Sul State, Brazil (28°30'43"S, 50°56'02"W). The soil type was classified as Hapludox (pH 6.0) with an organic matter content of 5.6% and a clay content of 64%. The samples were collected between March 2009 and January 2010 in five different periods in order to cover all the growth stages of canola. Samples were collected in the following periods: (1) March 2009, field soil used for soybean growth; (2) July 2009, field soil prepared for seeding canola (pre-seeding of canola); (3) September 2009, rhizospheric soil and roots of canola at the rosette stage; (4) October 2009, rhizospheric soil and roots of canola at the flowering stage; (5) January 2010, field soil after canola harvest (postharvest fall stubble stage). At growth stages at which plants were present (rosette and flowering stages), five plants with adhering soil at least 2 m away from each other were randomly taken and then mixed. Roots and soil were separated from the rest of the canola plants. At the crop rotation stages at which canola was not present (soil previously used with soybean, pre-seeding of canola and postharvest fall stubble), ten soil samples (0.5 kg) were randomly taken and bulked to obtain a representative composite sample.

### 2.2. Bacterial isolation

Isolation of putative diazotrophic bacteria was performed according to Döbereiner et al. (1995). Root-associated bacteria were isolated from canola roots, which were previously surface-sterilized (surface disinfection was done by washing the roots in running tap water, followed by 70% ethanol washing for 1 min, sodium hypochlorite solution (2%, v/v) washing for 2 min and five serial rinses in sterilized distilled water). Ten grams of roots were sliced into small segments and added to 90 ml of saline solution (0.85%), followed by shaking and incubation at 4 °C for 16 h to release the bacteria that were inside the plant material. Soil and epiphytic bacteria were isolated by vigorously shaking 10 g of soil dispersed in 90 ml of saline solution (0.85%), followed by shaking and incubation at 4 °C for 16 h. Aliquots of 0.1 ml of three-fold serial dilutions of all samples were inoculated, in triplicate, into vials containing 5 ml of semi-solid N-free medium, NfB, LGI or LGI-P (Döbereiner et al., 1995), to select bacteria that could grow in N-depleted culture conditions. Five days after incubation at 28 °C, the vials showing a veil-like pellicle near the surface of the medium were considered positive and used to reinoculate other vials containing the semi-solid N-free medium previously utilized. Cultures from the positive vials were subjected to further purification steps by streaking them onto specific agar plate containing 20 mg l<sup>-1</sup> of yeast extract and incubated at 28 °C for 2 days. One colony from each plate was randomly selected and grown in liquid LB medium

(Sambrook and Russel, 2001) at 28 °C under agitation (200 rpm). Strains were individually screened by Gram-staining reaction and conserved in 20% glycerol solution at -20 °C.

### 2.3. DNA isolation

For the DNA extraction, bacterial cells were rinsed with TES buffer (10 mM Tris pH 8.0, 25 mM EDTA, and 150 mM NaCl) and resuspended in TE buffer (10 mM Tris pH 8.0, 25 mM EDTA). Cell lyses took place in 20 mg ml<sup>-1</sup> lysozyme at 37 °C and 4% sodium dodecyl sulfate. Extractions with phenol/chloroform and precipitation in ethanol were performed as described (Sambrook and Russel, 2001). DNA quality and integrity was checked by electrophoresis on 0.8% agarose ethidium bromide gel. DNA was quantified by spectrophotometer.

### 2.4. PCR amplification and partial sequencing of the 16S rRNA gene

Fifty nanogram of bacterial DNA was used as template for PCR procedures. The selected primers U968 (5'-AACCGAAGAACCCTTAC-3') and L1401 (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3', Felske et al., 1997) were used to amplify a region of about 450 base pairs between nucleotides 968 and 1401 of the *Escherichia coli* 16S rRNA gene. This fragment includes variable regions V6–V8 (Brosius et al., 1978). The amplification of 16S rRNA gene portions from different bacterial samples was performed in a PCR Express (Thermo Hybaid) thermal cycler in 25 µl reaction volume containing 0.1 mM of each primer, 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 20 µM of each dNTP (Amersham Biosciences), and 1 U Taq DNA polymerase (recombinant, Invitrogen®). PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels in 1× TBE buffer with ethidium bromide and visualized with UV light.

Sequences of partial 16S rRNA genes were determined in both forward and reverse directions in a Megabace 1000 automatic 117 sequencer using the DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE 118 HealthCare). Sequence analyses were performed with BioEdit version 7.0.9.0 software (Hall, 1999) to verify their qualities and check for possible chimeric origins. DNA sequences were compared with those from the GenBank database using BLASTN algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). The nucleotide sequences of the 308 partial 16S rRNA gene segments determined in this study have been deposited in the GenBank database under accession numbers JN699229–JN699532.

### 2.5. Diversity index

Diversity index (*H'*, Shannon and Weaver, 1949) was estimated based on the total number of individuals and the number of genera identified for each sampled stage. The degree of association between *H'* and monthly precipitation or temperature variations was analyzed by Pearson's correlation method. Correlations were considered significant at *P* < 0.05.

### 2.6. Evaluation of plant growth promotion abilities

Analysis of indolic compounds and siderophore production, and phosphate solubilization activities were carried out for all bacterial isolates. *In vitro* biological nitrogen fixation assays were performed for seven selected isolates.

Bacterial indolic compounds production was measured according to Glickmann and Dessaux (1995) and Beneduzi et al. (2008). Production of siderophores was investigated by performing the universal assay (Schwyn and Neilands, 1987; Beneduzi et al., 2008) using King B medium. Isolates able to solubilize phosphates were identified by the method described by Sylvester-Bradley et al.

**Table 1**  
Percentage of bacterial genera and the Shannon diversity index ( $H'$ ) in each sampling site.

Bacterial genus	Sampling site <sup>a</sup>						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Achromobacter</i>	–	–	1.8	–	–	3.4	–
<i>Acinetobacter</i>	–	–	3.6	–	–	–	–
<i>Agrobacterium</i>	21	19.9	22.2	9.0	8.7	13.7	7.0
<i>Alcaligenes</i>	–	1.8	–	2.3	–	–	–
<i>Arenimonas</i>	–	–	1.8	–	–	–	–
<i>Azospirillum</i>	2.6	–	18.5	–	–	–	–
<i>Brevundimonas</i>	–	–	1.8	–	–	–	–
<i>Burkholderia</i>	10.5	27.7	14.8	20.5	2.2	13.7	9.2
<i>Chryseobacterium</i>	–	–	–	–	–	–	2.3
<i>Dyellamarensis</i>	–	–	–	–	2.2	–	–
<i>Enterobacter</i>	26.3	11.0	9.2	2.3	17.4	13.8	37.1
<i>Hafnia</i>	–	–	–	2.3	–	–	–
<i>Klebsiella</i>	2.6	–	–	–	45.7	40.0	6.9
<i>Mesorhizobium</i>	–	–	1.8	–	–	–	–
<i>Novosphingobium</i>	–	–	–	–	–	3.4	–
<i>Ochrobactrum</i>	5.3	–	–	–	–	–	–
<i>Pantoea</i>	10.5	9.2	1.8	15.9	2.2	3.4	–
<i>Pedobacter</i>	–	1.8	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas</i>	15.7	29.5	3.7	20.5	10.8	6.8	25.5
<i>Rahnella</i>	–	1.8	1.8	–	–	–	–
<i>Raoultella</i>	–	–	1.8	–	–	–	–
<i>Rhizobium</i>	5.3	3.6	3.7	11.4	4.3	–	9.3
<i>Serratia</i>	–	–	1.8	4.5	2.2	–	–
<i>Sphingomonas</i>	–	–	–	–	–	3.4	–
<i>Stenotrophomonas</i>	–	–	7.3	–	4.3	3.4	–
<i>Streptomyces</i>	–	–	–	–	–	3.4	–
<i>Xanthomonas</i>	–	–	1.8	11.4	–	–	–
$H'$	1.95	1.79	2.37	2.05	1.72	1.71	2.06

(–) = not identified.

<sup>a</sup> (1) Field soil used for soybean growth; (2) field soil prepared for seeding canola (pre-seeding of canola); (3) rhizospheric soil of canola at the rosette stage; (4) roots of canola at the rosette stage; (5) rhizospheric soil of canola at the flowering stage; (6) roots of canola at the flowering stage; and (7) field soil after canola harvest (postharvest fall stubble stage).

(1982) with the modifications implemented by Beneduzi et al. (2008).

The nitrogen-fixing ability of seven selected isolates (Nfb3SZ, LGI11, Nfb5B, LGI-P4SM, LGI3RM, LGI4RJ and LGI5M) was tested by using the acetylene reduction (ARA) assay, as described by Boddey (1987). Briefly, each bacterial isolate was inoculated into 10-ml vials containing 4 ml of the respective semi-solid N-free medium (Nfb, LGI or LGI-P). All isolates were incubated at 28 °C in the dark. After 72 h, the vials were sealed with rubber septa and 10% (v/v) of the air phase was replaced with acetylene (Burris, 1972). After the addition of acetylene, three vials of each isolate were incubated for 1 h at 28 °C and used to determine the amount of ethylene produced. Ethylene amounts were measured in a Clarus 600 gas chromatograph (Perkin Elmer) with a Col-Elite-Alumina column (50 m × 0.53 mm ID × 10 μm) and a flame ionization detector connected to a chromatography data computer system. Cells were collected and broken by lyses with 0.2M NaOH for 12 h at room temperature. Protein concentration in the resulting mixture was determined by the standard method (Bradford, 1976). *A. brasilense* Sp7 (ATCC29145) was used as the positive control.

### 2.7. In vivo experiment on plant growth promotion by native PGPR isolates

Seven isolates (Nfb3SZ, LGI11, Nfb5B, LGI-P4SM, LGI3RM, LGI4RJ, and LGI5M) with different PGP characteristics were selected for the greenhouse assays. These bacteria were grown in LB medium at 28 °C until they reached a final concentration of 10<sup>9</sup> cfu ml<sup>-1</sup>. Seeds of *B. napus* (variety Hyola 60) were surface sterilized in 70% ethanol for 2 min and 1.2% sodium hypochlorite for 10 min, and rinsed 10 times in sterile tap water. Canola seeds were then inoculated with each bacterial suspension for 30 min at 28 °C. Control seeds were treated in the same manner with uninoculated LB medium. Pots

(500 ml) filled with soil were seeded with five seeds per pot. The soil used contained 6.5 mg dm<sup>-3</sup> of phosphorous (P), 63 mg dm<sup>-3</sup> of potassium (K), 26% of clay and 1.7% of organic matter (OM), and presented a pH of 6.0. After emergence, seedlings were thinned for two plantlets per pot and were grown in a greenhouse with 12 h of light at 25 °C. The experiment was conducted in a completely randomized design, with four replicates. Plants were irrigated with distilled water without micro or macronutrients. In the control pots, nitrogen (as urea) was applied after the emergence of the first true leaves at a relative dose of 40 kg N ha<sup>-1</sup>. Thirty-six days after sprouting, plants were harvested and dried to a constant weight at 65 °C. Dry weight and total N, P and K concentrations were determined (Tedesco et al., 1995) and the data subjected to ANOVA and Scott–Knott tests ( $P=0.05$ ).

## 3. Results

### 3.1. Isolation and identification of PGP bacteria

A total of 308 bacterial strains were selectively isolated from samples of field soil that was used for soybean or canola growth and from samples of rhizospheric soil and roots of canola based on their growth in three selective semi-solid media without nitrogen: Nfb, LGI, and LGI-P. These media were used as a discriminating strategy to select putative nitrogen-fixing and plant growth-promoting rhizobacteria. From those 308 isolates, 235 were from field or rhizospheric soil and 73 were associated with canola roots. Samples were collected in five different periods to cover all growth stages of canola.

The partial sequencing of 16S rRNA gene of all isolates led to the classification of them in at least a specific genus, totaling 27 different genera (Table 1). Strains belonging to *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, and *Pseudomonas* genera were

**Table 2**  
Monthly precipitation and average temperature values at the sampling sites of canola growth and correlation analysis between the values and diversity indices ( $H'$ ).

	Sampling site <sup>a</sup>					$r$	$P$
	1	2	3	5	7		
Monthly precipitation (mm)	65.5	147.4	500.6	179.9	215.3	0.8127	0.0473
Monthly average temperature (°C)	18.9	8.9	12.9	15.4	19.8	0.1101	0.4300

<sup>a</sup> (1) Field soil used for soybean growth; (2) field soil prepared for seeding canola (pre-seeding of canola); (3) rhizospheric soil of canola at the rosette stage; (5) rhizospheric soil of canola at the flowering stage; and (7) field soil after canola harvest (postharvest fall stubble stage). Correlation was considered significant at  $P < 0.05$ .

the most abundant among all isolates. Despite being one of the five most abundant genera among all isolates, most of the strains identified as *Klebsiella* were isolated from rhizospheric soil and roots of canola at the flowering stage. Moreover, strains belonging to this genus were not detected in the soil prepared for seeding canola (pre-seeding of canola), and rhizospheric soil and roots of canola at the rosette stage samples.

Strains belonging to the *Pantoea* and *Rhizobium* genera were also found in several sampled sites, with the exception of field soil after canola harvest (postharvest fall stubble stage) and rhizospheric soil of canola at the flowering stage, respectively.

The rhizospheric soil of canola at the rosette stage presented the highest diversity ( $H' = 2.37$ ), while other samples presented similar diversity ranging from  $H' = 1.71$  to  $H' = 2.06$  (Table 1). Some genera were found in only one sampled site, as was observed for isolates belonging to the *Ochrobactrum* genus that were isolated only from field soil used for soybean growth. Isolates belonging to the *Pedobacter* genus were isolated only from field soil prepared for seeding canola; those belonging to the *Hafnia* genus were isolated only from the roots of canola at the rosette stage; strains from the *Dyella* genus were isolated only from rhizospheric soil of canola at the flowering stage; and those belonging to the *Chryseobacterium* genus were isolated only from field soil after canola harvest. Isolates belonging to the *Acinetobacter*, *Arenimonas*, *Brevundimonas*, *Mesorhizobium*, and *Raoultella* genera were isolated only from rhizospheric soil of canola at the rosette stage. Similarly, isolates belonging to the *Novosphingobium*, *Sphingomonas*, and *Streptomyces* genera were isolated only from the roots of canola at the flowering stage.

To investigate a possible correlation between diversity and some abiotic parameters, the diversity indices were subjected to a correlation analysis with monthly precipitation and temperature variations (Table 2). These analyses showed a significant correlation between bacterial diversity and monthly rainfall ( $r = 0.8127$ ;  $P = 0.0473$ ).

### 3.2. PGP traits of bacterial isolates

Most of the isolates (302) were able to produce indolic compounds (IC). The production of these compounds ranged from 0.1 to 454  $\mu\text{g IC ml}^{-1}$  and 78 isolates produced more than 100  $\mu\text{g IC ml}^{-1}$

(Table 3). Isolates identified as belonging to the *Agrobacterium*, *Burkholderia*, and *Pseudomonas* genera were among those with the highest IC production ability. Only six strains did not produce IC, these being identified as isolates belonging to the *Burkholderia* (4), *Agrobacterium* (1), and *Streptomyces* (1) genera.

Ninety-seven from the 308 isolates were able to solubilize phosphate. Isolates belonging to the *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, and *Rhizobium* genera were among those identified as good phosphate-solubilizing strains. The soil prepared for seeding canola (pre-seeding of canola) presented the highest number of phosphate-solubilizing strains compared to the other sites (Table 3).

One hundred and eight from the 308 isolates were able to produce siderophores. Bacteria identified as belonging to the *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Novosphingobium*, and *Pseudomonas* genera were among the siderophore-producing strains. The soil prepared for seeding canola also presented the highest number of siderophore-producing strains compared to the other sites.

Analysis of the isolates presenting more than one PGP characteristic showed that 52 were able to produce indolic compounds and siderophores, 48 produced siderophores and solubilized phosphates, 32 produced indolic compounds and solubilized phosphates, and 18 could produce indolic compounds, siderophores and solubilize phosphates.

Isolates Nfb3SZ (*Achromobacter*), LG111, LG1-P4SM and LG14RJ (*Klebsiella*), Nfb5B (*Pseudomonas*), LG13RM (*Pantoea*), and LG15M (*Chryseobacterium*) were tested for their nitrogen-fixing ability using the ARA assay, as the amounts of ethylene from acetylene reduction directly correlate with nitrogenase activity under control conditions (Palus et al., 1996). The isolates were chosen based on the ability to produce high levels of auxin and/or other functional assays for plant growth promotion: *Pseudomonas* (Nfb5B) produced siderophores and more than 100  $\mu\text{g IC ml}^{-1}$ , *Klebsiella* (LG1-P4SM) solubilized phosphates, *Pantoea* (LG13RM) solubilized phosphates and produced more than 100  $\mu\text{g IC ml}^{-1}$ , *Klebsiella* (LG14RJ) produced siderophores and solubilized phosphates, *Chryseobacterium* (LG15M) produced more than 100  $\mu\text{g IC ml}^{-1}$ , *Klebsiella* (LG111) produced siderophores, and *Achromobacter* (Nfb3SZ) displayed none of the PGP characteristics evaluated. The values of nitrogenase activity as well as other PGP abilities evaluated are shown in Table 4.

**Table 3**  
Number of isolates, siderophore production, phosphate solubilization, and indolic compound (IC) production by bacterial isolates at each sampled site.

Sampled site	Source	Number of isolates	Siderophore producers	Phosphate solubilizers	IC producers ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )		
					0.1–50	50–100	>100
Field soil used with soybean	Soil	38	21	4	13	7	16
Pre-seeding of canola	Soil	54	36	26	20	14	20
Canola at the rosette stage	Soil	54	4	8	46	3	4
	Roots	44	6	15	23	8	12
Canola at the flowering stage	Soil	46	19	19	30	9	7
	Roots	29	8	11	20	5	3
Postharvest fall stubble stage	Soil	43	14	14	23	3	16
Total		308	108	97	175	49	78

**Table 4**  
Plant growth-promoting abilities of selected isolates.

Isolates <sup>a</sup>	IC production ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Siderophore production	Phosphate solubilization	Acetylene reduction activity (nmol $\text{C}_2\text{H}_4$ mg protein $\text{h}^{-1}$ )
Nfb3SZ	22.8	–	–	ND
LGI11	19.3	+	–	35.0
Nfb5B	345.7	+	–	3.8
LGI-P4SM	8.7	–	+	19.6
LGI3RM	176.3	–	+	7.1
LGI4RJ	49.3	+	+	131.6
LGI5M	87.1	–	–	ND
<i>A. brasilense</i>	ND	ND	ND	141.1

ND, not determined or not detected.

(+), positive for siderophore production or phosphate solubilization.

(–), negative for siderophore production or phosphate solubilization.

<sup>a</sup> Nfb3SZ, *Achromobacter*; LGI11, *Klebsiella*; Nfb5B, *Pseudomonas*; LGI-P4SM, *Klebsiella*; LGI3RM, *Pantoea*; LGI4RJ, *Klebsiella*, and LGI5M, *Chryseobacterium*.

### 3.3. Growth-promoting effect of bacterial treatment on canola

To test the effective contribution to plant growth of some strains isolated, isolates Nfb3SZ, LGI11, Nfb5B, LGI-P4SM, LGI3RM, LGI4RJ, and LGI5M identified as *Achromobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Pantoea* sp., *Klebsiella* sp. and *Chryseobacterium* sp., respectively, were chosen for *in vivo* greenhouse experiments (Table 5). As already mentioned, these strains presented different PGP abilities (Table 4). Under greenhouse conditions, the inoculation of canola with Nfb3SZ, LGI-P4SM, LGI3RM, LGI4RJ, and LGI5M strains showed a significant increase in the dry matter of canola plants when compared to the control plants both with and without a nitrogen source (Table 5).

Canola plants inoculated with strain LGI4RJ showed a significant increase in the amount of accumulated N in the shoot when compared to control plants that did not receive nitrogen. However, this increase was not as high as the control plants that received nitrogen (Table 5). Canola plants inoculated with strains Nfb3SZ, LGI-P4SM, LGI3RM, LGI4RJ, and LGI5M showed a significant increase in the amount of accumulated K and P in the shoots when compared to the uninoculated control plants (both with and without a nitrogen source, Table 5).

## 4. Discussion

### 4.1. Diversity of PGP bacteria

The occurrence and distribution of bacteria in the soil and rhizosphere are reported to be influenced by many factors, including the host plant, the stage of plant growth and cropping practices (such as tillage and crop rotation) (Smalla et al., 2001; Houlden et al., 2008). In this study, cultivable bacteria associated with soil, rhizosphere and the roots of canola (*B. napus*) were isolated based on their growth on three selective semi-solid media without nitrogen. The identification of 308 bacterial isolates was used to verify if

possible changes in the microbial communities were associated with some stages of crop rotation and canola growth. Twenty-seven different bacterial genera were identified. To date, few studies have been performed to study the bacterial diversity associated to canola rhizoplane. Nevertheless, Germida et al. (1998) showed that the composition of the bacterial community of the canola rhizoplane was not dominated by any particular group of bacteria. In our work, no dominant group of bacteria was identified as well, although some genera were more abundant. As shown in Table 1, the *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, and *Pseudomonas* genera were the most abundant among all the bacterial genera identified in all the sampling sites. Bacteria belonging to these genera have also been isolated in previous studies. Siciliano and Germida (1999), for example, identified a large number of *Pseudomonas* in canola crops, while Misko and Germida (2002) found that the most commonly occurring genus (35%) of the identified canola root-associated bacterial population was also *Pseudomonas*; other commonly occurring genera were *Stenotrophomonas*, *Flavobacterium*, and *Arthrobacter*. In the present study, strains belonging to the *Stenotrophomonas* genus were identified only in the rhizospheric soil of canola at the rosette stage and in the rhizospheric soil and roots of canola at the flowering stage. Bertrand et al. (2001), using Nfb medium, also found that the *Pseudomonas* genus was one of the most abundant in the bacterial communities isolated from the endorhizosphere and rhizoplane of canola plants, although strains belonging to *Xanthomonas*, *Escherichia*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Agrobacterium*, and *Rhizobium* genera were also identified. These genera were present in our samples as well (Table 1).

Generally, our results suggested that bacteria belonging to the Enterobacteriaceae family were the predominant canola root-associated bacteria. Enterobacteria have been found to be associated with endophytic bacteria in a large number of plant species, such as citrus (Araújo et al., 2001), maize (Hinton and Bacon, 1995; McInroy and Kloepper, 1995), rice (Engelhard et al., 2000; Gyaneshwar et al., 2001; Rosenblueth et al., 2004; Verma

**Table 5**  
Results of *in vivo* experiments with selected isolates in the growth promotion of canola plants.

Isolates <sup>a</sup>	Shoot dry matter (mg)	Total shoot nitrogen (%)	Total shoot potassium (%)	Total shoot phosphorus (%)
Nfb3SZ	160 a	4.5 c	6.2 a	0.3 a
LGI11	117 b	4.5 c	4.7 b	0.2 b
Nfb5B	100 b	4.1 c	4.1 b	0.2 b
LGI-P4SM	172 a	4.4 c	6.4 a	0.4 a
LGI3RM	155 a	4.5 c	6.2 a	0.3 a
LGI4RJ	166 a	5.0 b	6.4 a	0.3 a
LGI5M	175 a	4.0 c	5.8 a	0.4 a
Uninoculated control N –	79 b	4.7 c	3.1 b	0.2 b
Uninoculated control N +	113 b	5.8 a	4.3 b	0.2 b

Values in the same column followed by the same letter did not differ significantly at  $P=0.05$  (ANOVA and Scott–Knott tests).

<sup>a</sup> Nfb3SZ, *Achromobacter*; LGI11, *Klebsiella*; Nfb5B, *Pseudomonas*; LGI-P4SM, *Klebsiella*; LGI3RM, *Pantoea*; LGI4RJ, *Klebsiella*, and LGI5M, *Chryseobacterium*.



et al., 2004), sweet potato (Asis and Adachi, 2003; Reiter et al., 2003), soybean (Kuklinsky-Sobral et al., 2004), and wheat (Iniguez et al., 2004).

