

Análises de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em Estudos de Diversidade Intra-Específica de *Azospirillum amazonense* Isolado de Diferentes Espécies de *Brachiaria*



Documentos 117

Análises de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em Estudos de Diversidade Intra-Específica de *Azospirillum amazonense* Isolado de Diferentes Espécies de *Brachiaria*

Fábio Bueno dos Reis Junior
Kátia Regina dos Santos Teixeira
Verônica Massena Reis

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina - DF

Fone: (61) 3388-9898

Fax: (61) 3388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Dimas Vital Siqueira Resck*

Editor Técnico: *Carlos Roberto Spehar*

Secretária-Executiva: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Maria Helena Gonçalves Teixeira*

Revisão de texto: *Maria Helena Gonçalves Teixeira*

Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de Castro*

Marilaine Schaun Pelufé

Capa: *Fábio Bueno dos Reis Junior*

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*

Jaime Arbués Carneiro

1ª edição

1ª impressão (2004): tiragem 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação na publicação.

Embrapa Cerrados.

R375a Reis Junior, Fábio Bueno dos.

Análises de restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em estudos de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolado de diferentes espécies de *brachiaria* / Fábio Bueno dos Reis Junior, Kátia Regina dos Santos Teixeira, Verônica Massena Reis. – Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2004.

41 p. – (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 117)

1. *Brachiaria*. 2. Nitrogênio. 3. Gramínea forrageira. 4. Pastagem.
I. Teixeira, Kátia Regina dos Santos. II. Reis, Verônica Massena.
III. Título. IV. Série.

633.2 - CDD 21

© Embrapa 2004

Autores

Fábio Bueno dos Reis Junior

Eng. Agrôn., Dr., Embrapa Cerrados

fabio@cpac.embrapa.br

Kátia Regina dos Santos Teixeira

Biól., Ph.D., Embrapa Agrobiologia

katia@cnpab.embrapa.br

Verônica Massena Reis

Eng. Agrôn., Ph.D., Embrapa Agrobiologia

veronica@cnpab.embrapa.br

Apresentação

Por representar uma possibilidade de menor utilização de insumos, principalmente, nitrogênio fertilizante, estudos envolvendo microrganismos fixadores de N e/ou promotores de crescimento de plantas, associados a gramíneas forrageiras, são de grande interesse. Neste documento, mostram-se, também, os aspectos teóricos e práticos do uso de análises de restrição do DNA ribossomal amplificado, buscando verificar o efeito do genótipo da planta e dos sítios de coleta sobre a diversidade intra-específica de isolados de um desses microrganismos, *Azospirillum amazonense*, oriundos de associações com raízes de *Brachiaria*. Trabalhos como este contribuem com informações importantes para a geração de conhecimento sobre a FBN em plantas forrageiras. Espera-se que, no futuro, esse conhecimento gerado possa contribuir para a sustentabilidade das pastagens, representando melhor uso da terra com a conseqüente preservação dos ecossistemas ainda intactos.

Roberto Teixeira Alves

Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Sumário

Introdução	9
A reação em cadeia da polimerase (PCR)	10
O uso do RNA ribossômico como marcador filogenético (ARDRA)	10
Extração do DNA – Método de extração alcalina	11
PCR (Reação em cadeia da polimerase)	12
<i>Amplificação da região 16S DNAr</i>	12
<i>Amplificação da região 23S DNAr</i>	12
<i>Amplificação da região intergênica 16S-23S DNAr</i>	12
Restrição dos fragmentos amplificados por PCR	13
Análises de agrupamento	13
PCR (Reação em cadeia da polimerase)	16
Restrição dos fragmentos amplificados por PCR	19
Análises de agrupamento	26
Conclusões	34
Referências Bibliográficas	34
Abstract	41

Análises de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em Estudos de Diversidade Intra-Específica de *Azospirillum amazonense* Isolado de Diferentes Espécies de *Brachiaria*

Fábio Bueno dos Reis Junior

Kátia Regina dos Santos Teixeira

Verônica Massena Reis

Introdução

A limitação de nitrogênio é um dos mais importantes fatores que levam à degradação das pastagens ([OLIVEIRA et al., 1997](#)). Entretanto, existe a possibilidade de que parte desse nutriente possa ser disponibilizado pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) que, pelos poucos estudos disponíveis, em alguns genótipos de *Brachiaria*, poderia ser responsável pela introdução de 30 a 40 kg de N.ha⁻¹.ano⁻¹ no sistema solo-planta ([BODDEY; VICTORIA, 1986](#); [LOUREIRO; BODDEY, 1988](#)). Dentre as espécies de bactérias diazotróficas, associadas a essas plantas, *Azospirillum amazonense* merece destaque, por apresentar alta incidência e altos números em associação com *Brachiaria* ([SOUTO, 1982](#); [BALDANI, 1984](#)) e adaptabilidade ao pH ácido ([MAGALHÃES et al., 1983](#)), característica comum à maioria dos solos brasileiros.