Earlier studies in which microbial communities were examined throughout a field season have often indicated that there is seasonal variability (Di Cello et al., 1997; Grayston et al., 2001; Smalla et al., 2001; Dunfield and Germida, 2003; Houlden et al., 2008). The results of the present study also showed that the microbial community structure was influenced by seasonal variation, as indicated by different genera identified at different stages of canola development. When the bacterial communities isolated from rhizospheric soil and roots of canola at the same stage of development were compared, we found that some genera (*Acinetobacter*, *Arenimonas*, *Brevundimonas*, *Mesorhizobium*, and *Raoultella*) were present only in the rhizospheric soil of canola at the rosette stage, whereas strains belonging to the *Hafnia* genus were present only in the canola roots at the same stage. The rhizospheric soil of canola at the flowering stage was the only sampled site that presented strains belonging to the *Dyella* genus, whereas the canola roots at this same stage presented strains belonging to *Novosphingobium*, *Sphingomonas*, and *Streptomyces* genera. Germida et al. (1998) indicated that plants play a large role in controlling the diversity of root-associated bacteria. Thus, it is suggested that plants have a major role in determining the composition of the rhizosphere and endo-rhizosphere bacterial communities among root-associated bacteria.

In canola rosette stage samples, the diversity of the bacteria associated with the rhizosphere was higher ( $H' = 2.37$ ) than those associated with the roots of canola ( $H' = 2.05$ ). This is consistent with the results of Germida et al. (1998), who analyzed root-associated bacteria in field-grown canola and wheat and found that differences in the endophytic community compositions between field sites were lower than those observed for the rhizosphere communities.

The rhizospheric soil of canola at the rosette stage showed the highest number of genera (17) when compared to the other samples. The composition of the microbial community in the rhizosphere also changes with time in response to changes in root exudation patterns that vary during the life cycle and seasonal response of plants (Dunfield and Germida, 2003). The rhizodeposition of nutrients by plant roots supports increased microbial growth in comparison with that of the bulk soil communities and results from the enrichment of microorganisms from the bulk soil, a phenomenon often referred to as the 'rhizosphere effect' (Houlden et al., 2008). However, the next stage sampled – the rhizospheric soil of canola at the flowering stage – presented a lower diversity of bacterial genera (10). This observation contradicts that of Smalla et al. (2001), who compared the relative abundance of 16S rDNA targets and found that enrichment of bacterial populations associated with canola was most pronounced when canola was at the flowering stage.

According to Strom (1985), deliberate control of the composting process at the microbial level involves four interrelated factors, i.e., metabolic heat generation, temperature, ventilation and moisture content. The levels of humidity and temperature in the sampled periods were recorded and used to establish a correlation with bacterial diversity. Our results evidenced a significant correlation between bacterial diversity and monthly rainfall, whereas no significant correlation was observed between bacterial diversity and temperature variations (Table 2). In the highest precipitation period (September, 2009), bacterial diversity was also higher ( $H' = 2.37$ ). Although we had not quantitatively determined the soil humidity at the time of sampling, we can infer that soil moisture was higher in the periods of the highest rainfall. It is known that the biomass of microorganisms in the soil varies depending on various factors including rainfall (Wardle, 1998). Wylie (1994) showed that the

distribution of rainfall and soil moisture were the main factors regulating soil microorganism and Nogueira et al. (2006) reported that the soil that presented a higher microbial activity also exhibited a higher water content.

Another factor influencing bacterial diversity is temperature (Strom, 1985; Primavesi, 2002). Maintenance of temperature in a desirable range is a critical element of control, since temperature both reflects prior microbial activity and strongly determines the current rate of activity (Strom, 1985). For most bacteria present in an environment, the ideal temperature is in the range of 25–32 °C, as this is the optimal range for most metabolic activities (Primavesi, 2002). In this work, no correlation between temperature and bacterial diversity was found in the different sampling periods. However, the range of temperature between the sampled periods was not pronounced (around 10–20 °C), which might not have been enough to influence bacterial diversity.

#### 4.2. PGP traits of bacterial isolates

Associative and free-living microorganisms may contribute to the nutrition of plants through a variety of mechanisms, including direct effects on nutrient availability, providing the plant with plant growth-promoting substances that are synthesized by the bacterium or facilitating the uptake of certain plant nutrients from the environment (Ahmad et al., 2006; Raaijmakers et al., 2009). A particular bacterium may affect plant growth using any one, or more, of these mechanisms. Moreover, a bacterium may provide different benefits at various times during the life cycle of the plant (Glick, 2005). Three plant growth-promoting characteristics were evaluated for all isolates in this study: the abilities to produce siderophores and indolic compounds (IC), and to solubilize phosphates.

The production of indolic compounds (phytohormones) is usually used to explain the various direct effects of plant growth-promoting rhizobacteria on plants (Patten and Glick, 1996; Garcia de Salamone et al., 2005). Indole-3-acetic acid (IAA) is an important phytohormone that coordinates different developmental processes in plants and its production is also widespread among plant-associated bacteria and plays a critical role in plant growth and development (Costacurta and Vanderleyden, 1995; Khalid et al., 2004). The majority of bacterial strains isolated in this report showed the ability to synthesize IC in the presence of the precursor L-tryptophan. These strains varied in their potential to produce IC, and even strains belonging to the same genera such as *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, and *Enterobacter* produced different amounts of IC in liquid culture medium. Mirza et al. (2001) showed that IC production by PGPR can vary among different species and strains, and that it is also influenced by culture condition, growth stage and substrate availability. Such findings may have a direct practical application, although the intrinsic ability of bacteria to produce IC in the rhizosphere depends on the availability of precursors and the uptake of microbial IC by plants (Arshad and Frankenberger, 1993).

Another important PGPR trait that may indirectly influence plant growth is the production of siderophores. Siderophores bind to the available form of iron ( $Fe^{3+}$ ) in the rhizosphere, thus making it unavailable to the phytopathogens and protecting plant health. In the present investigation, 108 isolates of 308 (35%) displayed the ability to produce siderophores (Table 3). Whether these siderophore complexes can significantly contribute to the iron requirements of the plant, however, remains equivocal (Beattie, 2006). While some believe that the contribution of these siderophores to the overall iron requirements of plants is small (Glick, 1995), others suggest an important role especially in calcareous soils (Masalha et al., 2000). However, potential PGPR for

biocontrol are selected on the basis of their siderophore or antibiotic producing abilities *in vitro* (Bashan et al., 1993).

In the present study, 97 isolates (31.5%) were able to solubilize phosphate. de Freitas et al. (1997) isolated 111 strains from the rhizospheric soil of wheat, pea, canola, barley and corn plants. A collection of nine PGPR was screened for *in vitro* P-solubilization ability and seven of those isolates were phosphate-solubilizing bacteria (PSB). They performed *in vivo* experiments on canola growth following P-solubilizing rhizobacteria inoculation. The results demonstrated the potential use of these P-solubilizing rhizobacteria as inoculants for canola, but indicated that P-solubilization was not the main mechanism responsible for positive growth. It has been shown that the beneficial effects of PSB on plant growth can vary significantly depending on environmental and soil conditions, bacterial strain and host plant (Şahin et al., 2004; Çakmakçı et al., 2006).

Among all the bacteria isolated from roots and the rhizosphere of canola, isolates belonging to the *Enterobacter* genus presented the three PGP characteristics evaluated at the same time. Of the 18 isolates exhibiting the three traits, 11 were identified as belonging to this genus.

#### 4.3. Growth-promoting effect of bacterial treatment on canola

Considering the nitrogen-fixing ability, the isolate LGI4RJ (identified as *Klebsiella* sp.) was the only one to present the value of acetylene reduction activity closest to that of the control *A. brasilense* (Table 5). Consequently, only canola plants inoculated with the LGI4RJ strain had nitrogen contents in the shoot significantly higher than that of control plants that did not receive nitrogen, although this value was lower than the value of N content of control plants that received nitrogen. This suggests that a greater accumulation of nitrogen in the shoot of canola plants could be linked to the N-fixing ability of the LGI4RJ strain. N-fixing bacteria are important for plant nutrition by providing N to the plants and playing a significant role as PGPR in the biofertilization of crops. Biological nitrogen fixation provides a major source of nitrogen for plants as part of environmental friendly agricultural practices (Çakmakçı et al., 2006). Moreover, plants that were inoculated with the LGI4RJ isolate also displayed a greater shoot dry mass weight than the control plants that received N. This suggests that the nitrogen-fixing ability of this isolate was not the only PGP ability that contributed to the increased plant dry mass. As shown in Table 4, this isolate also produces siderophores and indolic compounds ( $49.3 \mu\text{g IC ml}^{-1}$ ), and can also solubilize phosphate.

Besides the LGI4RJ isolate, two other of the seven isolates presented the characteristic of phosphate solubilization (LGI3RM and LGI-P4SM, identified as *Pantoea* sp. and *Klebsiella* sp., respectively) (Table 4). Plants inoculated with these three isolates showed a higher percentage of P in their shoots and an increase in their dry mass (Table 5). These results may be due to the ability of these isolates to solubilize phosphate although we cannot claim this as being the sole or primary mechanism responsible for the positive growth response. de Freitas et al. (1997) also demonstrated the potential use of P-solubilizing rhizobacteria as inoculants for canola, but indicated that P-solubilization was not the main mechanism responsible for the positive growth response.

Plants inoculated with the LGI5M isolate (identified as *Chryseobacterium* sp.) showed a high level of P in their shoots, although this isolate was not able to solubilize phosphate in our *in vitro* assay. This result could be explained by the high production of IC ( $87.1 \mu\text{g IC ml}^{-1}$ ) by LGI5M. High levels of bacterial indolic compounds stimulate the formation of lateral and adventitious roots (Patten and Glick, 1996), which could increase the absorption of nutrients including phosphate. A similar result was obtained

with plants inoculated with the Nfb3SZ isolate (identified as *Achromobacter* sp.). However, in this case, the Nfb3SZ strain, besides not being able to solubilize phosphate *in vitro*, also presented a low production of IC ( $22.8 \mu\text{g IC ml}^{-1}$ ). As plants inoculated with the Nfb3SZ strain also showed an increase in their dry mass, we inferred that the positive results obtained by the inoculation with this isolate could be due to other PGP characteristics that were not evaluated in the present study.

Isolated LGI1 (identified as *Klebsiella* sp.) showed siderophore production as the only PGP feature evaluated in this work. As a result, plants that were inoculated with this strain presented low dry matter and lower percentages of N, P, and K in their shoots.

Lastly, plants inoculated with the LGI11 isolate (identified as *Klebsiella* sp.) presented low plant dry mass and low percentages of N, P, and K in their shoots. LGI11 produced siderophores and also gave the highest amount of indolic compounds produced among all the isolates evaluated in our *in vivo* assay ( $345.7 \mu\text{g IC ml}^{-1}$ ). According to Jaillais and Chory (2010), auxin acts as a molecule integrating the activities of multiple phytohormones to control plant growth in response to the environment and high levels of this hormone could act negatively at the first stages of plant development. The total amount of growth regulators produced by this isolate is unknown, but since auxin has a crucial role in the hormonal signaling network, we postulate that the negative results obtained with this isolate occurred due to the large amount of indolic compounds produced.

## 5. Conclusions

The results presented in this work indicated the presence of a diverse population of plant growth-promoting bacteria associated to the canola rhizosphere and inside roots at different stages of crop rotation. They also showed that the microbial community structure was influenced by seasonal variation, as indicated by the different genera identified at the different stages of canola development and that there was a relationship between bacterial diversity and the amount of monthly rainfall. *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter* and *Pseudomonas* were the most abundant among all the bacterial genera identified in all the sampling sites analyzed. Several of these bacteria could produce indolic compounds and siderophores, solubilize phosphate, and some could also fix nitrogen. Moreover, some of the isolates tested for the growth-promoting effects of bacterial treatment on canola were able to promote plant growth. The presence of specific PGP traits suggests that these particular organisms can promote plant growth by more than one mechanism and that some of these strains should be tested in further field inoculation experiments.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Ricardo Lima de Castro and Gian-dro Duarte Teixeira from Fepagro-Vacaria for the canola samples. This work was financed by a grant and fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) da Fixação Biológica do Nitrogênio (Brazil).

## References

- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S., 2006. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 2, 173–181.
- Araújo, W.L., Maccheroni Jr., W., Aguilar-Vildoso, C.I., Barroso, P.A.V., Saridakis, H.O., Azevedo, J.L., 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* 47, 229–236.

- Arshad, M., Frankenberger Jr., W.T., 1993. Microbial production of plant growth regulators. In: Blaine, F., Metting Jr. (Eds.), *Soil Microbial Ecology*. Marcel and Dekker Inc., New York, pp. 307–347.
- Asis, C.A., Adachi, K., 2003. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweet potato stem in Japan. *Let. Appl. Microbiol.* 38, 19–23.
- Bashan, Y., Holguin, G., Lifshitz, R., 1993. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. In: Bourne, C.M. (Ed.), *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA, pp. 331–345.
- Beattie, G.A., 2006. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances. In: Gnanamanickam, S.S. (Ed.), *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Netherlands, pp. 1–56.
- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L.K., Bodanese-Zanettini, M.H., Passaglia, L.M.P., 2008. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Appl. Soil Ecol.* 39, 311–320.
- Bertrand, H., Nalin, R., Bally, R., Cleyet-Marel, J.C., 2001. Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biol. Fertil. Soil* 33, 152–156.
- Boddey, R.M., 1987. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *Crit. Rev. Plant Sci.* 6, 209–266.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., Noller, H.F., 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 4801–4805.
- Burris, R.H., 1972. Nitrogen fixation assay methods and techniques. *Methods Enzymol.* 24, 415–431.
- Çakmakçı, R., Dönmez, F., Aydın, A., Şahin, F., 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1482–1487.
- Costacurta, A., Vanderleyden, J., 1995. Synthesis of phytohormones by plant associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21, 1–18.
- de Freitas, J.R., Banerjee, M.R., Germida, J.J., 1997. Phosphate-solubilizing bacteria enhance the growth and yield but not phosphate uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soil* 24, 358–364.
- Di Cello, F., Bevivino, L., Chiarini, R., Fani, R., Paffetti, D., Tabacchioni, S., Dalmastri, C., 1997. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4485–4493.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. *Embrapa-SPI, Brasília*.
- Dunfield, K.E., Germida, J.J., 2003. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field grown genetically modified canola (*Brassica napus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7310–7318.
- Elmerich, C., Newton, W.E., 2007. *Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations*. Springer, Netherlands.
- Engelhard, M., Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., 2000. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environ. Microbiol.* 2, 131–141.
- Felske, A., Rheims, H., Wokerink, A., Stackebrandt, E., Akkermans, D.L., 1997. Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grasslands soils. *Microbiology* 143, 2983–2989.
- Garcia de Salamone, I.E., Hynes, R.K., Nelson, L.M., 2005. Role of cytokinins in plant growth promotion by rhizosphere bacteria. In: Siddiqui, A. (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, Netherlands, pp. 173–195.
- Germida, J.J., Siciliano, S.D., de Freitas, J.R., Seib, A.M., 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 43–50.
- Ghosh, D., Bal, B., Kashyap, V.K., Pal, S., 2003. Molecular phylogenetic exploration of bacteria diversity in a Bakreshwar (India) hot spring and culture of Shewanella-related thermophiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4332–4336.
- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41, 109–117.
- Glick, B.R., 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett.* 251, 1–7.
- Glickmann, E., Dessaux, Y., 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski Reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 793–796.
- Gray, E.J., Smith, D.L., 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37, 395–412.
- Grayston, S.J., Griffith, G.S., Mawdsley, J.L., Campbell, C.D., Bardgett, R.D., 2001. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 33, 533–551.
- Gyaneshwar, P., James, E.K., Mathan, N., Reddy, P.M., Reinhold-Hurek, B., Ladha, J.K., 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 183, 2634–2645.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hinton, D.M., Bacon, C.W., 1995. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia* 129, 117–125.
- Hong, Y., Glick, B.R., Pasternak, J.J., 1991. Plant-microbial interaction under gnotobiotic conditions: a scanning electron microscope study. *Curr. Microbiol.* 23, 111–114.
- Houlden, A., Timms-Wilson, T.M., Day, M.J., Bailey, M.J., 2008. Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 193–201.
- Iniguez, A.L., Dong, Y., Triplett, E.W., 2004. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 1078–1085.
- Jaillais, Y., Chory, J., 2010. Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 642–645.
- Khalid, A., Tahir, S., Arshad, M., Zahir, Z.A., 2004. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere vs. non-rhizosphere soil. *Aust. J. Soil Res.* 42, 921–926.
- Kobayashi, M., Suzuki, T., Fujita, T., Masuda, M., Shimizu, S., 1995. Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 714–718.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araujo, W.L., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L., 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 6, 1244–1251.
- Lupwayi, N.Z., Rice, W.A., Clayton, G.W., 1998. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1733–1741.
- Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, Ö., Mengel, K., 2000. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol. Fertil. Soil* 30, 433–439.
- McInroy, J.A., Kloepper, J.W., 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* 173, 337–342.
- Mirza, M.S., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., Malik, K.A., 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant Soil* 237, 47–54.
- Misko, A.L., Germida, J.J., 2002. Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of field-grown canola. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 399–407.
- Nogueira, M.A., Albino, U.B., Brandão-Junior, O., Braun, G., Cruz, M.F., Dias, B.A., Duarte, R.T.D., Gioppo, N.M.R., Menna, P., Orlandi, J.M., Raimam, M.P., Rampazzo, L.G.L., Santos, M.A., Silva, M.E.Z., Vieira, F.P., Torezan, J.M.D., Hungria, M., Andrade, G., 2006. Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. *Agric. Ecosyst. Environ.* 115, 237–247.
- Palus, J.A., Borneman, J., Ludden, P.W., Triplett, E.W., 1996. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Illis and Doebley. *Plant Soil* 186, 135–142.
- Patten, C., Glick, B., 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42, 207–220.
- Primavesi, A., 2002. *Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais*. Nobel, São Paulo.
- Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C., Moëgne-Loccoz, Y., 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soil borne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* 321, 341–361.
- Reiter, B., Bürgmann, H., Burg, K., Sessitsch, A., 2003. Endophytic nifH gene diversity in African sweet potato. *Can. J. Microbiol.* 49, 549–555.
- Rosenblueth, M., Martinez, L., Silva, J., Martinez-Romero, E., 2004. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 27–35.
- Şahin, F., Çakmakçı, R., Kantar, F., 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant Soil* 265, 123–129.
- Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York.
- Schuchardt, U., Sercheli, R., Vargas, R.M., 1998. Transesterification of vegetable oils: a review. *J. Braz. Chem. Soc.* 9, 199–210.
- Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 47–56.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana.
- Siciliano, S.D., Theoret, C.M., de Freitas, J.R., Hucl, P.J., 1998. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Can. J. Microbiol.* 44, 844–851.
- Siciliano, S.D., Germida, J.J., 1999. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29, 263–272.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, R., Heuer, H., Berg, G., 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4742–4751.
- Strom, P.F., 1985. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 899–905.
- Sylvester-Bradley, R., Asakawa, N., La Torraca, S., Magalhães, F.M.M., Oliveira, L., Pereira, R.M., 1982. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazônica* 12, 15–22.

- Tedesco, J.M., Gianelo, C., Bissani, C.A., Bohnen, H., Volkweiss, S.J., 1995. Análise de solo, plantas e outros materiais, second ed. UFRGS, Porto Alegre.
- Tomm, G.O., 2005. Situação em 2005 e perspectivas da cultura de canola no Brasil e em países vizinhos. Passo Fundo, Embrapa Trigo.
- Verma, S.C., Singh, A., Chowdhury, S.P., Tripathi, A.K., 2004. Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. Biotechnol. Lett. 26, 425–429.
- Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255, 571–586.
- Wardle, D.A., 1998. Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: a global-scale synthesis. Soil Biol. Biochem. 30, 1627–1637.
- Wylie, P., 1994. Indicators of sustainable cropping systems. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.S.S.R., Grace, P.R. (Eds.), Soil Biota-management in Sustainable Farming Systems. CSIRO, Australia, pp. 224–229.

### **3.2 Parte II - Avaliação da comunidade bacteriana associada ao solo rizosférico e raízes de canola através de análises de microarranjos**

### **3.2.1 Metodologia empregada**

#### **3.2.1.1 Escolha das sequências de oligonucleotídeos para o microarranjo**

A fim de se obter grande parte das sequências de genes *nifH* disponíveis de bactérias cultiváveis e identificadas foi realizada uma busca em diversos bancos de dados por sequências desse gene, tanto sequências inteiras como parciais. Quando sequências, totais ou parciais, dos genes *nifD*, *nifK* e 16S rRNA desses organismos estavam também disponíveis, visto que para muitas dessas bactérias já existem dados de sequenciamento genômico completo, essas foram igualmente incluídas. Ainda foram utilizadas sequências do gene 16S rRNA de bactérias que, mesmo não possuindo a sequência do gene *nifH* disponível, eram sabidamente diazotróficas. Com base nos alinhamentos, realizados com o programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1997), foram identificadas, visualmente, regiões pouco conservadas entre as sequências, as quais foram consideradas específicas para determinado gênero bacteriano. Dessas regiões pouco conservadas foram escolhidas sequências de 25 nucleotídeos de extensão. A especificidade de cada um dos oligonucleotídeos com a sequência original e com outras que poderiam apresentar hibridização cruzada foi checada através do programa BLASTN do GenBank (disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### **3.2.1.2 Extração de DNA de culturas puras, amplificação do gene 16S rRNA e extração de DNA de bactérias endofíticas de raízes de canola**

O DNA genômico de culturas puras das bactérias *Agrobacterium* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhizobium* sp., e *Sphingobacterium* sp. foi extraído segundo os protocolos estabelecidos por Sambrook e Russel (2001), com modificações. Cada isolado foi inoculado em frascos contendo 20 mL de meio líquido apropriado e incubado a 30°C por 18-24 horas sob agitação de 100 rpm em um aparelho de agitação orbital. Cerca de 2 ml da cultura foram centrifugados a 15.500 g por 1 minuto, para a obtenção do precipitado de células. Esse foi suspenso em 700 µL de tampão TES (Tris 10mM, EDTA 1mM, NaCl 150mM, pH 8,0) e centrifugado por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em 500 µL de solução tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH=8,0). Seguiu-se a adição de 25 µL de lisozima (20 mg ml<sup>-1</sup>) e 15 µL de RNase (10 mg ml<sup>-1</sup>) e incubação a 37° por 1 hora e em seguida a 60° por 15 minutos. As amostras foram esfriadas à temperatura ambiente e a estas foram adicionados 108 µl de uma solução 20% de dodecil sulfato de sódio e 19 µL de proteinase K (20 mg ml<sup>-1</sup>), e incubadas a 56°C por 15 minutos. Após o tempo de incubação, foi adicionado 1 volume

de fenol, misturado e centrifugado por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o procedimento repetido com fenol, duas vezes com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e uma vez com clorofórmio/álcool isoamílico. O sobrenadante foi retirado para um tubo novo e adicionado 0,7 volume de isopropanol e centrifugado por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 70%, seco em temperatura ambiente e suspenso em 50 µL de TE. Para se verificar a eficiência e quantificação da extração, amostras de DNA foram analisadas em gel de agarose 0,8% em tampão TEB 1 X.

De posse dos DNAs genômicos das culturas puras, a amplificação de sequências quase totais do gene 16S rRNA foi realizada utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' (Rivas et al., 2005). As posições correspondentes para esses oligonucleotídeos na sequência da subunidade menor do ribossomo do genoma de *Escherichia coli* são: 8-27 e 1498-1522, respectivamente. As reações de amplificação foram realizadas em um volume de 25 µL, contendo 50 ng de DNA molde, 1 U de Taq DNA polymerase (Life Technologies), tampão de reação 1 X Taq DNA polimerase, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM dNTPs (Life Technologies) e 10 pmoles de cada iniciador. As reações foram realizadas da seguinte maneira: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 63°C por 1 min, e extensão a 72°C por 1,5 min, e um ciclo final de extensão a 72°C por 8 min. As reações foram realizadas em um termociclador do tipo PCR Express Temperature Cycling System (Thermo Hybaid) e os fragmentos amplificados (com tamanho esperado de 1.500 pb) foram visualizados após eletroforese a 80 V por 1 h em gel de agarose 1,0 % corado com brometo de etídeo, juntamente com o marcador molecular 1 Kb *plus* DNA ladder (Gibco BRL).

A extração de DNA total das bactérias endofíticas presentes em duas amostras de raízes de canola de uma mesma plantação, em diferentes fases de desenvolvimento da planta, foram realizadas segundo Soares e colaboradores (2006). Essas amostras vegetais são partes das mesmas amostras que foram utilizadas na primeira etapa desse trabalho, que tratou do isolamento de bactérias diazotróficas cultiváveis de raízes e solo rizosférico de canola (Parte I, Farina et al., 2012). A primeira amostra foi coletada em setembro de 2009, quando a planta estava no estágio de roseta. Já, a segunda amostra foi coletada em outubro de 2009, quando a planta estava no estágio de floração. As coletas foram realizadas em uma região produtora de canola localizada no município de

Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil (28°30'43"S, 50°56'02"W). Para se verificar a eficiência e a quantificação da extração, amostras de DNA foram analisadas em gel de agarose 0,8% em tampão TEB 1 X.

### 3.2.1.3 Confeção do microarranjo

Os oligonucleotídeos foram projetados com base nas sequências de 25 pb selecionadas anteriormente, a fim de permitir a detecção de componentes da comunidade microbiana diazotrófica presente nas amostras de raízes de canola pelo menos até o nível de gênero. Os microarranjos de DNA foram construídos utilizando-se lâminas epoxidadas e um sistema robótico de DNA, desenvolvido primeiramente pela Universidade de Stanford, Califórnia (Shalon et al., 1996) e localizado no laboratório do Dr. Volker Wendisch, nessa época sediado na Universidade de Munster, Alemanha. O formato desse sistema permite a deposição de até 6.400 sondas. Entretanto, foram depositadas: 207 sequências relacionadas ao *nifH*, 85 ao 16S rDNA, 62 ao *nifD* e 54 ao *nifK*, além de 22 sequências relacionadas a bactérias em geral (controles positivos) e 07 sequências completamente não relacionadas a bactérias (controles negativos), totalizando 437 sequências. As condições de hibridização foram otimizadas utilizando-se os DNAs genômicos extraídos das culturas puras de *Agrobacterium* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhizobium* sp., *Sphingobacterium* sp., os fragmentos do gene do 16S rRNA, amplificados por PCR a partir do DNA genômico dessas bactérias, bem como dos DNAs isolados de amostras de raízes de canola nos estágios de roseta e floração.

Brevemente, a confecção do microarranjo seguiu as seguintes etapas: lâminas de microscópio padrão de vidro foram revestidas com uma solução de poli-lisina e armazenados durante várias semanas para permitir que a superfície se tornasse suficientemente hidrofóbica (Eisen e Brown, 1999). O oligonucleotídeo, eluído em 3X SSC, foram depositados sobre a superfície de vidro usando o sistema de impressão robótica acima descrito. O diâmetro de cada ponto (correspondendo a um oligonucleotídeo) foi de 150 µm e o espaço entre o centro de dois pontos foi de 205 µm. Cada oligonucleotídeo foi depositado de forma randômica em triplicata, totalizando 1.581 sequências depositadas. Essa distribuição permitiu a preparação de 16 grades, cada uma contendo 117 pontos, sendo que dos 1.872 espaços disponíveis (16 X 117), 291 ficaram vazios (1.872 – 1.581).

Para distribuir os oligonucleotídeos de forma mais uniforme, os pontos foram rehidratados, utilizando-se um banho de 1 X SSC a 40°C até que os pontos ficassem



reluzentes, seguido por secagem a seco a 120°C, utilizando-se um bloco de aquecimento. Para aumentar a quantidade de oligonucleotídeos hibridizáveis, estavelmente ligados a cada ponto, os ácidos nucléicos sofreram ligações cruzadas por irradiação UV (Eisen e Brown, 1999; Polen et al., 2003).

#### **3.2.1.4 Marcação do DNA genômico**

Os DNAs foram marcados utilizando-se os corantes fluorescentes Cianina-3 (Cy3) ou Cianina-5 (Cy5). Para cada hibridização foram utilizadas de 100 ng a 1 µg de DNA em 20 µl de volume. Foi adicionado 20 µl de *primers* randômicos (BioPrime® DNA Labeling System) (conforme a Tabela 3.2.1) e a reação foi mantida por 5 min a 100°C e, em seguida, a solução foi resfriada em gelo por 2 a 5 min. Logo após esse resfriamento, foram adicionados: 5 µl de uma mistura de nucleotídeos (Tabela 3.2.1), 3 µl de Cy3-dUTP ou Cy5-dUTP e 1 µl de Klenow (40 U µl<sup>-1</sup>) (BioPrime® DNA Labeling System). Essa mistura foi incubada a 37°C por 2 h. A reação foi, então, interrompida com 5 µl de EDTA (0,5 M, pH 8,0), limpa com a utilização do *Nucleotide Removal-Kit* (Qiagen) e o DNA marcado foi eluído em 50 µl de água estéril. As quantificações das concentrações de DNA e da fluorescência incorporada foram realizadas no aparelho NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.).

A confecção das lâminas e as hibridizações foram realizadas no laboratório do Dr. Volker Wendisch pelo Dr. Jung-Won Youn. O laboratório situa-se na Universidade de Bielefeld, Alemanha.

**Tabela 3.2.1** Composição das soluções de *primers* randômicos e da mistura de nucleotídeos utilizadas nas reações de marcação dos DNAs a serem hibridizados no microarranjo.

	<i>Volume</i>	<i>Concentração final</i>
<b><i>Primers</i> randômicos</b>		
	2,5 µL Tris (1 M, pH 6,8)	125 mM
	5 µL <i>primer</i> (3µg µl <sup>-1</sup> )	750 ng µl <sup>-1</sup>
	0,25 µL MgCl <sub>2</sub> (1 M)	12,5 mM
	1 µL β-Mercaptoetanol (0,5 M)	25 mM
<b>Mistura de nucleotídeos</b>		
	1,2 µL dATP (100 mM)	1,2 mM
	1,2 µL dATP (100 mM)	1,2 mM
	1,2 µL dATP (100 mM)	1,2 mM
	0,6 µL dATP (100 mM)	0,6 mM
	0,2 µL EDTA (0,5 M)	1 mM
	1 µL Tris (1 M, pH 8,0)	10 mM

### 3.2.1.5 Hibridizações e Lavagens

Os DNAs marcados (de 100 ng a 1 µg) com Cy3 ou Cy5 foram misturados com 3 µl de 20 X SSC, 0,5µl de 1 mmol l<sup>-1</sup> HEPES (pH 7) e 0,5 µL de 10% SDS. As misturas foram aquecidas a 99°C por 2 min, resfriadas em gelo por 2 a 5 min e incubadas à temperatura ambiente por 5 min. Reações contendo DNAs marcados com corantes diferentes foram, então, aplicadas nos microarranjos, conforme o experimento que estava em desenvolvimento. Os microarranjos foram protegidos com uma cobertura do tipo *lifter slip* (Erie Scientific Company, Portsmouth, VA, USA) para permitir a realização das hibridizações entre os DNAs marcados e os oligonucleotídeos fixados na lâmina. Os microarranjos foram incubados por 12 a 16 h em temperaturas que variaram de 40 a 50°C em uma câmara úmida, na presença de 1 X SSC. Após a hibridização, os microarranjos foram lavados em uma solução contendo 2 X SSC e 0,1% SDS durante, após em 1 X SSC e após em 0,5 X SSC. Cada etapa de lavagem teve a duração de 60 min. Depois de lavados, os microarranjos foram secos por centrifugação (15 min a 50 g).

### 3.2.1.6 Escaneamento e análise

Após a secagem do microarranjo as fluorescências para 532 nm (Cy3) e 635 nm (Cy5) foram determinadas utilizando-se o *scanner a laser* GenePix 4000 (Axon, Union City, CA, USA). Dados de fluorescência bruta adquiridos foram armazenados como arquivos de imagem em formato TIFF e foram analisados quantitativamente pelo uso do software GenePix Pro 6.0 (Axon, Union City, USA). Os sinais da fluorescência foram definidos a partir do sinal médio para o comprimento de onda (F532 ou F635) menos o sinal de fluorescência mediana do nível basal (*background*) (B532 ou B635), que foram definidos pela intensidade do sinal do entorno (Heiskanen et al., 2000). Dessa forma, o valor médio da fluorescência de cada ponto foi calculado. A intensidade de sinais negativos resultantes de  $B532 > F532$  ou  $B635 > F635$  foram definidos como 0, de acordo com as intensidades de sinais não detectáveis.

### 3.2.2 Resultados e discussão

#### 3.2.2.1 Sequências utilizadas como sondas

Após as buscas por sequências de genes *nifH*, *nifD*, *nifK* e do 16S rRNA de bactérias cultiváveis e identificadas em diversos bancos de dados e os alinhamentos utilizando-se o programa CLUSTAL X, foram obtidas 207 sequências relacionadas ao *nifH*, 85 ao 16S rDNA, 62 ao *nifD* e 54 ao *nifK*. Vinte e duas sequências relacionadas a bactérias em geral foram escolhidas para servirem como controles positivos e sete sequências completamente não relacionadas a bactérias foram designadas como controles negativos. Tais sequências controles foram obtidas na literatura, onde elas também foram usadas com o propósito de servirem como controles dos microarranjos descritos naqueles artigos (Ashelford et al., 2002; DeSantis et al., 2005; Loy et al., 2005; Moisaner et al., 2006; Loy et al., 2007). No total, 437 sequências de 25 nucleotídeos de extensão foram depositadas, em triplicata, no microarranjo. As Tabelas A.1 a A.5 (em anexo) apresentam todas as sequências dos oligonucleotídeos inseridos no microarranjo, juntamente com diversas informações sobre elas, como o número de acesso no GenBank das sequências das quais os oligonucleotídeos foram originados, o gênero ou espécie da qual cada sequência original provém e o *e-value* obtido em cada comparação, a posição do oligonucleotídeo em cada sequência, a porcentagem de bases G + C, a temperatura média básica e, no caso das sequências controles, as referências bibliográficas. Pela grande variação da porcentagem de G + C e da temperatura média básica entre os oligonucleotídeos, esses dados não puderam ser considerados no momento das hibridizações.

Embora tenha sido dada total atenção para a escolha de regiões que pudessem ser as mais específicas possíveis para cada gênero bacteriano analisado, algumas das sequências de oligonucleotídeos não se mostraram específicas apenas para a sequência da qual eles foram projetados e apresentaram *e-values* igualmente significativos com sequências de outros gêneros bacterianos. Quando tais resultados foram observados, os oligonucleotídeos em questão receberam a denominação de “não específico” na coluna correspondente ao *e-value*. Esse dado é de fundamental importância no momento de analisarmos os resultados de hibridizações, pois caso um desses oligonucleotídeos emita uma determinada fluorescência em uma hibridização, teremos que levar em consideração que esse resultado poderá não ser significativo.

### 3.2.2.2 O microarranjo

Microarranjos classificados como Arranjos Gênicos Funcionais (FGA, do inglês *Functional Gene Arrays*) são usados para avaliar as atividades microbianas e são baseados no uso de sondas para genes codificadores de proteínas envolvidas em funções específicas. Geralmente, trabalhos com FGA utilizam cDNAs proveniente de mRNAs como alvo, a fim de conhecer a comunidade de bactérias que está expressando determinado gene ou genes. O microarranjo desenvolvido neste trabalho pode ser considerado um FGA, entretanto, com algumas particularidades. Apesar de possuir sondas para genes-chave envolvidos em processos microbianos funcionais de interesse, no caso genes envolvidos no processo de fixação biológica de nitrogênio, o microarranjo apresenta, também, sequências do gene 16S rRNA e na sua hibridização é utilizado o DNA total da amostra ambiental estudada e não cDNAs provenientes de mRNAs que estão sendo expressos. Além disso, o microarranjo do presente trabalho foi desenvolvido no intuito de identificar a maior parte da comunidade de bactérias diazotróficas cultiváveis em um determinado ambiente. Por isso, o seu conjunto de sondas apresenta apenas sequências de bactérias cultiváveis e conhecidas, e não a totalidade de sequências disponíveis do gene *nifH*. A razão de serem utilizadas apenas sequências de bactérias cultiváveis e conhecidas é devido ao fato de que esse microarranjo tem como principal objetivo a identificação de bactérias que apresentam potencial de crescimento vegetal, para posterior isolamento das mesmas a fim de serem utilizadas na produção de um inoculante para uma determinada cultura vegetal.

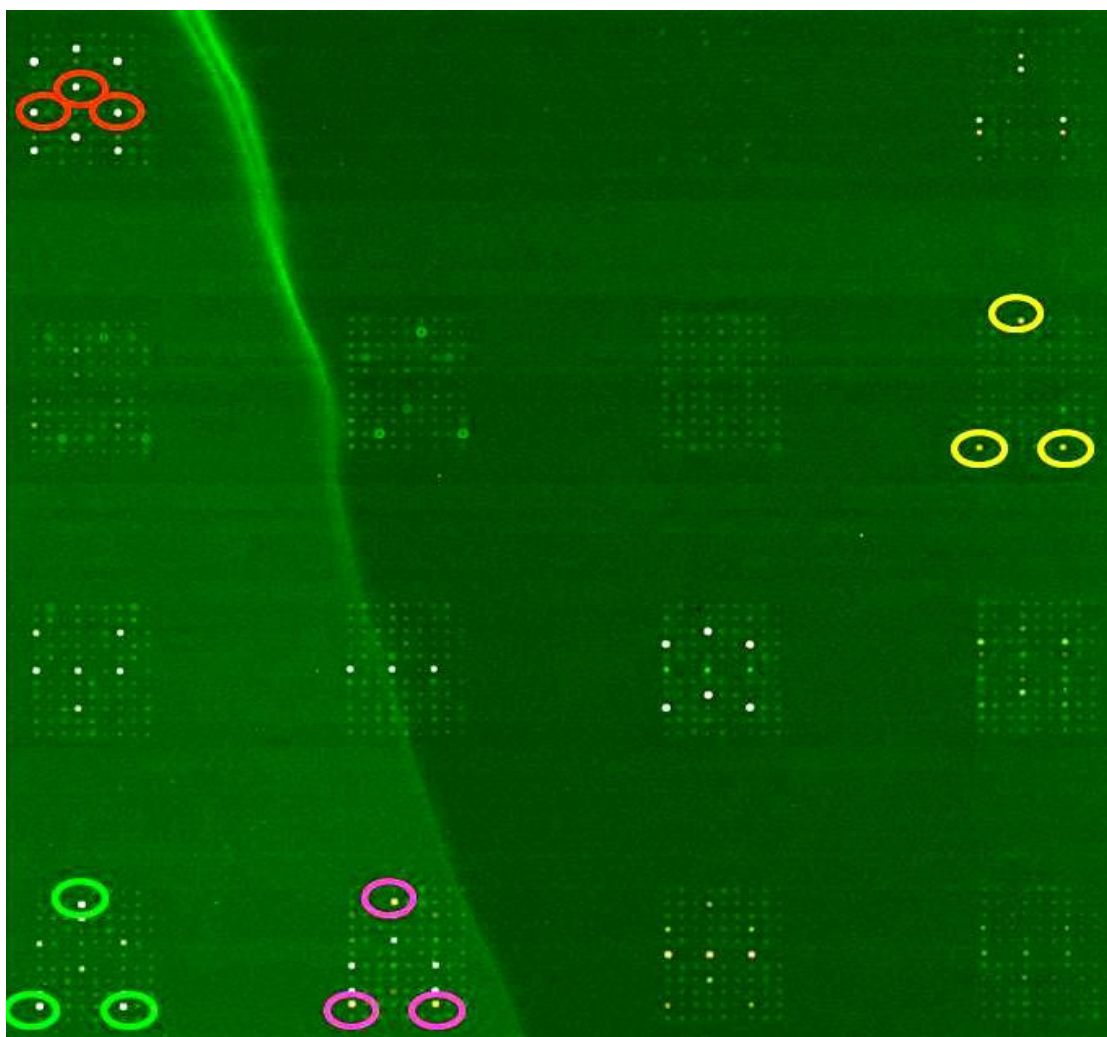
Um microarranjo deve conter sondas que combinem sensibilidade, especificidade e uniformidade (Loy e Bodrossy, 2006; Wagner et al., 2007). Além disso, a natureza altamente conservada de muitos genes e a grande quantidade de sequências de dados desconhecidas em amostras ambientais tornam difícil a tarefa de projetar e validar sondas de microarranjo específicas a uma determinada sequência alvo (Gentry et al., 2006). O gene *nifH* é um dos mais antigos genes funcionais na história da evolução gênica, sendo bastante conservado. Apesar disso, ele apresenta, também, regiões variáveis, que possibilitam o seu uso para discriminação de espécies. Isso pode ser verificado em trabalhos que analisam o formato de árvores filogenéticas baseadas em sequências de nucleotídeos de *nifH* e que demonstram ser consistentes com análises filogenéticas clássicas, baseadas nas sequências do gene 16S rRNA (Young, 1992, 1993; Zehr et al., 2003).

Além da porcentagem de similaridade, longos trechos de uma sonda que são complementares a uma sequência não-alvo podem levar a hibridizações inespecíficas substanciais e devem ser considerados durante o projeto da sonda (Kane et al., 2000; Hughes et al., 2001). Essa dificuldade pode ser aliviada, em grande parte, através do uso de sondas múltiplas para cada taxa-alvo (Loy e Bodrossy, 2006). No microarranjo desenvolvido neste trabalho utilizamos, além das sequências de genes *nifH* disponíveis de bactérias cultiváveis e identificadas, sequências dos genes *nifD*, *nifK* e 16S rRNA dos mesmos organismos (quando essas estavam disponíveis) para minimizar a ocorrência de hibridizações inespecíficas e, também, para aumentar o nível de confiabilidade de cada sinal de hibridização. Em alguns casos, quando possível, mais de um oligonucleotídeo para o gene *nifH* de uma mesma sequência, correspondendo a diferentes regiões dessa, foram projetados.

### 3.2.2.3 As hidridizações

Até o presente momento, as hibridizações realizadas tiveram o intuito de verificar se o microarranjo desenvolvido apresenta condições de alcançar o seu objetivo principal. Para isso, a primeira hibridização realizada utilizou como alvo fragmentos de todo o gene 16S rRNA, amplificados a partir dos DNAs genômicos de culturas puras das bactérias *Agrobacterium* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhizobium* sp. e *Sphingobacterium* sp. Os fragmentos das três primeiras foram marcados com Cianina-3 (Cy3), enquanto que os fragmentos das três posteriores foram marcados com Cianina-5 (Cy5). A temperatura de hibridização utilizada foi de 50°C. O resultado está apresentado na Figura 3.2.1. Essa primeira hibridização foi considerada satisfatória pelo fato de que os pontos que apresentaram fluorescência tiveram um sinal relativamente alto, sendo muito mais intensos que o sinal de *background*. As sondas utilizadas como controles positivos também apresentaram um bom sinal de fluorescência. Além disso, houve emissão de fluorescência vermelha nos três pontos correspondentes aos oligonucleotídeos provenientes de sequência de *Rhizobium* sp. Como os fragmentos do 16S rRNA amplificados a partir de *Rhizobium* sp. foram marcados com Cy5, isso indicou que o microarranjo estava detectando de forma satisfatória a presença do DNA específico. Entretanto, algumas hibridizações não específicas também ocorreram, como no caso das fluorescências emitidas por oligonucleotídeos provenientes de sequências de *Gluconobacter frateuri* e *Sphingobacterium multivorum*. Apesar disso, não foram

observadas fluorescências nos controles negativos e nem em muitos outros pontos ao mesmo tempo, indicando que os resultados foram promissores.



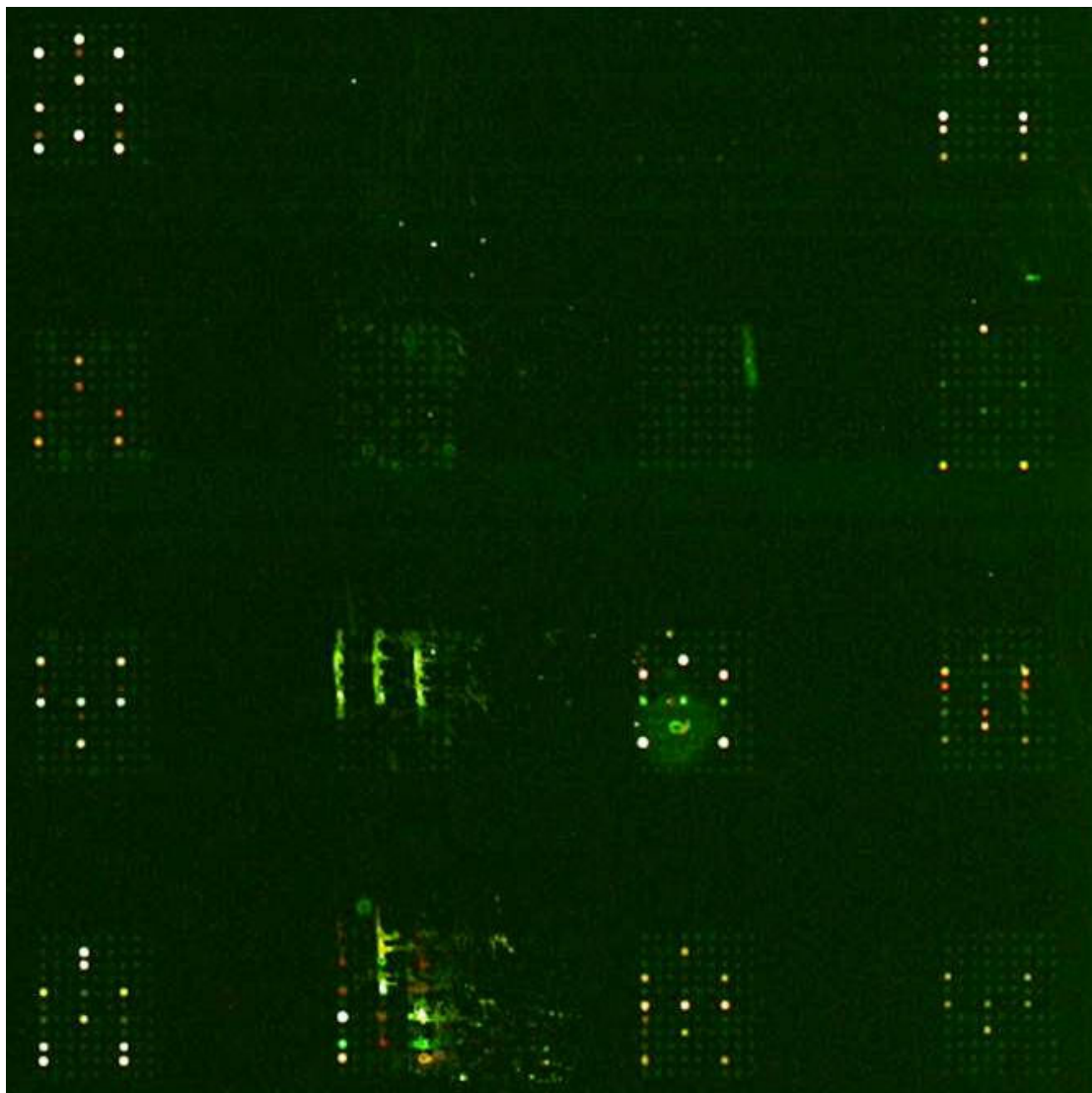
**Figura 3.2.1** Hibridização utilizando-se como alvo fragmentos do gene 16S rRNA completos, amplificados a partir dos DNAs genômicos de culturas puras das bactérias *Agrobacterium* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Stenotrophomonas maltophila*, *Rhizobium* sp. e *Sphingobacterium* sp. Os fragmentos das três primeiras foram marcados com Cianina-3 (Cy3), enquanto que os fragmentos das três posteriores foram marcados com Cianina-5 (Cy5). A temperatura de hibridização utilizada foi de 50°C. Circulado em vermelho - sondas utilizadas como controles positivos, circulado em amarelo - oligonucleotídeos provenientes de sequência de *Rhizobium* sp., circulado em verde - oligonucleotídeos provenientes de sequência de *Gluconobacter frateuri*, circulado em rosa - oligonucleotídeos provenientes de sequência de *Sphingobacterium multivorum*.