Como a diversidade de microrganismos do solo e da rizosfera geralmente está condicionada à própria vegetação, é possível que diferentes genótipos de *Brachiaria* possam exercer efeito seletivo sobre as populações destes, o que poderia resultar em diferentes respostas quanto à contribuição da FBN obtida de cada um dos genótipos.

O conceito de diversidade que será abordado neste documento compreende a diversidade apresentada abaixo do nível de espécie, também, chamada de diversidade intra-específica ou microdiversidade ([SCHLOTER et al., 2000](#)) onde são avaliadas estirpes pertencentes à mesma espécie. Para o estudo da

diversidade intra-específica, geralmente, são utilizadas técnicas de impressão digital com alta resolução, isso se deve, em parte, à impossibilidade do uso de ferramentas tradicionais da microbiologia e a dificuldade de se construir *primers* ou sondas-estirpe específicas, devido à menor variabilidade entre as seqüências de seus genomas ([LUDWIG; SCHLEIFER, 1994](#)). Vários fatores podem influenciar a diversidade intra-específica, entre eles, a separação espacial, diferenças ambientais e interações bactéria/hospedeiro, cada um desses casos deve ser objeto de investigações específicas ([SCHLOTTER et al., 2000](#)).

Tradicionalmente, a detecção e a identificação de bactérias eram feitas de acordo com os principais meios de obtenção de carbono e energia, suas exigências nutricionais e meios de cultivo para seu crescimento, além de observação direta com a utilização de microscópio ([HERBERT, 1990; KENNEDY, 1999](#)). No entanto, essas metodologias forneciam informações limitadas com necessidade de maior refinamento ([ZAK et al., 1994](#)). Como alternativa para esses métodos, foram desenvolvidas várias técnicas destacando-se aquelas baseadas nos ácidos nucléicos.

A reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os métodos moleculares receberam grande impulso com o desenvolvimento da técnica conhecida como PCR. Nessa técnica descrita por [Saiki et al. \(1985\)](#), pequenos e específicos segmentos do genoma de microrganismos podem ser amplificados utilizando-se *primers* (seqüências iniciadoras) complementares a seqüências localizadas em regiões específicas do genoma. O que ocorre é a extensão a partir dos *primers*, pela ação de uma DNA polimerase termoestável, a *Taq* DNA polimerase, isolada originalmente do microrganismo *Thermus aquaticus*. O DNA é desnaturado e o ciclo repetido várias vezes, o que permite a amplificação exponencial daquela seqüência específica ([SAIKI et al., 1985](#)). Grande parte das atuais técnicas moleculares utilizam a PCR ou variações dela para o estudo da diversidade de bactérias.

O uso do RNA ribossômico como marcador filogenético (ARDRA)

Os ácidos ribonucléicos ribossomais (RNAr) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade. Seus genes, o DNAr, são universalmente distribuídos, sendo a molécula com o maior grau de conservação existente. Sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão em diferentes regiões da molécula ([LANE et al., 1985](#)).

A técnica conhecida como ARDRA (Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado) utiliza-se das características do RNA ribossômico. Essa técnica é baseada em padrões de restrição enzimática usando enzimas selecionadas com base na sua habilidade de revelar polimorfismo nos fragmentos de DNA analisados e no grau de conservação dos sítios de restrição do RNAr que reflete padrões filogenéticos. A ARDRA é bastante útil para uma rápida análise da diversidade genética ([GRIFONI et al., 1995](#)). No entanto, é recomendado cuidado na escolha do fragmento de DNAr a ser amplificado e analisado por esse método. No caso da análise de microdiversidade, que apresenta grupos de indivíduos com elevada afinidade genética, o fragmento amplificado deve incluir o espaço intergênico 16S-23S DNAr. Essa região intergênica apresenta maior variabilidade não só na sua composição de bases como também no seu tamanho ao serem comparadas às regiões gênicas 16S ou 23S. Quando o estudo em questão tratar da diversidade entre isolados distantes filogeneticamente, os fragmentos amplificados podem ser o 16S ou 23S DNAr. Esses genes geram padrões de bandeamento mais simples, dependendo das enzimas de restrição utilizadas ([ROSADO et al., 1999](#)).

[Laguerre et al. \(1996\)](#) promoveram, com o uso da ARDRA (16S-23S DNAr), a caracterização de 43 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* de diferentes biovares. A análise dos padrões de restrição da região intergênica 16S-23S DNAr amplificada permitiu a diferenciação das estirpes no nível intra-específico. Os autores afirmam que, por meio dos padrões de bandeamento facilmente analisáveis e reproduzíveis gerados pela restrição da região intergênica, foi possível discriminar as estirpes até o limite determinado pela elevada similaridade existente.

[Azevedo \(1998\)](#) analisou os perfis de restrição da região intergênica 16S-23S DNAr de 71 estirpes de *Azospirillum amazonense*. Seus resultados mostraram, no nível intra-específico, a existência de grande diversidade genética entre essas estirpes.