Nas duas hibridizações posteriores foram utilizados os DNAs genômicos de culturas puras das mesmas bactérias da hibridização anterior. Os DNAs também foram marcados da mesma maneira, utilizando-se Cy3 para os DNAs totais de *Agrobacterium* sp., *Klebsiella pneumoniae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, e Cy5 para os DNAs totais de *Stenotrophomonas maltophila*, *Rhizobium* sp. e *Sphingobacterium* sp. Na

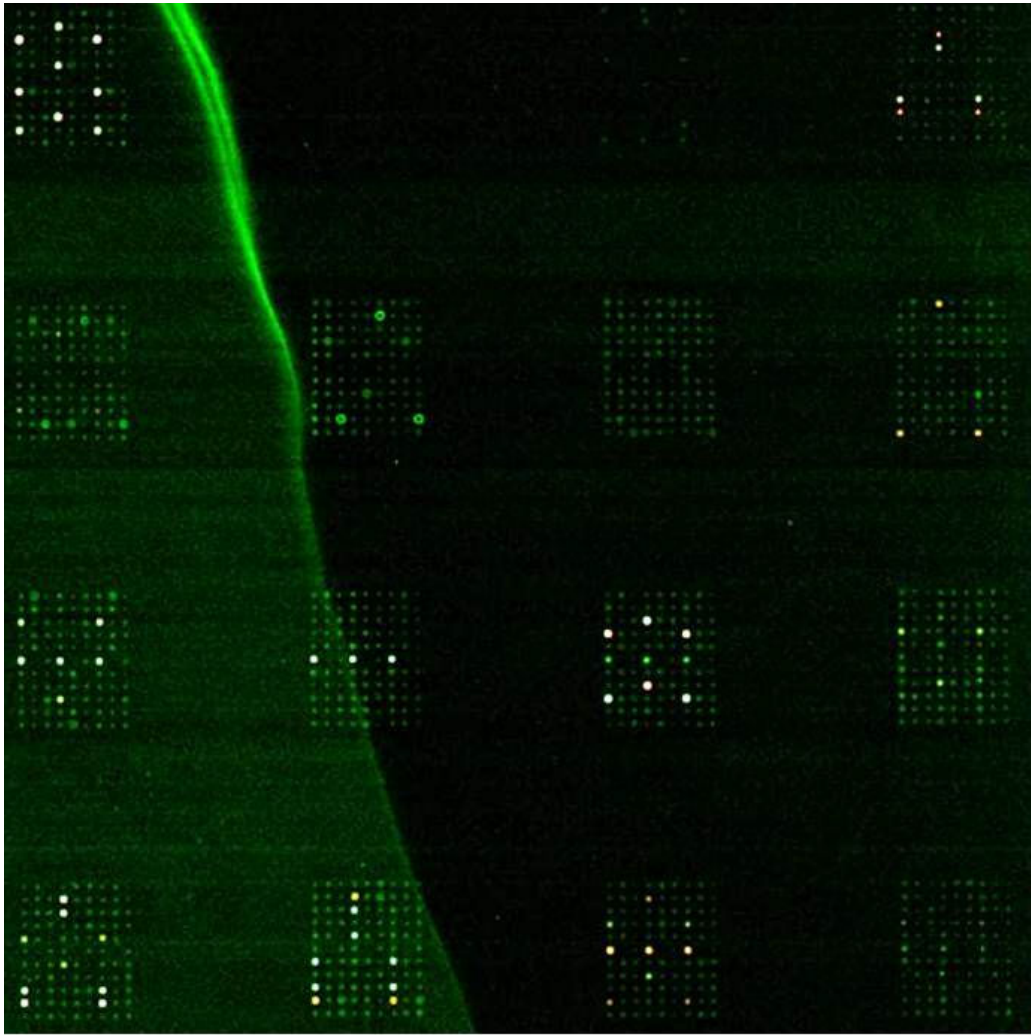
primeira dessas hibridizações a temperatura de hibridização utilizada foi de 40°C. A imagem da hibridização é apresentada na Figura 3.2.2. Nessa verificou-se a emissão de fluorescência em 107 pontos, representando um total de 39 diferentes genes, correspondendo a 18 gêneros bacterianos. Na segunda hibridização, a temperatura utilizada foi de 50°C. A imagem dessa hibridização é apresentada na Figura 3.2.3. Nessa verificou-se a emissão de fluorescência em 90 pontos, representando um total de 30 diferentes genes, correspondendo a 17 gêneros bacterianos. A comparação entre os gêneros identificados nas duas hibridizações está descrita na Tabela 3.2.2.

Com essas duas hibridizações podemos perceber, do mesmo modo que a hibridização com os fragmentos de 16S rRNA, que ocorreram hibridizações inespecíficas. Entretanto, deve-se ressaltar que esses são apenas resultados brutos e preliminares, visto que as intensidades de hibridização não passaram por um tratamento estatístico, o que é uma das perspectivas do trabalho. Pode ser verificado, ainda, que aumentando a temperatura de hibridização ocorreu um decréscimo no número de pontos, no número de genes e no número de gêneros bacterianos identificados, embora os gêneros *Methylobacterium* e *Rhodobacter* tenham sido identificados apenas no experimento com temperatura de hibridização de 50°C.





**Figura 3.2.2** Hibridização utilizando-se como alvo DNAs genômicos de culturas puras das bactérias *Agrobacterium* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Stenotrophomonas maltophila*, *Rhizobium* sp. e *Sphingobacterium* sp. Os fragmentos das três primeiras foram marcados com Cianina-3 (Cy3), enquanto que os fragmentos das três posteriores foram marcados com Cianina-5 (Cy5). A temperatura de hibridização utilizada foi de 40°C.



**Figura 3.2.3** Hibridização utilizando-se como alvo DNAs genômicos de culturas puras das bactérias *Agrobacterium* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Stenotrophomonas maltophila*, *Rhizobium* sp. e *Sphingobacterium* sp. Os fragmentos das três primeiras foram marcados com Cianina-3 (Cy3), enquanto que os fragmentos das três posteriores foram marcados com Cianina-5 (Cy5). A temperatura de hibridização utilizada foi de 50°C.

**Tabela 3.2.2** Comparação dos gêneros bacterianos obtidos nas hibridizações utilizando-se os DNAs genômicos de culturas puras de *Agrobacterium* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhizobium* sp. e *Sphingobacterium* sp. variando-se a temperatura. Bactérias identificadas pertencentes ao mesmo gênero dos DNAs marcados estão apresentados na respectiva cor emitida pela fluorescência (Cy3 – verde; Cy5 – vermelho).

Temperatura de hibridização 40°C	Temperatura de hibridização 50°C
<i>Acetobacter</i> sp.	<i>Acetobacter</i> sp.
<i>Agrobacterium</i> sp.	<i>Agrobacterium</i> sp.
ALPHAPROTEOBACTERIA	ALPHAPROTEOBACTERIA
ARCHEA	ARCHEA
<i>Asaia</i> sp.	<i>Asaia</i> sp.
BACTERIA	BACTERIA
BETAPROTEOBACTERIA	BETAPROTEOBACTERIA
<i>Bradyrhizobium</i> sp	<i>Bradyrhizobium</i> sp
<i>Burkholderia</i> sp.	<i>Burkholderia</i> sp.
<i>Derxia</i> sp.	<i>Derxia</i> sp.
<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.
EUCARYA	EUCARYA
GAMMAPROTEOBACTERIA	GAMMAPROTEOBACTERIA
<i>Gluconobacter</i> sp.	<i>Gluconobacter</i> sp.
<i>Halorhodospirilla</i> sp.	NI
<i>Klebsiella</i> sp.	NI
<i>Mesorhizobium</i> sp	<i>Mesorhizobium</i> sp
<i>Methylocystis</i> sp	NI
NI	<i>Methylobacterium</i> sp
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Rhizobium</i> sp.
NI	<i>Rhodobacter</i> sp.
<i>Rhodopseudomonas</i> sp.	<i>Rhodopseudomonas</i> sp.
<i>Rhodospirillum</i> sp.	<i>Rhodospirillum</i> sp.
<i>Sphingobacterium</i> sp.	<i>Sphingobacterium</i> sp.
<i>Xanthobacter</i> sp.	<i>Xanthobacter</i> sp.

NI = não identificado

Posteriormente, foram realizadas hibridizações utilizando-se DNA total das bactérias endofíticas presentes em duas amostras de raízes de canola de uma mesma plantação, em diferentes fases de desenvolvimento da planta, sendo uma com a planta

no estágio de roseta e a outra quando a planta estava no estágio de floração (hibridizações não apresentadas). A comparação entre os gêneros identificados nas duas hibridizações está descrita na Tabela 3.2.3. Observa-se um maior número de gêneros identificados na hibridização em que o DNA utilizado como alvo foi o das raízes em estágio de floração (18 diferentes gêneros), quando comparado com a hibridização que utilizou o DNA das raízes em estágio de roseta (12 diferentes gêneros). Apenas os gêneros *Gluconobacter sp.* e *Mesorhizobium sp.* foram identificados exclusivamente na hibridização que utilizou o DNA das raízes em estágio de roseta como alvo. Já os gêneros *Acetobacter sp.*, *Beijerinckia sp.*, *Frankia sp.*, *Mastigocladus sp.*, *Methylocella sp.*, *Rhodobacter sp.* e *Sinorhizobium sp.* foram identificados na hibridização que utilizou o DNA das raízes em estágio de floração.

Os DNAs totais das bactérias endofíticas utilizados nos experimentos de microarranjo foram extraídos das mesmas duas amostras de raízes de canola utilizadas no trabalho de Farina e colaboradores (2012), descrito na Parte I. Confrontando os resultados dos dois trabalhos, verificou-se que os gêneros bacterianos comuns em ambos foram *Agrobacterium sp.*, *Burkholderia sp.*, *Enterobacter sp.* e *Pseudomonas sp.*, para o DNA da raiz no estágio de roseta. Já os gêneros bacterianos detectados pelo microarranjo e que também foram isolados da raiz de canola no estágio de floração foram *Agrobacterium sp.*, *Burkholderia sp.*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.* e *Pseudomonas sp.* Isso indica que o microarranjo parece ser capaz de identificar bactérias presentes nas amostras pelo menos ao nível de gênero. Houve ainda dois gêneros, *Serratia sp.* e *Novosphingobium sp.*, que foram identificados no trabalho pelo isolamento clássico, mas que não possuíam oligonucleotídeos correspondentes no microarranjo. Oligonucleotídeos do gene 16S rRNA pertencente a esses gêneros serão, então, incluídos nos próximos microarranjos.

**Tabela 3.2.3** Resultados obtidos pelo método de microarranjo com os DNAs totais das bactérias extraídas das raízes de canola nos estágios de roseta e floração. Em negrito, gêneros e espécies que foram isolados no trabalho de Farina e colaboradores (2012).

<b>Raiz de canola (estágio de roseta)</b>	<b>Raiz de canola (estágio de floração)</b>
NI	<i>Acetobacter sp.</i>
<b><i>Agrobacterium sp.</i></b>	<b><i>Agrobacterium sp.</i></b>
ALPHAPROTEOBACTERIA	ALPHAPROTEOBACTERIA
ARCHAEA	NI
BACTERIA	BACTERIA
NI	<i>Beijerinckia sp.</i>
BETAPROTEOBACTERIA	BETAPROTEOBACTERIA
<i>Bradyrhizobium sp</i>	<i>Bradyrhizobium sp</i>
<b><i>Burkholderia sp.</i></b>	<b><i>Burkholderia sp.</i></b>
<i>Derxia sp.</i>	<i>Derxia sp.</i>
<b><i>Enterobacter sp.</i></b>	<b><i>Enterobacter sp.</i></b>
<i>Escherichia sp.</i>	<i>Escherichia sp.</i>
EUCARYA	NI
NI	<i>Frankia sp.</i>
<i>Gluconobacter sp.</i>	NI
<i>Klebsiella sp.</i>	<b><i>Klebsiella sp.</i></b>
NI	<i>Mastigocladus sp.</i>
<i>Mesorhizobium sp.</i>	NI
<i>Methylobacterium sp</i>	<i>Methylobacterium sp</i>
NI	<i>Methylocella sp.</i>
<b><i>Pseudomonas sp.</i></b>	<b><i>Pseudomonas sp.</i></b>
NI	<i>Rhodobacter sp.</i>
<i>Rhodopseudomonas sp.</i>	<i>Rhodopseudomonas sp.</i>
NI	<i>Sinorhizobium sp.</i>
<i>Xanthobacter sp.</i>	<i>Xanthobacter sp.</i>

NI = não identificado

Para o microarranjo desenvolvido neste trabalho atingir o objetivo a ele imposto, esse deve ser capaz de detectar e identificar sequências específicas em uma complexa mistura de ácidos nucléicos. Apesar dos resultados serem bastante preliminares, verificou-se que os oligonucleotídeos de 25 pb foram suficientemente sensíveis para emitir um sinal de hibridização. Não foram obtidos sinais de hibridização altamente inespecíficos, visto que não houve emissão de sinal em todos os pontos, bem como os sinais obtidos foram similares e presentes nas três repetições de cada oligonucleotídeo.

### 3.2.2.4 Comparação entre os métodos

Fazendo-se uma comparação entre o isolamento convencional de bactérias, a utilização de sequenciamento em grande escala e o uso de microarranjos, conclui-se que cada uma dessas abordagens apresenta vantagens e desvantagens quanto ao objetivo de obter informações sobre a comunidade microbiana de determinado ambiente.

Com relação ao aporte financeiro para cada experimento, o isolamento convencional é o mais acessível, visto que qualquer laboratório de microbiologia relativamente equipado é capaz de realizá-lo a um custo baixo. O microarranjo pode ser considerado uma tecnologia mais dispendiosa, por exigir robôs para a confecção das lâminas, leitores de fluorescência (*scanners*), forno para as hibridizações, computadores, entre outros equipamentos. O sequenciamento em grande escala, entretanto, é o mais oneroso dos três, por exigir sequenciadores de alta performance e, após gerados os dados das sequências, é necessária uma infraestrutura de bioinformática, o que requer computadores e programas específicos, além de mão de obra especializada.

Com relação à cobertura, o microarranjo parece ser a tecnologia mais completa, visto que o alvo é o DNA total das amostras. O sequenciamento em grande escala apresenta o problema da tendência da PCR em amplificar melhor determinados fragmentos em detrimento de outros, o que faz com que a cobertura seja referente aos fragmentos que foram amplificados com sucesso. Já o isolamento convencional de bactérias é altamente tendencioso, pois as bactérias que serão isoladas ficarão restritas aos meios de cultivo que foram utilizados.

Quanto à rapidez nos resultados, o microarranjo também demonstra ser o mais vantajoso, sendo possível realizar o experimento, desde a marcação e hibridização até a interpretação e análise dos resultados das fluorescências em torno de dois dias. O sequenciamento em grande escala é mais demorado, consumindo em torno de sete dias para obtenção dos resultados finais, caso se tenha uma boa equipe de bioinformatas. No entanto, o isolamento convencional das bactérias é, sem dúvidas, o mais demorado, visto que são necessários longos períodos para o isolamento e identificação das bactérias, geralmente ao redor de trinta dias.

Com relação à identificação das bactérias, no isolamento convencional as bactérias que são isoladas podem ser identificadas em nível de espécie. Já os métodos de microarranjo e sequenciamento em grande escala apresentam as limitações impostas pela pouca quantidade de informação que é fornecida pelas sequências dos

oligonucleotídeos (no caso do microarraqo, 25 pares de bases) ou pelo tamanho dos fragmentos amplificados que são sequenciados (geralmente entre 100 a 200 pb). Normalmente, essas duas abordagem permitem a identificação dos membros de uma comunidade bacteriana até, no máximo, o nível de gênero.

Apesar do isolamento convencional de bactérias aparentar ser o menos vantajoso quanto ao objetivo de obter informações sobre a comunidade microbiana de determinado ambiente, ele é o único que fornece a bactéria viva. Essa vantagem é extrema, caso tal bactéria venha a ser utilizada para alguma finalidade, como, por exemplo, a produção de um inoculante. O microarraqo desenvolvido nesse trabalho tem a pretensão de identificar a comunidade de bactérias diazotróficas cultiváveis de um determinado ambiente, para que, posteriormente, um experimento de isolamento convencional seja realizado, buscando bactérias específicas com características de interesse, sabendo que essas bactérias estão presentes nesse ambiente.

#### 4 Considerações finais

Os micro-organismos que beneficiam os vegetais, chamados de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria* ou PGPRs), podem estabelecer uma relação simbiótica com a planta hospedeira ou viverem livremente no solo, mas, frequentemente, são encontrados perto ou até mesmo dentro das raízes. As bactérias que colonizam a rizosfera em torno das raízes são denominadas de bactérias epifíticas e aquelas que vivem dentro da própria raiz são chamadas de bactérias endofíticas. As PGPRs podem estimular o crescimento das plantas tanto direta como indiretamente. A estimulação indireta ocorre quando as PGPRs previnem efeitos deletérios de micro-organismos fitopatogênicos, enquanto que a estimulação direta ocorre quando a PGPR sintetiza alguma substância que favorece o crescimento da planta ou a captura determinados nutrientes. Essa última pode ser através da solubilização de minerais, tais como fósforo, da produção de sideróforos ou pela produção de reguladores de crescimento (fito-hormônios), que acentuam o crescimento vegetal em vários estágios do desenvolvimento. Bactérias que tenham uma ou mais dessas características são potenciais candidatas a serem utilizadas na formulação de inoculantes, a fim de aumentar a produtividade de lavouras.

Estudos sobre a composição das comunidades microbianas têm avançado nos últimos anos, especialmente pelo desenvolvimento de tecnologias como o microarranjo e o sequenciamento em massa, que dispensam o cultivo dos micro-organismos, visto que a vasta maioria destes não é cultivável. Estudos que buscam investigar a composição de micro-organismos associados com as raízes das plantas são de fundamental importância para a compreensão do impacto que novas tecnologias agrícolas terão sobre a ecologia do solo, como, por exemplo, a utilização de inoculantes. Dentre os aspectos que influenciam a composição da comunidade microbiana na rizosfera destacam-se o tipo da planta, o estágio de crescimento da mesma, a variação de exsudação de compostos orgânicos pelas raízes, as variações sazonais e diferentes práticas de cultivo.

Apesar da existência de alguns estudos que isolaram PGPRs de culturas de canola e/ou avaliaram alguns dos aspectos que influenciam na diversidade das comunidades microbianas associadas às raízes de canola (Kloepper et al., 1988; Siciliano e Germida, 1999; Bertrand et al., 2001; Dunfield e Germida, 2003), nada se conhece sobre esses aspectos em culturas de canola cultivadas no Rio Grande do Sul ou mesmo no Brasil. Entretanto, o cultivo de canola na região sul do Brasil tem recebido



estímulos, sendo este o primeiro estado do país a receber o zoneamento para o grão. Isso se deve ao fato de que o cultivo de canola já tem o incentivo do mercado, atrelado à indústria de biodiesel. De acordo com Mourad (2006), o potencial para a produção de biodiesel a partir de canola, em termos de volume de óleo por área, é maior do que o de culturas como a soja e a mamona. Além disso, a canola também é uma boa opção para produção de óleo comestível, para cobertura do solo e para rotação de culturas.

Considerando-se o potencial econômico da canola e a falta de estudos sobre bactérias promotoras do crescimento vegetal para essa cultura, um dos objetivos principais desse trabalho foi isolar e identificar bactérias cultiváveis associadas à rizosfera e às raízes de canola para verificar se possíveis mudanças nas comunidades microbianas estavam associadas com os diferentes estágios de rotação de culturas e com as diferentes fases do crescimento da canola. Foram também avaliadas as habilidades de promoção de crescimento vegetal de isolados bacterianos, sendo que alguns destes também foram testados com a planta. Paralelo a isso, foi desenvolvido um microarranjo para identificação de bactérias diazotróficas cultiváveis e conhecidas de diferentes ambientes, a fim de direcionar o isolamento de possíveis PGPRs que despertem interesse para a produção de inoculantes.

Para alcançar os primeiros objetivos propostos no trabalho foram coletados solo e raízes de canola, quando presentes, de cinco períodos diferentes, procurando abranger todo o desenvolvimento da canola, juntamente com a rotação de cultura realizada com a soja. Bactérias diazotróficas foram, então, isoladas e caracterizadas ao nível de gênero. Foram avaliadas as habilidades de promoção de crescimento vegetal – solubilização de fosfato, produção de sideróforos e produção de compostos indólicos – de cada um dos isolados. Sete desses isolados, com diferentes características de PGPRs foram escolhidos e testados em experimento em casa de vegetação. Os resultados obtidos indicaram a presença de diferentes populações de PGPRs na rizosfera da canola e dentro das raízes para diferentes estágios da rotação de cultura. Além disso, a estrutura da comunidade microbiana foi influenciada pela variação sazonal, como indicado pelos diferentes gêneros identificados para os diferentes estágios de desenvolvimento da canola, havendo, também, a relação entre diversidade bacteriana e precipitação mensal. *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* foram os gêneros bacterianos predominantes entre todos os identificados. Muitas das bactérias isoladas foram capazes de produzirem compostos indólicos e sideróforos, solubilizarem fosfato e algumas também fixarem nitrogênio. Além disso, alguns dos isolados testados para os

efeitos de promoção do crescimento foram realmente capazes de promover o crescimento da planta.

Como perspectiva, os isolados que apresentaram a promoção do crescimento da planta serão caracterizados ao nível de espécie e testados em experimentos em campo, para posterior desenvolvimento de um inoculante para as culturas de canola do sul do Brasil.

Para auxiliar na busca de linhagens bacterianas que possam ser utilizadas na composição de produtos inoculantes, foi desenvolvido um microarranjo para identificação de bactérias diazotróficas cultiváveis e conhecidas de diferentes ambientes. Apesar de terem sido realizados apenas testes preliminares, verificou-se que o microarranjo apresenta bom potencial para atingir o seu objetivo. Entretanto, como mencionado anteriormente, todos os pontos que emitiram fluorescência foram considerados. O próximo passo será aplicar um conjunto de análises estatísticas, fornecidas pelo programa R (Savage et al., 2009), que irá estabelecer um limiar de confiabilidade do sinal de fluorescência. Além disso, microarranjos que apresentam sondas curtas, como o caso desse, muitas vezes apresentam baixa sensibilidade, sendo necessária a amplificação do gene alvo. Para as próximas hibridizações será realizada a amplificação da comunidade genômica total (WCGA, do inglês *Whole-Community Genome Amplification*) utilizando a estratégia de amplificação por deslocamento múltiplo (MDA, do inglês *Multiple Displacement Amplification*, Dean et al., 2002), para, posteriormente, esse DNA amplificado ser utilizado como alvo nas hibridizações. Esse microarranjo foi primeiramente utilizado em amostras de culturas de canola, mas, uma vez comprovada a sua eficácia, poderá ser utilizado com diferentes culturas vegetais e em diferentes situações ambientais. Situações interessantes em que o microarranjo também poderá ser aplicado são, por exemplo, na comparação de comunidades bacterianas em ambientes antes e após a prática de queimadas, ou em áreas onde foram cultivadas plantas modificadas geneticamente, comparadas com áreas de campos nativo.

Após um período de quatro anos dedicado ao estudo das PGPRs presentes em todo o ciclo da rotação de cultura da canola, resultados preliminares importantes foram obtidos nesse trabalho. Pouco se sabe ainda sobre a diversidade de bactérias diazotróficas cultiváveis e conhecidas das culturas de canola. Entretanto, com o desenvolvimento do microarranjo a informação gerada será muito maior que por experimentos de isolamento clássico. Com isso, o isolamento de uma determinada

bactéria de interesse que se sabe estar presente naquela determinada amostra poderá ser direcionado, graças ao conhecimento prévio gerado pelo microarranjo.

## 5 Referências Bibliográficas

- Affourtit J, Zehr JP e Paerl HW (2001) Distribution of nitrogen-fixing microorganisms along the Neuse river estuary, North Carolina. *Microb Ecol* 41, 114-123.
- Alves BJR, Boddey RM e Urquiaga S (2004) The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant Soil* 252, 1-9.
- Amado TJC, Mielniczuck J e Fernandes SBV (2000) Leguminosas e adubação mineral como fontes de nitrogênio para o milho em sistemas de preparo de solo. *R Bras C Solo* 24, 179-189.
- Amann RI, Ludwig W e Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59, 143-169.
- Angly FE, Felts B, Breitbart M, Salamon P, Edwards RA, Carlson C, Chan AM, Haynes M, Kelley S, Liu H, Mahaffy JM, Mueller JE, Nulton J, Olson R, Parsons R, Rayhawk S, Suttle CA e Rohwer F (2006) The marine viromes of four oceanic regions. *PLoS Biology* 4, 2121–2131.
- Arnold W, Rump A, Klipp W, Priefer UB e Pühler A (1988) Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *J Mol Biol* 203, 715–738.
- Arshad M e Frankenberger-Jr WT (1998) Plant growth-regulating substances in the rizosphere: microbial production and functions. *Advances in Agronomy* 62, 45-151.
- Asgar HN, Zahir ZA, Arshad M e Khaliq A (2002) Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica jucea* L *Biol Fertil Soil* 35, 231-237.
- Ashelford KE, Day MJ, Bailey MJ, Lilley AK e Fry JC (1999) *In situ* population dynamics of bacterial viruses in a terrestrial environment. *Applied Environ. Microbiol* 65, 169-174.
- Ashelford KE, Fry JC, Bailey MJ e Day MJ (2002) Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* Grimont *et al.* 1983 to *Serratia quinivorans* corrig., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 52, 2281-2289.
- Assmann TS, Júnior PR, Moraes A, Assmann AL, Koehler HS e Sandini I (2003) Rendimento de milho em área de integração lavoura-pecuária sob o sistema plantio direto, em presença e ausência de trevo branco, pastejo e nitrogênio. *R Bras C Solo* 27, 675-683.
- Bae JW, Rhee SK, Nam YD e Park YH (2005) Generation of subspecies level-specific microbial diagnostic microarrays using genes amplified from subtractive suppression hybridization as microarray probes. *Nucleic Acids Res* 33, e113.
- Bae JW e Park YH (2006) Homogeneous versus heterogeneous probes for microbial ecological microarrays. *Trends Biotechnol* 24, 318–323.
- Bachhawat AK e Ghosh S (1987) Isolation and characterization of the outer membrane proteins of *Azospirillum brasilense*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1751-1758.
- Bashan Y e Levanony H (1990) Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agricultura. *Can J Microbiol* 36, 591-608.
- Bastián F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R e Bottini R (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation* 24, 7–11.

- Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, et al. (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 32: D138–D141.
- Bertrand H, Nalin R, Bally R e Cleyet-Marel JC (2001) Isolation and identification of the most efficient plant growth-promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). *Biol. Fertil. Soils* 33: 152–156.
- Bodrossy L, Stralis-Pavese N, Murrell JC, Radajewski S, Weilharter A e Sessitsch, A (2003) Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs. *Environ Microbiol* 5, 566–582.
- Bodrossy L e Sessitsch A (2004) Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol* 7, 245–254.
- Bontemps C, Golfier G, Gris-Liebe C, Carrere S, Talini L e Boivin-Masson C (2005) Microarray-based detection and typing of the *Rhizobium* nodulation gene *nodC*: potential of DNA arrays to diagnose biological functions of interest. *Appl Environ Microbiol* 71, 8042-8048.
- Bortolini CG, Silva PRF e Argenta G (2000) Sistemas consorciados de aveia preta e ervilhaca comum como cobertura de solo e seus efeitos na cultura do milho em sucessão. *R Bras C Solo*, 24, 897-903.
- Bostrom KH, Riemann L, Zweifel UL e Hagstrom A (2007) *Nodularia* sp. *nifH* gene transcripts in the Baltic Sea proper. *J Plankton Res* 29, 391–399.
- Brown ME (1974) Seed and root bacterization. *Annu Rev Phytopath* 12, 181–197.
- Brown MV, Philip GK, Bunge JA, Smith MC, Bissett A, Lauro FM *et al.* (2009) Microbial community structure in the North Pacific Ocean. *ISME J* 3.
- Buysens S, Höfte M e Poppe J (1995) Biological control of *Pythium* sp in soil and nutrient film technique systems by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2. *Acta Horticulturae* 382, 238-245.
- Cassán F, Bottini R, Schneider G e Piccoli P (2001) *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA20 and metabolize the resultant aglycones to GA1 in seedlings of rice dwarf mutants. *Plant Physiol* 125, 2053–2058.
- Chabot R, Antoun H e Cescas MP (1993) Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can J Microbiol* 39, 941–7.
- Chanway CP e Holl FB (1991) Biomass increase and associative nitrogen fixation of mycorrhizal *Pinus contorta* Dougl. seedlings inoculated with a plant growth promoting *Bacillus* strain. *Can J Bot* 69, 507-511.
- Cho JC e Tiedje JM (2002) Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl Environ Microbiol* 67, 3677-3682.
- Chou CC, Chen CH, Lee TT e Peck K (2004) Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. *Nucleic Acids Res* 32, e99.
- Church MJ, Short CM, Jenkins BD, Karl DM e Zehr JP (2005) Temporal patterns of nitrogenase gene (*nifH*) expression in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Appl Environ Microbiol* 71, 5362–5370.
- Crowley DE, Reid CPP e Szaniszlo PJ (1988) Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant Phys* 87, 680-685.
- Curtis TP, Sloan WT e Scannell JW (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10494–10499.
- Datta M, Banish S e Gupta RK (1982) Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. *Plant Soil* 69, 365–73.

- Dean FB, Hosono S, Fang LH, Wu XH, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun ZY, Zong QL, Du YL, Du J, Driscoll M, Song WM, Kingsmore SF, Egholm M e Lasken RS (2002) Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 5261–5266.
- de Freitas JR, Banerjee MR e Gemida JJ (1997) Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L) *Biol Fertil Soils* 24, 358-364.
- Demange P, Bateman A, Dell A e Abdaliah M (1988) Structure of azotobactin D, a siderophore of *Azotobacter vinelandii* strain D (CCM289). *Biochemistry* 27, 2745-2752.
- Denef VJ, Park J, Rodrigues JLM, Tsoi TV, Hashsham SA e Tiedje JM (2003) Validation of a more sensitive method for using spotted oligonucleotide DNA microarrays for functional genomics studies on bacterial communities. *Environ Microbiol* 5, 933-943.
- DeRisi JL, Iyer VR e Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680–686.
- DeSantis TZ, Stone CE, Murray SR, Moberg JP e Andersen GL (2005) Rapid quantification and taxonomic classification of environmental DNA from both prokaryotic and eukaryotic origins using a microarray. *FEMS Microbiology Letters* 245, 271–278.
- DeSantis TZ, Brodie EL, Moberg JP, Zubieta IX, Piceno YM e Andersen GL (2007) High-density universal 16S rRNA microarray analysis reveals broad diversity than typical clone library when sampling the environment. *Microb Ecol* 3, 371–383.
- Deslippe JR, e Egger KN (2006) Molecular diversity of *nifH* genes from bacteria associated with high arctic dwarf shrubs. *Microb Ecol* 51, 516–525.
- Di Cello F, Bevivino A, Chiarini L, Fani R, Paffetti D, Tabacchioni S e Dalmastrì C (1997) Biodiversity of a Burkholderia cepacia population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Appl Environ Microbiol* 63, 4485–4493.
- Dobbelaere S, Vanderleyden J e Okon Y (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci* 22, 107-149.
- Doran M, Raicu DS, Furst JD, Settimi R, Schipma M e Chandler DP (2007) Oligonucleotide microarray identification of *Bacillus anthracis* strains using support vector machines. *Bioinformatics* 23, 487–492.
- Draghici S, (2003). *Data Analysis Tools for DNA Microarrays*, Chapman & Hall/CRC.
- Duc L, Neuenschwander S, Rehrauer H, Wagner U, Sobek J, Schlapbach R e Zeyer J (2009a) Development and experimental validation of a *nifH* oligonucleotide microarray to study diazotrophic communities in a glacier forefield. *Environ Microbiol* 11, 2179–2189.
- Duc, L., Noll, M., Meier, B.E., Bürgmann, H., and Zeyer, J (2009b) High diversity of diazotrophs in the forefield of a receding alpine glacier. *Microb Ecol* 57: 179–190.
- Dudley AM, Aach J, Steffen MA e Church GM (2002) Measuring absolute expression with microarrays with a calibrated reference sample and an extended signal intensity range. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 7554-7559.
- Dugat-Bony E, Peyretailade E, Parisot N, Biderre-Petit C, Jaziri F, Hill D, Rimour S e Peyret P (2011) Detecting unknown sequences with DNA microarrays: explorative probe design strategies. *Environ Microbiol* doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02559.x

- Dunfield KE & Germida JJ (2003) Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). *Appl Environ Microbiol* 69, 7310–7318.
- Edwards RA, Rodriguez-Brito B, Wegley L, Haynes M, Breitbart M, Peterson DM et al. (2006) Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics* 7, 57.
- Eisen MB e Brown PO (1999) DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol* 303, 179-205.
- Elmerich C (1984) Molecular biology and ecology of diazotrophs associated with non-leguminous plants. *Bio Technology* 2, 967-978.
- Eom HS, Hwang BH, Kim DH, Lee IB, Kim YH, Bodrossy L e Sessitsch A (2004) Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol* 7, 245–254.
- Farina R, Beneduzi A, Ambrosini A, Campos SB, Lisboa BB, Wendisch V, Vargas LK e Passaglia LMP (2012) Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. *App Soil Ecol* 55, 44-55.
- Fuentes-Ramirez LE, Jimenez-Salgado T e Abarca-Ocampo IR (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil* 154, 145–150.
- Garbeva P, van Veen JA e van Elsas JD (2004) Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu Rev Phytopathol* 42, 243–270.
- Garcia C, Fernandez T, Costa F, Cerranti B e Masciandaro G (1992) Kinetics of phosphatase activity in organic wastes. *Soil Biol Biochem* 25, 361-365.
- Gaur AC e Ostwal KP (1972) Influence of phosphate dissolving bacilli on yield and phosphate uptake of wheat crop. *Indian J Exp Biol* 10, 393–4.
- Gentry TJ, Wickham GS, Schadt CW, He Z e Zhou J (2006) Microarray applications in microbial ecology research. *Microb Ecol* 52, 159–175.
- Germida JJ, Siciliano SD, J. de Freitas R e Seib AM (1998) Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol Ecol* 26, 43–50.
- Gilbert GS, Clayton MK, Hand&man J e Parke JL (1996) Use of cluster and discriminant analyses to compare rhizospheric bacterial communities following biological perturbation. *Microb. Ecol.* 37, 123-147
- Glick BR (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41, 109-117.
- Glick BR, Patten CL, Holguin G e Penrose DM (1999) Biochemical and genetics mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London.
- Gray EJ e Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol Biochem* 37, 395-412.
- Grayston SJ, Griffith GS, Mawdsley JL, Campbell CD e Bardgett RD (2001) Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biol Biochem* 33, 533–551.
- Guadagnin JC, Bertol I, Cassol PC e Amaral AJD (2005) Perdas de solo, água e nitrogênio por erosão hídrica em diferentes sistemas de manejo. *Rev Bras C Solo*, 29, 277-286.
- Guerrero R e Berlanga M (2006) Life's unity and flex-ibility: the ecological link. *Int Microbiol* 9, 225–235.

- Guschin DY, Mobarry BK, Proudnikov D, Stahl DA, Rittmann BE e Mirzabekov AD (1997) Oligonucleotide microchips as genosensors for determinative and environmental studies in microbiology. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2397–2402.
- He Z, Gentry TJ, Schadt CW, Wu L, Liebich J, Chong SC, Huang Z, Wu W, Gu B, Jardine P et al. (2007) GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *ISME J* 1, 67-77.
- He Z, Deng Y, Van Nostrand JD, Tu Q, Xu M, Hemme CL, Li X, Wu L, Gentry TJ, Yin Y et al. (2010a) GeoChip 3.0 as a high-throughput tool for analyzing microbial community composition, structure and functional activity. *ISME J* 4, 1167-1179.
- He Z, Xu M, Deng Y, Kang S, Kellogg L, Wu L, Van Nostrand JD, Hobbie SE, Reich PB, Zhou J (2010b) Metagenomic analysis reveals a marked divergence in the structure of belowground microbial communities at elevated CO<sub>2</sub>. *Ecol Lett* 13: 564-575.
- He Z, Deng Y e Zhou J (2011) Development of functional gene microarrays for microbial community analysis. *Current Opinion in Biotechnology* 23, 1–7.
- Heiskanen MA, Bittner ML, Chen Y, Khan J, Adler KE, Trent JM e Meltzer PS (2000) Detection of gene amplification by genomic hybridization to cDNA microarrays. *Cancer Res* 60, 799–802.
- Holford ICR (1997) Soil phosphorus, its measurements and its uptake by plants. *Austr J Soil Res* 35, 227-239.
- Hong Y, Glick BR e Pasternak JJ (1991) Plant-microbial interaction under gnotobiotic conditions: a scanning electron microscope study. *Curr. Microbiol.* 23, 111-114.
- Houlden A, Timms-Wilson TM, Day MJ e Bailey MJ (2008) Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiol Ecol* 65, 193–201.
- Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW et al. (2001) Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol* 19, 342–347.
- Izquierdo JA e Nusslein K (2006) Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments. *Microb Ecol* 51, 441–452.
- Jaeger CH, Lindow SE, Miller W, Clark E e Firestone MK (1999) Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl Environ Microbiol* 65, 2685–2690.
- Jain DK e Patriquin DG (1985) Characterization of a substance produced by *Azospirillum* wich causes branching of wheat root hairs. *Can J Microbiol* 31, 206-210.
- Jenkins BD, Steward GF, Short SM, Ward BB e Zehr JP (2004) Fingerprinting diazotroph communities in the Chesapeake Bay by using a DNA macroarray. *Appl Environ Microbiol* 70, 1767–1776.
- Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil* 205, 25-44.
- Kane MD, Jatcoe TA, Stumpf CR, Lu J, Thomas JD e Madore SJ (2000) Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res* 28, 4552–4557.
- Kloepper JW, Lifshitz R e Schroth MN (1988) *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *ISI Atlas Sci Anim Plant Sci* pp. 60-64.
- Kloepper JW, Lifshitz R e Zablotowicz RM (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7, 39-43.
- Knosp O, Tigerstrom M von e Page WJ (1984) Siderophore-mediated uptake of iron in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* 159, 341–347.



- Koenig RL, Morris RO e Polacco JC (2002) tRNA is the source of low-level transzeatin production in *Methylobacterium* spp. *J Bacteriol* 184, 1832–1842.
- Kostic T, Weilharter A, Rubino S, Delogu G, Uzzau S, Rudi K et al. (2007) A microbial diagnostic microarray technique for the sensitive detection and identification of degrading strain AC1100. *Syst Appl Microbiol* 27, 623–627.
- Kuske CR, Ticknor LO, Miller ME, Dunbar JM, Davis JA, Barns SM e Belnap J (2002) Comparison of soil bacterial communities in rhizospheres of three plant species and the interspaces in an arid grassland. *Appl Environ Microbiol* 68, 1854–1863.
- Langlois RJ, LaRoche J e Raab PA (2005) Diazotrophic diversity and distribution in the tropical and fixing phylotypes in a meromictic, hypersaline lake. *Microbial Ecol* 47, 30–40.
- Lara Cabezas WAR, Trivelin PCO, Korndörfer GH et al. (2000) Balanço da adubação nitrogenada sólida e fluida de cobertura na cultura de milho, em sistema plantio direto no Triângulo Mineiro (MG). *R Bras C Solo* 24, 363-376.
- Lazarevic et al. (2009) Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *Journal of Microbiology Methods* 79, 266-71.
- Lehner A, Loy A, Behr T, Gaenge H, Ludwig W, Wagner M, Schleifer KH (2005) Oligonucleotide microarray for identification of *Enterococcus* species. *FEMS Microbiology Letters* 246, 133–142.
- Lemarchand K et al. (2004) Molecular biology and DNA microarray technology for microbial quality monitoring of water. *Crit Rev Microbiol* 30, 145–172.
- Lemoine S, Combes F e Le Crom S (2009) An evaluation of custom microarray applications: the oligonucleotide design challenge. *Nucleic Acids Res* 37, 1726–1739.
- Leparc GG, Tuchler T, Striedner G, Bayer K, Sykacek P, Hofacker IL e Kreil DP (2009) Model-based probe set optimization for high-performance microarrays. *Nucleic Acids Res* 37: e18.
- Lewis WM, Saunders JF, Crumpaker DW e Brendecke CM (1984) Eutrophication and land use, Lake Dillon, Colorado. *Ecological Studies*. New York, v.46, 202p.
- Loy A, Lehner A, Lee N, Adamczyk J, Meier H, Ernst J et al. (2002) Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Appl Environ Microbiol* 68, 5064–5081.
- Loy A, Schulz C, Lückner S, Schöpfer-Wendels A, Stoecker K, Baranyi C, Lehner A e Wagner M (2005) 16S rRNA gene-based oligonucleotide microarray for environmental monitoring of the betaproteobacterial order ‘Rhodocyclales’. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1373–1386.
- Loy A e Bodrossy L (2006) Highly parallel microbial diagnostics using oligonucleotide microarrays. *Clin Chim Acta* 363, 106–119.
- Loy A, Taylor MW, Bodrossy L e Wagner M (2006) Applications of nucleic acid microarrays in soil microbial ecology. In: Cooper JE e Rao JR(eds) *Molecular approaches for soil, rhizosphere and plant microorganism analysis*. CAB International, Wellingford, Oxfordshire, U.K. pp 18–24.
- Loy TW, MacDonald JC Klopfenstein TJ e Erickson GE (2007) Effect of distillers grains or corn supplementation frequency on forage intake and digestibility. *J. Anim. Sci.* 85, 2625–2630.
- Lucangeli C e Bottini R (1997) Effects of *Azospirillum* spp. on endogenous gibberellins content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole. *Symbiosis* 23, 63-72.

- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32, 1363–1371.
- Lupwayi NZ, Rice WA e Clayton GW (1998) Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biol Biochem* 30, 1733-1741.
- Lynch JM (1990) *The rhizosphere*. Wiley-Interscience, Chichester, England, 458 p.
- Marschner P, Yang CH, Lieberei R e Crowley DE (2001) Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 33, 1437–1445.
- Marshall A e Hodgson J (1998) DNA chip: an array of possibilities. *Nature Biotechnol* 16, 27–31.
- Moat A G e Foster JW (1995) Nitrogen metabolism in Moat AG and Foster JW (eds) *Microbial Physiology*. Wiley-Liss, New York, pp. 436-461.
- Moisander PH, Shiue L, Steward GF, Jenkins BD, Bebout BM e Zehr JP (2006) Application of a *nifH* oligonucleotide microarray for profiling diversity of N<sub>2</sub>-fixing microorganisms in marine microbial mats. *Environ Microbiol* 8, 1721–1735.
- Moisander PH, Morrison AE, Ward BB, Jenkins BD e Zehr JP 2007 Spatial-temporal variability in diazotroph assemblages in Chesapeake Bay using an oligonucleotide *nifH* microarray. *Environmental Microbiology* 9(7), 1823–1835.
- Mougel C, Offre P, Ranjard L, Corberand T, Gamalero E, Robin C & Lemanceau P (2006) Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* gaertn. cv. jernalong line J5. *New Phytol* 170, 165–175.
- Mourad AL (2006) Principais Culturas para Obtenção de Óleos Vegetais Combustíveis no Brasil. In: 6º Congresso Internacional sobre Geração Distribuída e Energia no Meio Rural. Anais do AGRENER GD. Campinas: NIPE/UNICAMP v. CD-Rom. p. 1-10.
- Neufeld JD, Mohn WW e de Lorenzo V (2006) Composition of microbial communities in hexachlorocyclohexane (HCH) contaminated soils from Spain revealed with a habitat-specific microarray. *Environ Microbiol* 8, 126–140.
- Neves MCP e Rumjanek NG (1998) Ecologia das Bactérias Diazotróficas nos Solos Tropicais. In: Melo IS e Azevedo JL (eds) *Ecologia Microbiana*. EMBRAPA – CNPMA, Jaguariúna, pp.15-60.
- Newton WE (2000) Nitrogen fixation in perspective. In: Pedrosa FO, Hungria M, Yates MG e Newton WE (eds) *Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.3-8.
- Nogueira MA, Albino UB, Brandão-Junior O, Braun G, Cruz MF, Dias BA, Duarte RTD, Gioppo NMR, Menna P, Orlandi JM, Raimam MP, Rampazzo LGL, Santos MA, Silva MEZ, Vieira FP, Torezan JMD, Hungria M e Andrade G (2006) Promising indicators for assessment of agroecosystems alteration among natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. *Agric. Ecosyst. Environ.* 115, 237–247.
- Okon Y e Labandera-González CA (1994) Agronomic applications of *Azospirillum*. In: Ryder MH, Stephens PM e Bowen GD (eds) *Improving plant productivity with rhizosphere bacteria*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Adelaide, pp. 274-278.
- Omeregíe EO, Crumbliss LL, Bebout BM e Zehr JP (2004a) Comparison of diazotroph community structure in *Lyngbya* sp. & *Microcoleus chthonoplastes* dominated

- microbial mats from Guerrero Negro, Baja, Mexico. *FEMS Microbiol Ecol* 47, 305–318.
- Omeregíe EO, Crumbliss LL, Bebout BM e Zehr JP (2004b) Determination of nitrogen-fixing phylotypes in *Lyngbya* sp. & *Microcoleus chthonoplastes* cyanobacterial mats from Guerrero Negro, Baja, Mexico. *Appl Environ Microbiol* 70, 2119–2128.
- Øvreås L (2000) Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecol Lett* 3, 236–251.
- Pace NR (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276, 734–740.
- Palmer C, Bik EM, Eisen MB, Eckburg PB, Sana TR, Wolber PK et al. (2006) Rapid quantitative profiling of complex microbial populations. *Nucleic Acids Res* 34: e5.
- Patten CL e Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42, 207–220.
- Patten CL e Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl Environ Microbiol* 68, 3795–3801.
- Paul EA e Clarck FE (1989). Reduction and transport of nitrate. p. 81–85. In *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, New York.
- Peplies J, Chun Kwan Lau S, Pernthaler J, Amann R e Glöckner FO (2004) Application and validation of DNA microarrays for the 16S rRNA-based analysis of marine bacterioplankton. *Environ Microbiol* 6, 638–645.
- Piao CG, Tang WH e Chen YX (1992) Study on the biological activity of yield-increasing bacteria. *Chin J Microecol* 4, 55–62.
- Polen T, Rittmann D, Wendisch VF e Sahn H (2003) DNA microarray analyses of the long-term adaptive response of *Escherichia coli* to acetate and propionate. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1759–1774.
- Raven PH, Evert RF e Eichhorn SE (1996) Regulação do crescimento e do desenvolvimento: os hormônios vegetais. In: Raven PH, Evert RF e Eichhorn SE (eds) *Biologia Vegetal*. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, pp.508–533.
- Raymond J, Siefert JL, Staples CR e Blankenship RE (2004) The natural history of nitrogen fixation. *Mol Biol Evol* 21, 541–554.
- Religio A, Schwager C, Richter A, Ansorge W e Valcarcel J (2002) Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 30: e51.
- Rhee SK, Liu X, Wu L, Chong SC, Wan X e Zhou J (2004) Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays. *Appl Environ Microbiol* 70, 4303–4317.
- Rivas R, Mateos PF, Martinez-Molina E e Velazquez E (2005) *Paenibacillus xylanilyticus* sp. nov., an airborne xylanolytic bacterium. *Int. J Syst Evol Microbiol* 55, 405–408.
- Rodríguez H e Fraga R (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* 17, 319–339.
- Roh SW, Abell GCJ, Kim K-H, Nam Y-D e Bae J-W (2010) Comparing microarrays and next-generation sequencing technologies for microbial ecology research. *Trends Biotechnol* 28, 291–299.
- Rosado A, Duarte GF, Seldin L e van Elsas JD (1998) Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR- amplified gene fragments. *Appl Environ Microbiol* 64, 2770–2779.

- Rovira AD (1965) Interactions between plant roots and soil micro-organisms. *Annu Rev Microbiol* 19, 241–266.
- Sambrook J e Russel DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanguin H, Herrera A, Oger-Desfeux C, Dechesne A, Simonet P, Navarro E, Vogel TM, Moenne-Loccoz Y, Nesme X e Grundmann GL (2005) Development and validation of a prototype 16S rRNA-based taxonomic microarray for Alphaproteobacteria. *Environmental Microbiology* 8, 289–307.
- Saxena B, Modi M e Modi VV (1986) Isolation and characterization of siderophores from *Azospirillum lipoferum* D-2. *J Gen Microbiol* 132, 2218-2224.
- Savage RS, Heller K, Xu Y, Ghahramani Z, Truman WM, Grant M, Denby KJ e Wild DL (2009) R/BHC: fast Bayesian hierarchical clustering for microarray data. *BMC Bioinformatics*, 10, 242.
- Schena M, Shalon D, Davis RW e Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467–470.
- Sessitsch, A., Hackl, E., Wenzl, P., Kilian, A., Kostic, T., Stralis-Pavese, N., et al. (2006) Diagnostic microbial microarrays in soil ecology. *New Phytol* 171, 719–736.
- Shah S, Karkhanis V e Desai A (1992) Isolation and characterization of siderophore, with antimicrobial activity, from *Azospirillum lipoferum*. *M.Curr Microbiol* 25, 347–351.
- Shalon D, Smith SJ e Brown PO (1996) A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 6, 639-645.
- Siciliano SD e Germida JJ (1999) Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29, 263-272.
- Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S, Roskot N, Heuer H & Berg G (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol* 67, 4742–4751
- Soares RA, Roesch LF, Zanatta G, Camargo FAO, e Passaglia LMP (2006) Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. *Applied Soil Ecology* 33, 221-234.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, et al. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12115–12120.
- Sørensen J (1997) The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms, p. 21–45. In J. D. Van Elsas, J. T. Trevors, and E. M. H. Wellington (ed.), *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Srinivazan M, Peterson DJ e Holl FB (1996) Influence of AIA producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli*. *Can J Microbiol* 42, 1006-1014.
- Steppe TF e Paerl HW (2002) Potential N<sub>2</sub> fixation by sulfate-reducing bacteria in a marine intertidal microbial mat. *Aquat Microbial Ecol* 28, 1–12.
- Steward GF, Jenkins BD, Ward BB e Zehr JP (2004) Development and testing of a DNA macroarray to assess nitrogenase (nifH) gene diversity. *Appl Environ Microbiol* 70, 1455-1465.

- Tang W, Pasternak JJ e Glick BR (1994) Stimulation of canola root growth by *Pseudomonas putida* GR 12-2 and its genetically engineered derivatives. *Life Sci Adv* 13, 89-95.
- Taroncher-Oldenburg G, Griner EM, Francis CA e Ward BB (2003) Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Appl Environ Microbiol* 69, 1159-1171.
- Tien TM, Gaskins MH e Hubbell DH (1979) Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl Environ Microbiol* 37, 1016-1024.
- Tiquia SM, Wu L, Chong SC, Passovets S, Xu D, Xu Y e Zhou J (2004) Evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in environmental samples. *Biotechniques* 36, 664-670.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F e Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24, 4876-4882.
- Urakawa H, et al. (2003) Optimization of single-base-pair mismatch discrimination in oligonucleotide microarrays. *Appl Environ Microbiol* 69, 2848-2856.
- Vandendergh PA e Gonzalez CF (1984) Methods for protecting the growth of plants employing mutant siderophore producing strains of *Pseudomonas putida*. US Patent No. US4 479936.
- Verma SC, Ladha JK e Tripathi AK (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J Biotechnol* 91, 127-141.
- Voordouw G (1998) Reverse sample genome probing of microbial community dynamics. *ASM News*, 64: 627-633.
- Vora GJ, Meador CE, Stenger DA e Andreadis JD (2004) Nucleic acid amplification strategies for DNA microarray-based pathogen detection. *Appl Environ Microb* 70, 3047-3054.
- Wagner M, Smidt H, Loy A e Zhou J (2007) Unravelling microbial communities with DNA-Microarrays: challenges and future directions. *Microb Ecol* 53, 498-506.
- Wang X e Seed B (2003) Selection of oligonucleotide probes for protein coding sequences. *Bioinformatics* 19, 796-802.
- Wardle DA (1998) Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: a global-scale synthesis. *Soil Biol. Biochem* 30, 1627-1637.
- Warnecke F, Luginbuhl P, Ivanova N, Ghasssemian M, Richardson TH, Stege JT *et al* (2007) Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* 450, 560-5.
- Weiland JJ e Sundsbak JL (2000) Differentiation and detection of sugar beet fungal pathogens using PCR amplification of actin coding sequences and the ITS region of the rRNA gene. *Plant Dis* 84, 475-482
- West TO e Post WM (2002) Soil organic carbon sequestration rates by tillage and crop rotation: a global data analysis. *Soil Science Society of America Journal* 66, 1930-1946.
- Whitman WB, Coleman DC e Wiebe WJ (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6578-6583.
- Widmer F, Shaffer BT, Porteous LA e Seidler RJ (1999) Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a douglas fir forest site in the Oregon cascade mountain range. *Appl Environ Microbiol* 65: 374-380.
- Wilson KH et al. (2002) High-density microarray of small-subunit ribosomal DNA probes. *Appl Environ Microbiol* 68, 2535-2541

- Wodicka L, Dong H, Mittman M, Ho MH e Lockhart DJ (1997) Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* 15, 1359-1367.
- Wu L, Thompson DK, Li G, Hurt RA, Tiedje JM e Zhou J (2001) Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl Environ Microbiol* 67, 5780-5790.
- Wu L, Thompson DK, Liu X, Fields MW, Bagwell CE, Tiedje JM e Zhou J (2004) Development and evaluation of microarray-based whole-genome hybridization for detection of microorganisms within the context of environmental applications. *Environmental Science and Technology* 38, 6775–6782.
- Wu L, Kellogg L, Devol AH, Tiedje JM e Zhou J (2008) Microarray-based characterization of microbial community functional structure and heterogeneity in marine sediments from the Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol* 74, 4516-4529.
- Wylie P, Doube BM, Gupta VSSR, Grace PR e Pankhurst CE (1994) Indicators of sustainable cropping systems. In: (Eds.) *Soil Biota-Management in Sustainable Farming Systems*. CSIRO, Australia, pp. 224-229.
- Yergeau E, Kang S, He Z, Zhou J e Kowalchuk GA (2007) Functional microarray analysis of nitrogen and carbon cycling genes across an Antarctic latitudinal transect. *ISME J* 1, 163-179.
- Young JPW (1992) In Stacey G, Burris RH e Evans HJ, eds. *Biological Nitrogen Fixation* pp 43-86, Chapman and Hall, New York, USA.
- Young JPW (1993) Molecular phylogeny of rhizobia and their relatives. In: Palacios R, Mora J e Newton, WE (Ed). *New horizons in nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers, London, p. 587-592.
- Zani S, Mellon MT, Collier JL e Zehr JP (2000) Expression of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR. *Appl Environ Microbiol* 66, 3119-3124.
- Zakharova EA, Shcherbakov AA, Brudnik VV, Skripko NG, Bulkhim NS e Ignatov VV (1999) Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: insights from quantum chemistry. *European Journal of Biochemistry* 259, 572-576.
- Zehr JP, Braun S, Chen Y e Mellon M (1996) Nitrogen fixation in the marine environment: relating genetic potential to nitrogenase activity. *J Exp Mar Biol Ecol* 203, 61-73.
- Zehr JP, Mellon M, Braun S, Litaker W, Steppe T e Paerl HW (1995) Diversity of heterotrophic nitrogen-fixation genes in a marine cyanobacterial mat. *Appl Environ Microbiol* 61, 2527–2532.
- Zehr JP, Carpenter EJ e Villareal TA (2000) New perspectives on nitrogen-fixing microorganisms in tropical and subtropical oceans. *Trends Microbiol* 8, 68-73.
- Zehr JP, Jenkins BD, Short SM e Steward GF (2003) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol* 5, 539-554.
- Zhang L, Hurek T, e Reinhold-Hurek B (2007) A *nifH*-based oligonucleotide microarray for functional diagnostics of nitrogen-fixing microorganisms. *Microb Ecol* 53, 456-470.
- Zhou J e Thompson DK (2002) Challenges in applying microarrays to environmental studies. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 204–207.
- Zhou J (2003) Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curr Opin Microbiol* 6, 288–294.
- Zhou J, Kang S, Schadt CW e Garten CT (2008) Spatial scaling of functional gene diversity across various microbial taxa. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 7768-7773.

## 6 Anexos (Tabelas dos oligonucleotídeos)

**Tabela A.1.** Oligonucleotídeos utilizados como controles positivos ou negativos no microarranjo.

Número de acesso no GenBank	Gênero/Espécie	Nt posição +24 nt	Nome dos Oligos	Sequência dos Oligos (25-mer)	Resultado do Blast	%GC	Tm Basica °C
M23944	<i>Mycoplasma neurolyticum</i>	1445-1470	16SC1	CCTCGGAGGCAACTATCTAAGGTAG	2,00E-04	52	59
AB054808	<i>Oenococcus oeni</i>	33-58	16SC2	AGCCGCTGAATTGTCTTCGGGTGA	2,00E-04	56	61
M58795	<i>Saprosira grandis</i>	1445-1470	16SC3	AGGAGCTATCTAGGGTAAACCTGGT	2,00E-04	48	58
M59177	<i>Fervidobacterium nodosum</i>	802-827	16SC4	GGGGCCGGAAGGCTCCGTGCTGAAG	2,00E-04	72	68
X03428	<i>Caulobacter vibrioides</i>	253-278	16SC5	TAGCTCCTAACCTGCTAAGGGGGCT	2,00E-04	56	61
NC_000913	<i>Escherichia coli str. K-12</i>	1456-1481	16SC6	AGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCA	2,00E-04	48	58
UNIV1389A	BACTERIA	Loy et al 2005	16SC7	ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGG	nifH não específico	72	68
UNIV1389B	EUCARYA	Loy et al 2005	16SC8	ACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGG	18S	64	64
UNIV1389C	ARCHEA	Loy et al 2005	16SC9	ACGGGCGGTGTGTGCAAGGAGCAGG	2,00E-04	68	66
EUB338	MOST BACTERIA	Loy et al 2005	16SC10	GCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACC	2,00E-04	68	66
BETA1	BETAPROTEOBACTERIA	Ashelford et al 2002	16SC11	CCCATTGTCCAAAATCCCCACTGC	2,00E-04	52	59
BETA2	BETAPROTEOBACTERIA	Ashelford et al 2002	16SC12	TGATATCTACGCATTTCACTGCTAC	2,00E-04	40	54
RHC143	MOST BACTERIA	Loy et al 2005	16SC13	TCGCTACGTTATCCCCACTTCTGG	2,00E-04	56	61
UNIV1390	DOMAIN BACTERIA	Loy et al 2007	16SC14	GACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGG	2,00E-04	72	68
ALF968	ALPHAPROTEOBACTERIA, EXCEPT OF RICKETTSIALES	Loy et al 2007	16SC15	GGTAAGGTTCTGCGGTTGCTTCGA	2,00E-04	56	61
DELTA495A	MOST DELTAPROTEOBACTERIA AND MOST GEMMATIMONADETES	Loy et al 2007	16SC16	AGTTAGCCGGTGCTTCCTTTGATGG	nifH não específico	52	59

ENT	GAMMAPROTEOBACTERIA	ProbeBase (Loy et al 2007)	16SC17	CCCCCWCTTTGGTCTTGCGACGTTA	nifH não específico	58	61
ALF1B	ALPHAPROTEOBACTERIA, SOME DELTAPROTEOBACTERIA, SPIROCHAETES	ProbeBase (Loy et al 2007)	16SC18	CGTTCGYTCTGAGCCAGGATCAAAC	nifH não específico	54	59
ALF73A	SOME ALPHAPROTEOBACTERIA	ProbeBase (Loy et al 2007)	16SC19	TTCCGTCTAACCGGGGTACTGCA A	6,00E-05	57. 7	63
AZA1006	Most members of the Azoarcus cluster	PROBEBASE (LOY ET AL., 2007)	16SC20	TCCCTGATCTCTCAAGGATTCAGC C	6,00E-05	53. 8	61
KO 12	Many Pseudomonas species	ProbeBase (Loy et al 2007)	16SC21	AGCGCCCGTTTCCGGACGTTATCCC C	6,00E-05	65. 4	66
EUB927	most Bacteria	ProbeBase (Loy et al 2007)	16SC22	ATGCTCCACCGCTGTGCGGGCCCC C	6,00E-05	73	69
BC007659	Homo sapiens NAD(P)H dehydrogenase	696-721	HspNAD	TGGGCACACTCCAGCAGACGCCGA	2,00E-04	68	66
BC008972	Homo sapiens centromere protein N	456-481	HspCEN	TACTCCCAGACTCCGTACGCCTCA	2,00E-04	56	61
BC002599	Homo sapiens corticotropin releasing hormone	694-719	HspCRH	GGAAATGGCCAGGGCCGAGCAGTTA	2,00E-04	60	63
BC065005	Homo sapiens mitochondrial ribosomal protein L14	286-311	HspRPL14	GCACTGCATGCCTGGCCCCGAATG	2,00E-04	68	66
BC004236	Homo sapiens ubiquitin- conjugating enzyme E2S	849-874	HspUbE2	GGGCTCTCTTCCTCCTCCACCGTG	2,00E-04	64	64
BC015569	Homo sapiens ADP- ribosylation-like factor 6 interacting protein 4	650-675	HspADPin t	CCATCCGCCCCAGCTCTGTTTGTG	2,00E-04	64	64
XM 310115	Anopheles gambiae	421-446	Angamb	GTAGCCGGGAAATTAAGAAGCACCA	2,00E-04	48	58
<b>TOTAL</b>				<b>29 PRIMERS</b>			<b>54-69</b>



**Tabela A.2.** Oligonucleotídeos baseados em sequências de genes 16S rRNA de bactérias diazotróficas

Número de acesso no GenBank	Gênero/Espécie	Nt posição +24 nt	Nome dos Oligos	Sequência dos Oligos (25-mer)	Resultado do Blast	%GC	Tm Basica °C
FJ458451	<i>Bacillus licheniformis</i>	15-40	16S1	AGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTT	2,00E-04	52	59
DQ338443	<i>Paenibacillus forsynthia</i>	457-482	16S2	GTCTGTAGAGTAACGTCTACAAGA	2,00E-04	40	54
AJ011322	<i>Paenibacillus borealis</i>	63-88	16S3	GTTTGAATGGAAGCTTGCTTCCATT	2,00E-04	40	54
		179-204	16S4	TTTCTTTCCTCTCCTGAAGAGAGAA	2,00E-04	40	54
		459-484	16S5	GTCCGGTAGAGTAACGTCTACCGGA	2,00E-04	56	61
EF199999	<i>Paenibacillus odorifer</i>	65-90	16S6	TATTTTGAAAGCTTGTCTTCAAAT	2,00E-04	24	48
		179-204	16S7	TTTCTTTTTTCTCCTGAGAGAAGAA	2,00E-04	32	51
FJ436049	<i>Burkholderia sp.:</i>	62-87	16S8	GCAGCACGGGTGCTGCACCTGGTG	2,00E-04	68	66
		440-465	16S9	AAATCCTTGTTCTAATACAGCCGG	2,00E-04	44	56
		188-213	16S10	CGGGGGACCTTCGGGCTCGCGCTA	2,00E-04	76	69
CP000271	<i>Burkholderia xenovorans</i>	23-48	16S11	CAGCACGGGGCAACCCTGGTGGCG	2,00E-04	76	69
		403-428	16S12	CTCTGCCCTAATACGGTGGGGGAT	2,00E-04	60	63
EU239151	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	358-383	16S13	GAAACGGTTTTGGCTAATATCCAAG	2,00E-04	40	54
CP001013	<i>Leptothrix cholodnii</i>	63-88	16S14	AGAGGAGCAATCCTCGAGAGTGGCG	2,00E-04	60	63
CP000529	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	63-88	16S15	TAACGGGTTAAGCCGACGAGTGGCG	2,00E-04	60	63
		436-461	16S16	GCCAGCCCTAATACGCAGGCCCAT	2,00E-04	64	64
NC008702	<i>Azoarcus sp.</i>	69-94	16S17	CAGCGGGGGCTTCGGCCCGCGCGG	2,00E-04	88	74
FJ418698	<i>Rhizobium sp.</i>	40-65	16S18	GCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGG	2,00E-04	80	71
CP000144	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	68-93	16S19	AAGTCTTCGGACTTAGCGGCGGACG	2,00E-04	60	63
		1230-1255	16S20	GGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAA	16S não específico	60	63
CP000494	<i>Bradyrhizobium sp</i>	66-91	16S21	GCGGGCGTAGCAATACGTGAGCGGC	2,00E-04	68	66
CP001197	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	170-195	16S22	TCCGATTTACATTTCGGGGGAAAG	2,00E-04	48	58
NC011206	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans:</i>	95-120	16S23	TGAGCCCTGAGGGGAAAGCGGGGG	2,00E-04	72	68
NC008789	<i>Halorhodospirilla halophila:</i>	173-198	16S24	TACGCCCTACGGGGGAAAGTGGGCC	2,00E-04	68	66
CU234118	<i>Bradyrhizobium sp</i>	1158-1183	16S25	CCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S não específico	68	66

FJ459994	Spingobacterium multivorum:	1152-1177	16S26	TACGTCCGGGGCTACACACGTGCTA	2,00E-04	60	63
FJ436371	Bradyrhizobium elkanii	762-787	16S27	TGCCAGCCGTTAGTGGGTTTACTCA	2,00E-04	52	59
NC003272	Nostoc sp.	782-807	16S28	TTGTATCGACCCGAGCCGTGCCGGA	2,00E-04	64	64
AE017282	Methylococcus capsulatus:	444-469	16S29	GGGTGGGGTGTAAATACCATCTCAC	2,00E-04	52	59
NC011761	Acidithiobacillus ferrooxidans:	423-448	16S30	AAGGTGGGTCTTAATACAATCTGCT	2,00E-04	40	54
CP000304	Pseudomonas stutzeri	449-474	16S31	ACTTAACCCAACATCTCACGACACG	16S não específico	48	58
FJ032011	Azotobacter vinelandii	411-436	16S32	CGCTCGGTGAATACCCAGGCGTCTT	2,00E-04	60	63
AB185396	Azospirillum oryzae	184-209	16S33	TGAGAGGGGCCGCGTCGGATTAGG	2,00E-04	68	66
NC009921	Frankia sp.	191-216	16S34	TTTATCGGCTTGGGATGGGCCCGCG	2,00E-04	64	64
EU669179	Agrobacterium sp.	61-86	16S35	GACGGGTGAGTAACCGGTGGGAATC	2,00E-04	60	63
CP000943	Methylobacterium sp	61-86	16S36	CAGACGGGTGAGTAACCGGTGGGAA	16S não específico	60	63
CP000230	Rhodospirillum rubrum	62-87	16S37	GCACGGGTGAGTAACCGTGGGAAC	16S não específico	60	63
NC009617	Clostridium beijerinckii	138-163	16S38	GCCTTTCGAAAGGAAGATTAATACC	2,00E-04	40	54
AE001437	Clostridium acetobutylicum	185-210	16S39	TGATTCTTGAGCCAAAGGATTTATT	2,00E-04	32	51
		1217-1242	16S40	AAAAAGATGCAATATCGCAAGGTGG	2,00E-04	40	54
D11342	Azorhizobium caulinodans	959-984	16S41	AGCAATGGACCTGCACACAGGTGCT	2,00E-04	56	61
CP001016	Beijerinckia indica	939-964	16S42	TTTGGTTACCAGAGATGGTTTCCTT	2,00E-04	40	54
		1377-1402	16S43	TTTTGCTAACCGCAAGGGGGCAGGC	2,00E-04	60	63
FJ005053	Ochobactrum sp.	914-939	16S44	GGTCGCGGACACAGAGATGTGTCTT	2,00E-04	56	61
FJ418697	Mesorhizobium sp.	24-49	16S45	CCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGG	2,00E-04	80	61
		933-958	16S46	TGGACCGGTGACAGGTGCTGCATGG	2,00E-04	64	64
NR_024738	Asaia siamensis	153-178	16S47	GGCGCAAGTCGCTGTGGAGGAGCC	2,00E-04	72	68
		1054-1079	16S48	CGTTTGGGTGGGCACTCTAGAGGAA	2,00E-04	56	61
AB470921	Gluconobacter frateurii	933-958	16S49	CTGTCTGCTAGCTCGTGTGCTGAGAT	16S não específico	56	61
AB470918	Acetobacter pausterianus:	584-609	16S50	GGGTTGTGGAATCCCAAGTGTAGAG	2,00E-04	52	59
Y12369	Chromatium minutissimum	1418-1443	16S51	GCGTTTACCACGGTGTGGTCAATGA	2,00E-04	52	59
CP000806	Cyanothece sp.	954-979	16S52	TTCTTCAAAGGGAAAGGTGCCTTCG	2,00E-04	52	59

AB089482	<i>Derxia gummosa</i>	67-92 438-463	16S53 16S54	GGGGCAACCTGGTGGCGAGTGGCG CGGCGCTGGTTAATACCTAGCGCTA	2,00E-04 16S não especifico	52 56	69 61
EU693564	<i>Enterobacter</i> sp.	187-212 601-626 957-982	16S55 16S56 16S57	TCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTG GGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA TCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT	2,00E-04 2,00E-04 2,00E-04	60 52 56	63 59 61
FJ482128	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	36-61 541-566	16S58 16S59	TGATGGAGGGGATAACTACTGGAA GAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTA	2,00E-04 2,00E-04	48 48	58 58
FJ418690	<i>Sinorhizobium fredii</i>	898-923 928-953	16S60 16S61	TCGCGGATACGAGAGATCGTATCCT TCGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTG	2,00E-04 2,00E-04	52 64	59 64
CP001280	<i>Methylocella silvestris</i>	925-950	16S62	CTTGACATGTCCGGTTTGGTTTCCA	2,00E-04	48	58
CP000250	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	109-134 219-244	16S63 16S64	AGAACCAACTCCCATGGTGTGACGG GCAGACTCCAATCCGAACTGAGACG	16S não especifico 16S não especifico	56 56	61 61
AP007255	<i>Magnetospirillum magneticum</i>	401-426 955-980	16S65 16S66	CACCCACGACGATGATGACGGTAGT GGTGACTTGCTTCCGACGCGTCCA	2,00E-04 2,00E-04	56 60	61 63
NC_011729	<i>Cyanothece</i> sp	946-971	16S67	CCCCTGGAACAGGGGGTGCCTT	2,00E-04	64	64
CP000781	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	66-91 769-794	16S68 16S69	GCAATGGGAGCGGCAGACGGGTGAG AGGCAGCTTGCTGCTTAGTGGCGCA	2,00E-04 2,00E-04	68 60	66 63
CP000463	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	65-90	16S70	GTAGCAATACGTGAGTGGCAGACGG	2,00E-04	56	61
FJ544403	<i>Sphingobacterium composti</i>	45-70 185-210	16S71 16S72	GCTTGCTCTAATGTGGTGAGAGTGG TAGGATATGGATGGGCTCGCGTGAC	16S não especifico 2,00E-04	52 56	59 61
FJ459994	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	407-432	16S73	TAAATACGTGTATTTAGCTGAATGT	2,00E-04	28	49
AY167837	<i>Sphingobacterium</i> sp.	192-217	16S74	GGGGATCTGAGAGGATGACCCCCCA	16S não especifico	64	64
FJ194520	<i>Sphingobacterium mizutaii</i>	145-170	16S75	GACACTGCTTCCGGCATCGGGAGG	2,00E-04	64	64
AB089482	<i>Derxia gummosa</i>	1002-1027	16S76	TGGGGTGCCTGAAAGGGAGCCGGG	2,00E-04	76	69
FJ821603	<i>Ralstonia</i> sp.	25-50 401-426	16S77 16S78	TCTAGCTTGCTAGATTGGTGGCGAG TGGCTCTGGTTAATACCTGGGGTCCG	2,00E-04 2,00E-04	52 56	59 61
FJ529718	<i>Phaeospirillum</i> sp.	733-758 1040-1065	16S79 16S80	TAGACGTGGGAGGCTTGCCCTCTCG TCACTTCTAGGTGGGCACTCTGAAG	2,00E-04 2,00E-04	64 52	64 59
FJ461751	<i>Oscillatoria</i> sp	781-806	16S81	TGTTGTCTGTATCGACCCGGACAGT	2,00E-04 2,00E-04	52 40	59 54

		1082-1107	16S82	TCATTAAGTTGGGCACTCTAACAG			
AY995198	Methylomonas rubra	803-828	16S83	CGCTTAAGTGCTTAGTGGTGGAGCT	2,00E-04	52	59
EU275145	Methylocystis sp	750-775	16S84	CGATGGATGCTAGCCGTTGGGGAGC	2,00E-04	64	64
		956-981	16S85	TTCTTCCCGCAAGGGGCCGGTGAC	2,00E-04	68	66
<b>TOTAL</b>				<b>85 PRIMERS</b>			<b>48-74</b>

**Tabela A.3.** Oligonucleotídeos baseados em sequências de genes *nifD* de bactérias diazotróficas.

GENBANK ACCESSION NUMBER	Gênero/Espécie	NT posição +24 NT	Nome dos oligos	Sequência dos Oligos (25-mer)	Resultado do Blast	% GC	Tm Basic a °C
NC_009617-1	<i>Clostridium beijerinckii</i>	1-26	nifD1	ATGAGTAAAGTTGATAGTGTTTTGG	2,00E-04	32	51
NC_009617-2	<i>Clostridium beijerinckii</i>	585-610	nifD2	TATGGATTACACACCAAAAACATCAT	2,00E-04	32	51
AE001437	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	1-26	nifD3	ATGAAGAATATACCTGAAAAGATTT	2,00E-04	24	48
CP001197	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	1-26	nifD4	ATGGCTTTGAAGCACAAAGCATCC	2,00E-04	48	58
		117-142	nifD5	GAAGGACGGCGACGTGGTGCCCGAG	2,00E-04	72	68
NC_008702	<i>Azoarcus</i> sp	115-140	nifD6	ATCACCCAGTCGAAGAAGTGCATCA	2,00E-04	48	58
		989-1014	nifD7	ACAAGCCGATGATGCAAGCCGTCAT	2,00E-04	52	59
CP000304	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	8-33	nifD8	GTATGTCCCAGGAGAGGTGGAATC	2,00E-04	56	61
		111-136	nifD9	GGCGCTTGAGCAATCGAAGAAATGC	2,00E-04	52	59
NC_011283	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8-33	nifD10	ACGCAACAGGGCAACGTAACTTGC	2,00E-04	56	61
		111-136	nifD11	GCAGATGGAGAGCGTCGGCAAGTGC	2,00E-04	64	64
CP000544	<i>Halorhodospira halophila</i>	13-38	nifD12	ACGCAGGAAGAGGCCAGGCGGTGA	2,00E-04	68	66
		635-660	nifD13	ACGGCCGCCAGGCCGGCCCTACGA	2,00E-04	80	71
NC_009921	<i>Frankia</i> sp	4-29	nifD14	ACGACGACTCCGGCTCCGACGCGG	2,00E-04	76	69
		1087-1112	nifD15	ACCATCGGCGCTACGAGGACCTCG	2,00E-04	68	66
NC_011365	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	6-31	nifD16	TCTGGATGAAGACAAGACCAACGAT	2,00E-04	44	56
		124-149	nifD17	CAAGCCGAAGCCGAGGCGCAGGACG	2,00E-04	72	68
		682-707	nifD18	AAGCACGCGGCTTCGAGACGACGC	2,00E-04	68	66
NC_002678	<i>Mesorhizobium loti</i>	25-50	nifD19	GGCGCTTGCATGCGAAGCTTATCG	2,00E-04	56	61
		118-143	nifD20	AGCAAGGACGAGGCCGGGGGAGG	2,00E-04	76	69
		1473-1498	nifD21	GGACGCGCCCGCAGCGGGTCCGCC	2,00E-04	88	74
U00090	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	118-143	nifD22	GACCGCGAGGCGGTTCGGGAGGAGG	2,00E-04	80	71
		664-689	nifD23	GGCAAGACGGACGTTCGAGTTCCGAAA	2,00E-04	56	61
AE006469	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	33-58	nifD24	GCACGAGAAGCTTATCGAAGAAGTG	2,00E-04	48	58
		118-143	nifD25	AACAAGCAGGAGACCGCCGAGGAAG	2,00E-04	60	63
CP000943	<i>Methylobacterium</i> sp	21-46	nifD26	CGACGGCGCACTCCACGAGAAGATC	2,00E-04	64	64
		114-139	nifD27	CACCCCGCCGGCGCCGAGGAGACC	2,00E-04	84	72
CP000613	<i>Rhodospirillum centenum</i>	159-184	nifD28	TACCGACCAGCCGGTGACCGAGTGC	2,00E-04	68	66
		1483-1508	nifD28	GACGTCATGCCGGCCGTGCCGAGT	2,00E-04	72	68

AP007255	Magnetospirillum magneticum	117-142	nifD30	GACCGAAGAGAACGGCACCCCGACC	2,00E-04	68	66
CP000230	Rhodospirillum rubrum	24-49	nifD31	TGCGGAATTGAGCCAGAAGGGGATC	2,00E-04	56	61
		116-141	nifD32	TTGCCGAGGGCGAGGGCAGCTCTTG	2,00E-04	68	56
CP000577	Rhodobacter sphaeroides	14-39	nifD33	TCGCTGACTCTGCCGAGACCAACAT	2,00E-04	56	61
		118-143	nifD34	CCCGTCGCCGAGGCCGAACCCGGCC	2,00E-04	84	72
AZSFEFEMO	A.brasilense	5-30	nifD35	GCCTGTCCGTGAACGAAGGCGTCGA	2,00E-04	64	64
		116-141	nifD36	CCGAGGCCAAGGACTGCGGGCTCAA	2,00E-04	68	66
AE017282	Methylococcus capsulatus	60-85	nifD37	TGAGGTTTATCCCGACAAGACGGCC	2,00E-04	56	61
		523-548	nifD38	TACAGCGCAAGACCATCGTTCCCG	2,00E-04	60	63
Z54207	H.seropedicae	513-538	nifD39	GTCCAAGCAATACGAGGGCCATACC	2,00E-04	56	61
		639-664	nifD40	CCCGACAAGAACCAGTTTGTGGCG	2,00E-04	60	63
NC_009254	Burkholderia vietnamiensis	21-46	nifD41	GCGCAAGCCCGGAACAAGGCCCTG	2,00E-04	72	68
		102-127	nifD42	TTGGGTACCTTCGAGGAGGGCAAG	2,00E-04	56	61
		639-664	nifD43	TCCCACAAGCGCCCGCGTTCGAA	2,00E-04	68	66
CP000529	Polaromonas naphthalenivorans	527-552	nifD44	TTGGCAAGACCATCGTCCCGTGCG	2,00E-04	60	63
CP001013	Leptothrix cholodnii	1434-1459	nifD45	TGCCAAGGCCCGTGGAAGAGCTG A	2,00E-04	64	64
NC_011004	Rhodopseudomonas palustris	19-44	nifD46	GAATCCCCCGGGACATCAAGGAAC	2,00E-04	60	63
		650-675	nifD47	GCGAGAAGAATGCCGGTTCAGTC	2,00E-04	60	63
CP000463	Rhodopseudomonas palustris	526-551	nifD48	TCGAAGGATCTCGGCGCAAGCCGA	2,00E-04	64	64
NC_009937	Azorhizobium caulinodans	7-32	nifD49	GTGTACAGCCTCAGACCGTTGAGG	2,00E-04	60	63
		117-142	nifD50	GAACGTGCACGAGGCCGCAAGTCG	2,00E-04	68	66
		1194-1219	nifD51	GGCCAGCACTACGTCAAGGATGGC	2,00E-04	64	64
CP000781	Xanthobacter autotrophicus	9-34	nifD52	GGCCCAACCGCAAAGCGTTGCTGAA	2,00E-04	60	63
CP000494	Bradyrhizobium sp	9-34	nifD53	TATCGAGAAACAAGCGTTGCCGAG	2,00E-04	48	58
		651-676	nifD54	GGCCGACGCCGCGCCGGTTCGAG	0,048	84	72
NC_010581	Beijerinckia indica	10-35	nifD55	TCGGCACCCGAAACAATCGAAGAAA	2,00E-04	48	58
		1434-1459	nifD56	TTGGGGTTTGACCAAGGCTCCGTTC	2,00E-04	56	61
NC_004463	Bradyrhizobium japonicum	6-31	nifD57	TCTCGCCACGACCAACAGCGTCGCA	2,00E-04	64	64
NC_011206	Acidithiobacillus ferrooxidans	5-30	nifD58	GCATTACCGCTGAAGAAACCCGGGA	0,048	56	61
NC_011729	Cyanothece sp.	8-33	nifD59	CGGTAGATGACAGAAAGCAGTTAAT	2,00E-04	40	54
		939-964	nifD60	TACGATTAAAGAAAATGCAAGACGA	2,00E-04	32	51
NC_003272	Nostoc sp.	7-32	nifD61	CCTCCTGAAAACAAGAACTTTGTAG	2,00E-04	40	54

CP001280	Methylocella silvestris	9-34	nifD62	TAATACTCTTCTCCCCAGCAACGC	2,00E- 04	52	59
<b>TOTAL</b>				<b>62 PRIMERS</b>			<b>48-74</b>

**Tabela A.4.** Oligonucleotídeos baseados em sequências de genes *nifH* de bactérias diazotróficas.

Número de acesso no GenBank	Gênero/Espécie	Nt posição +24 nt	Nome dos Oligos	Sequência dos Oligos (25-mer)	Resultado do Blast	% GC	Tm Basica °C
AY728387	Cyanobacterium sp.	829-854	nifH1	ATCAGAAAGCTATCCAAGCTGACCA	2,00E-04	44	56
NC011729	Nostoc sp.	852-877	nifH2	GACATGGCTACCCAAGCCCTCACAA	2,00E-04	56	61
		383-408	nifH3	TTGTTTGGCGTGGTTTCGCTATGCC	2,00E-04	52	59
AY620241	Cianothece sp.	110-135	nifH4	TTTGA AACATCAAGTGCCTAGAAT	2,00E-04	32	51
NC003272	Nostoc sp.	833-858	nifH5	CGACGACACCAAGCACTCTGAAATC	2,00E-04	52	59
NC008702	Azoarcus sp.	852-877	nifH6	CGGCCAGACCGCTGCCGAGCTTGCC	2,00E-04	76	69
AJ563286	Dechloromonas sp.	21-46	nifH7	TATGATTGTTGGCTGCGATCCGAAA	2,00E-04	44	56
X03916	Azobacter chroococum	7-32	nifH8	TTGCGTCAGTGTGCAATTTACGGCA	2,00E-04	48	58
X13519	Azobacter vinelandii	160-185	nifH9	GCCCAGGACACCGTCATGGAAATGG	2,00E-04	64	64
EU693341	Acinetobacter sp.	1-26	nifH10	AGGGGGGCTGGTGGCGGGCTGGCG	2,00E-04	84	72
EF620519	Stenotrophomonas sp.	85-110	nifH11	GCACGCTCGAAAATCTTATTAGCTA	2,00E-04	40	54
NC011283	Klebsiella pneumonia	186-211	nifH12	GGCGGAAGTGGGCTCGGTCGAGGAT	2,00E-04	68	66
		357-382	nifH13	TTTGATTTCGTCTTCTATGACGTC	2,00E-04	40	54
		848-873	nifH14	TTGGTAAAACCGCCGCTGAAGAAA	2,00E-04	44	56
AB189641	Halorhodospirilla halophita	4-29	nifH15	AGACAGGACGCAATCTACGGCAAGG	0,048	56	61
CP000304	Pseudomonas stutzeri	4-29	nifH16	GCAATGCGTCAATGCGTATTTACG	2,00E-04	48	58
X96609	Alcaligenes faecalis	867-892	nifH17	GGAACGAGCTTTTTGTTCCCTTTAG	2,00E-04	44	56
AB189453	Pseudomonas azotifigens	346-371	nifH18	TACGAGGATAACCTGGACTTCGTCT	2,00E-04	48	58
EU622788	Allochromatium minutissimum	1-26	nifH19	TACGGGAAGGGGGGATGGGAAGT	2,00E-04	60	63
EU177582	Bradyrhizobium elkanii	149-174	nifH20	ATTTTGAGCTTGCGGGCAATGCCG	2,00E-04	56	61
		475-500	nifH21	GGGCATTCTGAAATATGCCAATCTCT	2,00E-04	44	56
		597-622	nifH22	TGATCTATTTTCGTGCCGCTGACAA	2,00E-04	48	58
NC004463	Bradyrhizobium japonicum	309-334	nifH23	TGTCATCACCTCGATCAATTTTCTT	2,00E-04	36	53
AP009384	Azorhizobium caulinodans	25-50	nifH24	TTTTACGGCAAGGGGGCATCGGCA	2,00E-04	60	63
		300-325	nifH25	GGGGCGCGGCTCATCACCTCCATC	2,00E-04	72	68
RHMNIFH2-1	Rhizobium NIFH2	333-358	nifH26	GGAGGAGAACGGCGCCTATGAGGAC	2,00E-04	64	64
RHMNIFH1-1	Rhizobium NIFH1	746-771	nifH27	ACAACAATGGCGGCAAGGGCATCAT	2,00E-04	52	59
AB217474	Sphingomonas azotifigens	97-122	nifH28	TTCGACCCGCTGATGTGCACGCC	2,00E-04	68	66
NC009428	Rhodobacter sphaeroides	1-26	nifH29	ATGTCGAGACCGCGGGCACCGCCG	2,00E-04	76	69



CP000781	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	1-26	nifH30	ATGTCGGCTAAAGGTTCTGAAGGAGA	2,00E-04	48	58
EU514545	<i>Mesorhizobium</i> sp.	1-26	nifH31	CCAAGAAGCATGACGGCAAGTGGAC	2,00E-04	56	61
		810-835	nifH32	CTAATCTCCAGAGGATCGCCGGGAA	2,00E-04	56	61
AF031817	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	1-26	nifH33	ATGGGAAAACCTCCGGCAGATCGCTT	0,003	56	61
BA000012	<i>Mesorhizobium loti</i>	194-219	nifH34	AGGAAGGTTCTGTGGAAGACCTCGA	2,00E-04	52	59
		860-885	nifH35	AGGCCAAGGAAGCGAAATTGGCCGT	2,00E-04	56	61
CP000230	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	271-296	nifH36	GGTGGTCCGGAGCCCGGCTCGGCT	2,00E-04	80	71
		506-531	nifH37	TTTGAAATACGCCACACCGGTGG	2,00E-04	52	59
		608-633	nifH38	GTTTGGGCTGCCGCTCATCCACTT	2,00E-04	60	63
X07866	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	848-873	nifH39	AAAAGCAGATCGCCGAGATGGAAGC	2,00E-04	52	59
RSPNIFHD	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	860-885	nifH40	AAGCCAAGGAATCCGCCCGCCCAA	2,00E-04	64	64
RHMNIFHCZ	<i>Rhizobium phaseoli</i>	756-781	nifH41	GGCCAAGGGACCATTCGACCCCG	2,00E-04	72	68
		849-874	nifH42	GGCCGAACCTACAGGCCAAGGAGTCA	2,00E-04	60	63
AE006469	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	869-894	nifH43	AAGCCAAGGTAATAGCCCCACTG	2,00E-04	56	61
U00090	<i>Rhizobium</i> sp.	522-547	nifH44	TCGGCGCGCTGCGGCTCGGCGGGC	2,00E-04	88	74
		691-716	nifH45	TATGCCCCGGAGTCGCAACAGGCGG	0,003	68	66
AZSFEFEMO	<i>Azospirillum brasiliense</i>	1-26	nifH46	ATGCTTTGCGCCAGATTGCGTTCT	2,00E-04	48	58
CP001197	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	1-26	nifH47	ATGAGAAAGGTGGCCATCTACGGTA	0,75	48	58
		342-367	nifH48	GGAAGACCAGAAGCTGGACTACGTG	2,00E-04	56	61
CP000943	<i>Methylobacterium</i> sp.	1-26	nifH49	ATGGCTGGTCTGCGCAAATCGCGT	2,00E-04	60	63
CP000463	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	1-26	nifH50	ATGACCCGCAAGATTGCGATCTACG	0,19	52	59
		84-109	nifH51	TTCCACGACAAGAACGTGTTTATT	2,00E-04	36	53
CP000820	<i>Frenkia</i> sp.	177-202	nifH52	CGCGCGGAGAGGGCTCGGTCGAG	2,00E-04	76	69
DQ139407	<i>Oscillochloris trichoides</i>	264-289	nifH53	TTGTGGTGGCCGTGGCGTTATTACT	2,00E-04	52	59
NC009617	<i>Clostridium beijerinckii</i>	433-458	nifH54	AAAGCAAAGAAATATATATAGTTG	2,00E-04	20	46
		633-658	nifH55	TTTTGTACCAAGAAATAATGTTGTT	2,00E-04	20	46
		806-831	nifH56	TTTAATAGAATATGGATTAATGGA	2,00E-04	20	46
AE001437	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	228-253	nifH57	TTTTGGTAACTAAATGCGTTGAG	2,00E-04	32	51
		789-814	nifH58	TATACTTATGGAATATGGATTATG	2,00E-04	24	48
EU861990	<i>Bacillus</i> sp.	142-167	nifH59	CAACAACTGTTTTATCTTTAGCTG	3	29.2	49
		368-393	nifH60	TTGTTTGTGGTGGATTTGCGATGCC	2,00E-04	48	58
EF620504	<i>Paenibacillus perioae</i>	259-284	nifH61	GGGGACGTCGTGTGCGGGGCTTC	2,00E-04	76	69
		238-263	nifH62	TTTTGTTTCTACGATGTACTGGG	2,00E-04	44	56

DQ665842	<i>Methylosoma difficile</i>	198-223	nifH63	TTTCGTTTTTTATGATGTTCTTGGG	2,00E-04	32	51
EF620509	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	138-163	nifH64	TTCTGAACGTGGAATGCGGCGGGCC	2,00E-04	64	64
EF620510	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	111-136	nifH65	TGTTGTACAGAAGGGCTTCGGTGAC	0,048	52	59
EU204960	<i>Bacillus arseniciseletatis</i>	152-177	nifH66	TTTTATCTTTAGCTGCTGAAAAAGG	2,00E-04	32	51
NC_005090	<i>Wolinella succinogenes</i>	259-284	nifH67	AATCCTGAGCAGCCAAGCCCTAGTG	2,00E-04	56	61
NC_009135	<i>Methanococcus maripaludis</i>	253-278	nifH68	GGAATTGATAAACTCGGAATTGAAA	0,048	32	51
		297-322	nifH69	ACTGAAAAAGAAGATATAATTTAC	2,00E-04	20	46
Z54207	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	854-879	nifH70	GCAAGTCGGCTGAAGTAGCGGCTG	2,00E-04	61.5	64
AAVW010000	<i>Nodularia spumigena</i>	277-302	nifH71	ATCAACAACAAAACCTAGCTATTC	0,048	32	51
NZ_AAXA020	<i>Dorea formicigenerans</i>	338-363	nifH72	AAGTCTACAAACCGGACGTAGTCTCT	3	48	58
FJ467343	<i>Acidithiobacillus</i> sp.	84-109	nifH73	TCATCATCGTTGGCTGCGATCCGAAG	2,00E-04	56	61
NC_006526	<i>Zymomonas mobilis</i>	146-171	nifH74	TTATTCTTAATTCCAAAGCACAGA	2,00E-04	28	49
		835-860	nifH75	GAAGAGCAAGAGCTGGCTGAACCTG	2,00E-04	56	61
FJ467343	<i>Acidithiobacillus</i> sp.	51-76	nifH76	TTTGGCGCTCTATCGGAAATGGGC	2,00E-04	56	61
NC_006526	<i>Zymomonas mobilis</i> ZM4	827-852	nifH77	TGAAAACCGAAGAGCAAGAGCTGGC	2,00E-04	52	59
AB161454	<i>Pleomorphomonas oryzae</i>	166-191	nifH78	AAAAGGGCTCGGTGCGAGATCTCGA	2,00E-04	56	61
AB079629	<i>Rhodovulum strictum</i>	128-153	nifH79	GCCTGATCTGAACACCAAGCTGCA	2,00E-04	56	61
		314-339	nifH80	TCCTGGAAGAGAACGGCCTATGA	2,00E-04	56	61
NC_011830	<i>Desulfitibacterium hafniense</i>	833-858	nifH81	CCTTGAAAGGGGAGTGGTCGTCGG	2,00E-04	64	64
NC_009712	<i>Candidatus methanoregula boonei</i>	852-877	nifH82	GTGAAGTGTGAACCTCGAATGCATG	2,00E-04	44	56
NC_011832	<i>Candidatus methanoregula palustris</i>	868-893	nifH83	TATCCACCAGCAGGGAGTGAGGGAC	2,00E-04	60	63
NZ_ABWK010	<i>Mitsuokella multacida</i>	740-765	nifH84	TCGTGCAGGAGAAGGCTGAGGGTTG	nifH não específico	60	63
NC_008942	<i>Methanocorpusculum labreanum</i>	723-748	nifH85	AACCATTCTGAAAAACCCGATCTT	2,00E-04	40	54
NC_008346	<i>Syntrophomonas wolfei</i>	686-711	nifH86	CATCGGAACAGGCGCCGTCTACCG	2,00E-04	68	66
		741-766	nifH87	TGATGCGGGGTAAGTAATGCATAA	2,00E-04	44	56
NZ_AAVO020	<i>Ruminococcus obeum</i>	741-766	nifH88	TCGGCAGAGATGCTTTTGAAAGCA	nifH não específico	44	56
NC_009922	<i>Alkaliphilus oremlandii ohilas</i>	722-747	nifH89	TAGCAAAAAAATAATGGAGGGATA	2,00E-04	28	49
NC_007796	<i>Mrthanospirillum hungatei</i>	682-707	nifH90	TTTGACCTGATTCATCACTCTCTG	2,00E-04	44	56
NC_005296	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	351-376	nifH91	GCTGGACCTCGACATCGTGATCTAC	2,00E-04	56	61
NC_009051	<i>Methanoculleus marisnigri</i>	491-516	nifH92	TTGCGCGCTCTCGCGCCGGTGCG	2,00E-04	80	71
NC_009523	<i>Roseiflexus</i> sp.	345-370	nifH93	CGATCTGGATTATGCTTCTACGAC	2,00E-04	44	56
DQ139406	<i>Oscillochloris trichoides</i>	120-145	nifH94	TCTGCTTGGTGGTACCCGCCAGCTC	2,00E-04	64	64

AF325793	<i>Spirochaeta stenostrepta</i>	100-125	nifH95	TATCTAGGGGGCAAACCCAGGAA	2,00E-04	52	59
AF325797	<i>Treponema denticola</i>	1-26	nifH96	GTCTACAACCCAGCAGAACACCGCT	2,00E-04	56	61
NZ_ABEA010	Opiritaceae bacterium	789-814	nifH97	GTGGTCAAATACGGCCTGGCTGAAT	3	52	59
NC_010424	<i>Candidatus desulforudis</i>	816-841	nifH98	GTTACTCGACCTGGGGGAGCGGAGC	2,00E-04	68	66
NC_000916	<i>Methanothermobacter</i>	20-45	nifH99	TTGTCGGAAGGCAGAAGCATACTTC	2,00E-04	48	58
NC_003552	<i>Methanosarcina acetivorans</i>	63-88	nifH100	TACTGCGGCCCTCTCGACTATGGGG	2,00E-04	64	64
NC_009633	<i>Alkaliphilus metalliredigens</i>	61-86	nifH101	TTAACAGCGGCTTTAGGTGAGTCAG	2,00E-04	48	58
		790-815	nifH102	TTGATGATGGAGCATGGTGTATTAG	2,00E-04	40	54
AF325794	<i>Spirochaeta stenostrepta</i>	188-213	nifH103	GGCGGAACAAGATGCGTTGAGTCAG	2,00E-04	56	61
NC_009437	<i>Caldicellulosiruptor</i>	188-213	nifH104	TTGGTGAGAGTAATGTCAAGCTTGA	2,00E-04	40	54
DS989843	<i>Microcoleus chthonoplastes</i>	342-367	nifH105	AAGTGAAGGTCTTGATTATGCCTTC	2,00E-04	40	54
		798-823	nifH106	ACTTGTTAAATTCGGTTGTACGGC	nifH não específico	40	54
AF216881	<i>Acetobacterium woodii</i>	215-240	nifH107	GTGTGGAATCAGCGGACCCGAACC	2,00E-04	64	64
EF560698	<i>Chlorobaculum macestae</i>	317-342	nifH108	ACGATGACGAATGGAACCTCGACTA	2,00E-04	48	58
NC_011060	<i>Pelodictyon phaoclathratiforme</i>	522-547	nifH109	TGGAGTTCGCCTTGGTGGCCTTATC	2,00E-04	56	61
NC_010803	<i>Chlorobium limicola</i>	334-359	nifH110	TACGATGAGGAATGGGATCTCGATT	2,00E-04	44	56
NC_009337	<i>Prosthecochloris vibrioformis</i>	192-217	nifH111	TGAAGAAGTTGAACTGGAAGATATC	0,048	36	53
NC_008639	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	336-361	nifH112	TGATAAAGAATGGGGCCTCGACTAT	2,00E-04	44	56
NC_007512	<i>Pelodictyon luteolum</i>	336-361	nifH113	CGACGAAGAATGGGACCTCGACTAT	2,00E-04	52	59
NC_011026	<i>Chloroherpeton thalassium</i>	96-121	nifH114	GATGGTTGTTGGTTGTGATCCAAAG	2,00E-04	44	56
		334-359	nifH115	TATGATGATGAATGGAATTTGGACT	2,00E-04	32	51
NC_011768	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	197-222	nifH116	GATGTGGAACCTGGACGACGTGCGCA	2,00E-04	60	63
AF325801	<i>Treponema sp.</i>	297-322	nifH117	GGGATCAGTACAAACTGGATTACAC	2,00E-04	44	56
NC_002936	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i>	767-792	nifH118	AACCTATCAGCGTAGATGAACTGGA	2,00E-04	44	56
NZ_ABEA010	Opiritaceae bacterium TAV2	780-805	nifH119	GGACGAACCTCGAAAAGATGGTGGTC	0,048	52	59
DS990592	<i>Verucomicrobiae bacterium</i>	873-898	nifH120	GCCCTTGAGATCGAAGAGCTCGAA	nifH não específico	56	61
NC_009712	<i>Candidatus methanoregula boonei</i>	806-831	nifH121	AGAGCTGGTCTGACAACTGCTCGA	2,00E-04	52	59
X76398	<i>Frankia sp.</i>	142-167	nifH122	TCGGTGGAGGACCTCGAGCTCGAGG	2,00E-04	68	66
		455-480	nifH123	ACGCCACACGGTGGTGTCCGCCT	2,00E-04	72	68
NC_009483	<i>Geobacter uraniireducens</i>	177-202	nifH124	GGTGGGGAACCTGGGCACTGTTGAG	2,00E-04	64	64
		840-865	nifH125	TGTCGGCTAGTTGAAGCTGCAACA	2,00E-04	52	59

U73140	<i>Fischerella</i> sp.	42-67	nifH126	GCTGCACCTAGCAGCAGAAAGAGGT	2,00E-04	52	59
DQ385910	<i>Mastigocladus laminosus</i>	738-763	nifH127	TATCTTTGACGACGATACCAAGCAC	2,00E-04	44	56
U73138	<i>Chlorogloepsis</i> sp.	60-85	nifH128	GCGCGGCGCAGTAGAAGACTTAGAA	2,00E-04	56	61
AY553320	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	194-219	nifH129	TTTTGGAAGAAAATGGTGCTTACCA	2,00E-04	36	53
		220-245	nifH130	GATTTAGACTTCGTTTCTACGACG	2,00E-04	44	56
AY221813	<i>Anabaena cylindrica</i>	42-67	nifH131	TCTTTCCTTGGCTGCTGAAAGAGGT	2,00E-04	48	58
		222-247	nifH132	CTTAGATTTCTGATCTTACGACGTA	2,00E-04	36	53
AY768424	<i>Nodularia harveyana</i>	378-403	nifH133	GGGCGAATTCGCGGCCGCTAAATTC	nifH não específico	60	63
AY768421	<i>Tolypothrix</i> sp.	1-26	nifH134	AACGAATTCGCCCTTCTGTGATCCA	2,00E-04	48	58
		172-197	nifH135	CGGCCAGAACCCGGCGTAGGTTGT	0,048	68	66
DQ225763	<i>Richelia</i> sp.	109-134	nifH136	TTCCGTGGCGTACGTTGCGTTGAAT	2,00E-04	52	59
AY768414	<i>Scytonema</i> sp.	244-269	nifH137	TTACGACGATTTGGGTGACGTTGTG	2,00E-04	48	58
U73134	<i>Dermocarpa</i> sp.	112-137	nifH138	AAAGATGTCGTTGCGTAGAATCTG	2,00E-04	44	56
AY422706	<i>Chroocovvidiopsis thermalis</i>	645-670	nifH139	GCAACCAAGCCAACGAGTATCGTGC	2,00E-04	56	61
L15552	<i>Leptolyngbya boryana</i>	1-26	nifH140	TCCACCCGCTTGATGTTGCACAGTA	2,00E-04	52	59
AY768413	<i>Lyngbya majuscula</i>	54-79	nifH141	GTTACAGTCTGCACTTAGCAGCAG	2,00E-04	48	58
AB293988	<i>Gloeotheca</i> sp.	1-26	nifH142	ATGCGTCAAATTCATTTTACGGAA	2,00E-04	36	53
		840-865	nifH143	TCTTCAAGCTGACAAAGCTGCAGGC	2,00E-04	36	53
NC 008312	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	43-68	nifH144	TCCACTACTTCTCAGAATACTCTAG	2,00E-04	40	54
AF395130	<i>Katagnymene spiralis</i>	232-257	nifH145	TATACAGATCTAGATTTGCGTAAGCT	2,00E-04	32	51
DS989904	<i>Synechococcus</i> sp.	31-56	nifH146	GGTATCGGTAAATCCACCCTTCCC	nifH não específico	52	59
EU204959	<i>Bacillus alkalidiazotrophicus</i>	61-86	nifH147	AAAAATTATGGTCAAGAAATTATGA	2,00E-04	20	46
EU542601	<i>Natronobacillus azotifigens</i>	68-93	nifH148	TGGGCAAAAAATAATGATTGTTGG	2,00E-04	36	53
NC 007775	<i>Synechococcus</i> sp.	770-795	nifH149	TCTCTATGGATGAGCTGGAGCAGTT	2,00E-04	48	58
AJ563957	<i>Methylosinus trichosporium</i>	357-382	nifH150	GGATGTTGTGTGGCGGCTTTGCC	2,00E-04	60	63
DQ913882	<i>Celerinatantimonas diazotrophica</i>	328-353	nifH151	TTTGTTTTTATGACGTACTGGTG	2,00E-04	32	51
AF134809	<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	601-626	nifH152	GCAGCGAAGATCGGCACTCAAATGA	2,00E-04	52	59
AF216883	<i>Azomonas agilis</i>	71-96	nifH153	TCGTCGGCTGCGACCCATAAGCTGA	2,00E-04	60	63
NZ_AAEW020	<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	5-30	nifH154	CAGAGAAAAAATGCGTCAGATTC	nifH não específico	40	54
NC 007498	<i>Pelobacter carbinolicus</i>	16-41	nifH155	AGACAGCTCGCAATCTACGGCAAGG	2,00E-04	56	61
AB196525	<i>Heliobacterium chlorum</i>	87-112	nifH156	TAAAAAATCATGATCGTCGGTTGT	2,00E-04	32	51

AB191045	<i>Heliorestis baculata</i>	2-27	nifH157	CTGAAATGGGTAAAAAAGTGATGAT	2,00E-04	32	51
		741-766	nifH158	TTTAGATGACGAAGCAACGGCGGCT	2,00E-04	52	59
AF545637	<i>Pantoea agglomerans</i>	50-75	nifH159	TGGGCAAAAAAGTGATGATCGTTGG	2,00E-04	44	56
AY544164	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	798-823	nifH160	CGGCATCATGGAAGAAGAAGACACC	2,00E-04	52	59
NC_004547	<i>Erwinia carotovora</i>	603-628	nifH161	AGAAAAAATCGGCACCCAAATGATC	2,00E-04	40	54
EU622784	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	1-26	nifH162	TACGGGAAGGGGGGATGGGAAGT	2,00E-04	60	63
EU622788	<i>Allochromatium minutissium</i>	137-162	nifH163	TTCAGAATACCATCATGGAGATGGC	2,00E-04	44	56
AB189453	<i>Pseudomonas azotifigens</i>	5-30	nifH164	CAATGCGTCAATGCGCTATTTACGG	2,00E-04	48	58
		623-648	nifH165	TGATCCATTTTCGTCCCGCGCACAA	2,00E-04	56	61
EF199956	<i>Ectothiorhodospira haloalkaliphila</i>	324-349	nifH166	CGAGGACGACTTGGACTTCGTGTTC	2,00E-04	56	61
AB201045	<i>Zoogloea oryzae</i>	206-231	nifH167	TTTGCGCGCGTCAAGTGCCTGAGT	2,00E-04	56	61
EF199958	<i>Thioalkalipsira microaerophila</i>	290-315	nifH168	AAGACCTGGACTTCGTATCTATGA	2,00E-04	40	54
DQ821943	<i>Thermochromatium tepidum</i>	216-241	nifH169	TGAGGAAGATCTCGATTTCTTTTC	2,00E-04	40	54
AF059648	<i>Marichromatium purpuratum</i>	220-245	nifH170	GAGGATCTCGACTTCGTCTTCTATG	2,00E-04	48	58
EF199952	<i>Halorhodospira abdelmalekii</i>	117-142	nifH171	GTTGATTTCTCCATGCCAAGGCGCAG	2,00E-04	56	61
EU542578	<i>Ideonella dechloratans</i>	473-498	nifH172	GGCCAGTGCCTGGCCGGAAGCTG	2,00E-04	76	69
NC_009720	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	15-40	nifH173	TTCGAAGGAGAGACAGATGTCTTCG	2,00E-04	48	58
		194-219	nifH174	CCCAGGACACCATCCTGTGCTTGC	2,00E-04	64	64
NC_010529	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	846-871	nifH175	AAAAGTTGGGAAGACTGCGTCAGAA	2,00E-04	44	56
EF374087	<i>Cupriavidus sp.</i>	423-448	nifH176	TTTCTAAAGGAATTTTGAAGTAGGC	2,00E-04	32	51
EF158799	<i>Burkholderia ferrariae</i>	826-851	nifH177	GGCAAGACGGCTGCCGAAGTCCG	2,00E-04	68	66
EF158808	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	603-628	nifH178	TTTCGTGCCGCGGACAACATCGTG	2,00E-04	60	63
DQ482049	<i>Telmatospirillum siberiense</i>	19-44	nifH179	TTGGCGGCGTTGTCCGATCTTGGTC	2,00E-04	60	63
DQ482046	<i>Telmatospirillum siberiense</i>	91-116	nifH180	TTGATCCTGCATGCCAAGGCCAGG	2,00E-04	60	63
NC_008781	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	507-532	nifH181	TTTGAAGTATGCCAATTCGGGTGGT	2,00E-04	44	56
		859-884	nifH182	GCCGCCGCCGACGCCGAGCCTTGG	2,00E-04	84	72
AB188120	<i>Pelomonas saccharophilla</i>	1-26	nifH183	GGGTAAGGTGGCATCGGCAAGTCC	2,00E-04	60	63
AB188122	<i>Azohydromonas lata</i>	1-26	nifH184	TGGTATTGGTAAGTGGACCACCTCG	2,00E-04	52	59
AB188119	<i>Rubrivivax gelatinosus</i>	1-26	nifH185	AAGTGCACCACCTCGCAGAACACCC	2,00E-04	60	63
AM110705	<i>Methylocella palustris</i>	215-240	nifH186	TATGAGGGCGTCGATTACGTCTCCT	2,00E-04	52	59
FJ223129	<i>Azorhizobium doebereineae</i>	443-468	nifH187	GGCCAACAACATCTCCAAGGGCATT	2,00E-04	52	59
NC_010581	<i>Beijerinckia indica</i>	820-845	nifH188	AAGCAGGTTGACGAGTCGAGGTCG	2,00E-04	60	63
AJ563940	<i>Beijerinckia derxii</i>	402-427	nifH189	TCAGGAAATTTACATCGTTATGTCC	2,00E-04	36	53

AJ563937	<i>Beijerinckia mobilis</i>	169-194	nifH190	TCCGTTGAAGACCTCGAAATCGAAG	2,00E-04	48	58
AF378721	<i>Methylosinus</i> sp.	318-343	nifH191	TCAGGAAATCTACATCGTCACGTCC	2,00E-04	48	58
AJ968685	<i>Microbacterium</i> sp.	129-154	nifH192	TAAGTGCCTGGAATCGGGTGGCCCA	2,00E-04	60	63
AJ968687	<i>Microbacterium</i> sp.	68-93	nifH193	AACCGAAGGTTCCGGTCGAAGACCTC	8,00E-04	56	61
EU748935	<i>Aminobacter</i> sp.	566-591	nifH194	TCGTCCAGCACGCCGAAGTCTGAGAAA	2,00E-04	56	61
		628-653	nifH195	GCAGGGGAGTACCGCGCGTTGGCCG	2,00E-04	76	69
AB233495	<i>Amorphomonas oryzae</i>	62-87	nifH196	GATCTGGGTCAGAAGATCCTCATCG	2,00E-04	52	59
AF487824	<i>Devosia neptuniae</i>	338-363	nifH197	TTCCAAACAGGCCGAGAAATATCGC	2,00E-04	52	59
DQ411936	<i>Ensifer maxicanus</i>	164-189	nifH198	TCATGCGCCCAACAACATCGCCAA	2,00E-04	52	59
AE017282	<i>Methylococcus capsulatus</i>	810-835	nifH199	GATGGAGCATGGCGTGTGGCCAG	2,00E-04	64	64
AP007255	<i>Magnetospirillum magneticum</i>	864-889	nifH200	AAAGACCTCTGCAGCGCGGTGA	2,00E-04	60	63
AM889285	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	4-29	nifH201	AGCAAGCTTCGCCAAATCGCCTTTT	2,00E-04	48	58
		871-896	nifH202	GCCAAGCCCGCGGACGCTGGCCT	2,00E-04	80	71
NC_008554	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	774-799	nifH203	GCACACGGATCATCTTGAGAAGTTG	2,00E-04	48	58
AF484678	<i>Methylobacter bovis</i>	111-136	nifH204	TACTCGTTTGATCCTGCACTCAAAA	0,012	40	54
AY367396	<i>Raoutella terrigena</i>	222-247	nifH205	GGAAGGTGCCTACGAGGACGATCTC	2,00E-04	60	63
DQ002937	<i>Methylocaldum szegediense</i>	74-99	nifH206	TCTGAGCCTTGCTGCTGCGCCGGC	2,00E-04	72	68
AJ968689	<i>Phyllobacterium</i> sp.	226-251	nifH207	TGTCGACTACGTTTCATACGACGTG	2,00E-04	48	58
<b>TOTAL</b>				<b>207 PRIMERS</b>			<b>46-74</b>

**Tabela A.5.** Oligonucleotídeos baseados em seqüências de genes *nifK* de bactérias diazotróficas.

Número de acesso no GenBank	Gênero/Espécie	Nt posição +24 nt	Nome dos Oligos	Seqüência dos Oligos (25-mer)	Resultado do Blast	% GC	Tm Basica °C
NC_009617	<i>Clostridium beijerinckii</i>	9-34	nifK1	ATTTAACTCCTAAAGAAATTAAGGA	2,00E-04	24	48
AE001437	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	10-35	nifK2	GAAACACCTAAGGAGATATATGAAA	2,00E-04	32	51
		231-256	nifK3	TTTTGGAGGAAGAGCTAACTTCAAT	2,00E-04	36	53
NC_008702	<i>Azoarcus</i> sp	12-37	nifK4	AGACGATATCAAGCCGTGTTACCCG	2,00E-04	52	59
		1362-1387	nifK5	GGTGTTC AAGGGCAAGGAATTCGAG	2,00E-04	52	59
CP000304	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	515-540	nifK6	TCGAAGAAGGAGGGCTTCATCCCCG	2,00E-04	60	63
		634-659	nifK7	CACATGGACGACAAGGTGGTCGGTA	2,00E-04	56	61
CP000544	<i>Halorhodospira halophila</i>	649-674	nifK8	CAGCCGGGCAGCAACGGCAAGCTCA	2,00E-04	68	66
NC_011283	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	893-918	nifK9	GCAAAAAGGTGGTTCAGGAGATGTG	2,00E-04	48	58
		1359-1384	nifK10	GGCAAAGGGCAAAGCCTTCGAAGTG	2,00E-04	56	61
CP001280	<i>Methylocella silvestris</i>	60-85	nifK11	TAAGGAAATGTTTCGAAAACAAGAAA	2,00E-04	28	49
		1517-1542	nifK12	ATGTCGTGGCGAAGTCCGACTACAG	2,00E-04	56	61
NC_010581	<i>Beijerinckia indica</i>	937-962	nifK13	TGGAAGCACGAGACGGTTGCTTTCA	2,00E-04	52	59
		1518-1543	nifK14	GATCGTGCCGGCCCACTCGGACTTC	2,00E-04	68	66
NC_011004	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	637-662	nifK15	TCCGGCACCGTGGAAAAGCTCGAGC	2,00E-04	64	64
CP000250	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	18-43	nifK16	AAAGATCCGGATCATTTTCGATCTC	2,00E-04	44	56
NC_009937	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	129-154	nifK17	TCGGGAATGGCCAAGACGCCCGAG	2,00E-04	68	66
		740-765	nifK18	TTTTCGAGCTGATGGGCGTCAATA	2,00E-04	48	58
CP000781	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	6-31	nifK19	ACAGAATGCAGATAACGTGCTCGAT	2,00E-04	44	56
CP000494	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	746-771	nifK20	AGGAGATGGGGATCGAGTACACCAT	2,00E-04	52	59
		952-977	nifK21	TCGTTCCATCACCCGGTCGGCGTGT	0,003	64	64
NC_011206	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	915-940	nifK22	TTTGCTTTTCATTGCAGAGCACGGT	2,00E-04	48	58
		1491-1516	nifK23	TTTTGATGAGATCGATAGCAACAGT	2,00E-04	36	53
NC_004463	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	4-29	nifK24	CCGCAGAGTGCCGAACACGTGCTCG	2,00E-04	68	66
		1251-1276	nifK25	TGGACAGGGCTGCCAAGTCTATCCG	2,00E-04	60	63
AE017282	<i>Methylococcus capsulatus</i>	5-30	nifK26	GTCAGAATGCAGAAAAGTCTCTAGA	2,00E-04	40	54
		1461-1486	nifK27	GAATGTTCTGGTCTGGATTCTCGAT	2,00E-04	44	56

NC_009254	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	64-89	nifK28	GAGATTTTCCGCACGAAGAAGGAGC	2,00E-04	52	59
		1515-1540	nifK29	GATGGTGCCGTCGAAGACCGACTAC	2,00E-04	60	63
CP001013	<i>Leptothrix cholodnii</i>	1032-1057	nifK30	CGCTGTGCTGGAGAAGGAGCGCGGC	2,00E-04	72	68
Z54207	<i>H.seropedicae</i>	647-672	nifK31	TGCCGGCGCTGGAGAGAAAGCCCAA	2,00E-04	64	64
		948-973	nifK32	GGTCACGCTCAACCACCCGATGGGC	2,00E-04	68	66
NC_011365	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	850-875	nifK33	GATTACACGATTCGCTTCAGGAAT	2,00E-04	40	54
		986-1011	nifK34	AGATTCGGGCAAGCCGGTCCGCA	2,00E-04	60	63
NC_002678	<i>Mesorhizobium loti</i>	78-103	nifK35	GAAGAAGCTCAATTCGAATGTCCG	2,00E-04	44	56
		645-670	nifK36	GCAAGCCGCTGGGACCATCAACATC	2,00E-04	60	63
AE006469	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	645-670	nifK37	TGTAAACCCTGGCTCGATCAACATC	2,00E-04	48	58
		741-766	nifK38	TTCTATAACGTTTCATCCAAGATGCC	2,00E-04	44	56
U00090	<i>Rhizobium</i> sp.	645-670	nifK39	CCAAGCGCCGGCAGATCAACATC	2,00E-04	64	64
		1248-1273	nifK40	AAAGGTCTGGCCGGAAAGGATCTC	2,00E-04	56	61
CP001349	<i>Methylobacterium nodulans</i>	1494-1519	nifK41	TCGCCCTGGCCAAGACCGACTCCTC	2,00E-04	68	66
CP000613	<i>Rhodospirillum centenum</i>	897-922	nifK42	GGAGTATGTGGAGGGCAAGGGCCAG	2,00E-04	64	64
NC_009049	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	1-26	nifK43	ATGAGGACGGCCAGCAGAAGGATCA	2,00E-04	56	61
		103-128	nifK44	GAGAAGAAGCGCCACCTACGAGA	2,00E-04	60	63
CP000230	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	1488-1513	nifK45	TCGCGAGAGCGGCGAAAACGGCATC	2,00E-04	64	64
NC_009921	<i>Frankia</i> sp.	1239-1264	nifK46	TGGAGAAGGTGCTCTCGGCGAGCAA	2,00E-04	60	63
		1521-1546	nifK47	GACCAGCCCGACCATAGCTACGAC	2,00E-04	64	64
CP001197	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	1342-1367	nifK48	GATGCGCCTGAGGAGAAGTTCGAAC	2,00E-04	56	61
NC_003272	<i>Nostoc</i> sp.	1488-1513	nifK49	CAGCACCAACATCACTGGTAAGACC	2,00E-04	52	59
NC_011729	<i>Cyanothece</i> sp.	1305-1330	nifK50	TTTCTTGATTGGGAATCTTATGGT	2,00E-04	32	51
		1485-1510	nifK51	TAATACCAATATTCGGTCTAAGACT	2,00E-04	32	51
AY728387	<i>Cyanobacterium</i>	1196-1221	nifK52	TTGCAGCTCAAGATCTTCTAGCATC	2,00E-04	44	56
AP007255	<i>Magnetospirillum magneticum</i>	1349-1374	nifK53	AGGTCCGCGCCCCGCCCTGGGA	2,00E-04	44	56
AZSFEFEMO	<i>A.brasilense</i>	1512-1537	nifK54	CGCCAACACGAACATCGTCGGCGAG	2,00E-04	84	72
<b>TOTAL</b>				<b>54 PRIMERS</b>			<b>48-72</b>