Este trabalho teve como objetivo verificar, por meio da análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA), o efeito do genótipo da planta e do sítio de coleta na diversidade intra-específica de isolados de *Azospirillum amazonense* oriundos de associações com raízes de *Brachiaria*.

Extração do DNA – Método de extração alcalina

O método usado na extração do DNA dos isolados bacterianos, utilizados como molde para as amplificações específicas via PCR, foi o de lise alcalina das células, adaptado por [Wang et al. \(1993\)](#) e [Audy et al. \(1996\)](#).

As bactérias foram crescidas por 48 horas em meio líquido DYGS ([RODRIGUES NETO et al., 1986](#)) e 1,0 mL dessa suspensão foi centrifugado a 10.000 g por dois minutos. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado ressuspenso em 1,0 mL de água tipo Milli-Q estéril. Esse último procedimento foi repetido três vezes. Após a última lavagem, repetiu-se a centrifugação e dessa vez, o precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL de NaOH (0,5N), ficando em repouso por 10 minutos para a completa lise das células. Em seguida, 10 μL do material lisado foram coletados e diluídos em 490 μL de solução de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0.

PCR (Reação em cadeia da polimerase)

Amplificação da região 16S DNAr

A reação de amplificação ocorreu em 50 μL de uma mistura reacional de 1,25 μL de tween 20; 5,0 μL de Tampão (HCl 100mM; KCl 500mM); 4,0 μL de MgCl_2 (25 mM); 1,0 μL de dNTP (2,5 mM); 1,25 μL (5,0 pmol) dos Primers Y1 e Y3 ([YOUNG et al., 1991](#)); 0,40 μL de *Taq* DNA Polimerase (5 U/ μL) (Promega, Madison, EUA) e 10,0 μL de amostra de DNA molde. As condições de termociclagem foram: Uma etapa inicial de desnaturação (93 °C por 2 min) seguido por 35 ciclos intermediários (93 °C por 45 seg; 62 °C por 45 seg; 72 °C por 2 min) e uma etapa terminal de extensão (72 °C por 5 min) seguido por resfriamento (15 °C por 15 min) para parar a reação.

Amplificação da região 23S DNAr

A reação de amplificação ocorreu em 50 μL de uma mistura reacional de 5,0 μL de Tampão (HCl 100mM; KCl 500mM); 6,0 μL de MgCl_2 (25 mM); 1,0 μL de dNTP (2,5 mM); 0,5 μL (50 pmol) dos Primers 939 e 317 ([LUDWIG et al., 1994](#)); 0,40 μL de *Taq* DNA Polimerase (5 U/ μL) (Promega, Madison, EUA) e 10,0 μL de amostra de DNA molde. As condições de termociclagem foram: uma etapa inicial de desnaturação (95 °C por 3 min) seguido por 35 ciclos intermediários (94 °C por 30 seg; 48 °C por 1 min; 72 °C por 1,5 min) e uma etapa terminal de extensão (72 °C por 10 min) e resfriamento (15 °C por 10 min).

Amplificação da região intergênica 16S-23S DNAr

A reação de amplificação ocorreu em 50 μL de uma mistura reacional de 5,0 μL de Tampão (HCl 100mM; KCl 500mM); 6,0 μL de MgCl_2 (25 mM); 1,0 μL de dNTP (2,5 mM); 1,0 μL (6,67 pmol) dos Primers PHR e P23 ([ARTURO et al., 1995](#)); 0,40 μL de *Taq* DNA Polimerase (5 U/ μL) (Promega, Madison, EUA) e 2,0 μL de amostra de DNA molde. As condições de termociclagem

foram: uma etapa inicial de desnaturação (95 °C por 3 min) seguido por 35 ciclos intermediários (94 °C por 1 min; 60 °C por 1 min; 72 °C por 3 min) e uma etapa terminal de extensão (72 °C por 5 min) e resfriamento (15 °C por 15 min).

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% em TAE 1X, a 65V, por 2,5h. As bandas resolvidas no gel foram visualizadas após coloração com brometo de etídeo sob iluminação ultravioleta e fotografadas com filme Polaroid tipo 667.

Restrição dos fragmentos amplificados por PCR

Os produtos de amplificação das reações de PCR foram incubados a 37 °C em banho-maria por 3h com as endonucleases de restrição *HaeIII*, *AluI*, *RsaI* e *CfoI* (GibcoBRL, Gaithersburg, EUA). Os sítios de corte destas enzimas de restrição estão apresentados na Tabela 1. Para um volume final de 15 μ L de reação, cada sistema de restrição conteve 5U da enzima, 2,0 μ L de tampão de reação (HCl 100mM; KCl 500mM) e 8 μ L de material amplificado. Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3,0% submerso em tampão TAE, a 50V, por 4h. Ao final da eletroforese, os géis foram visualizados após coloração com brometo de etídeo sob iluminação ultravioleta e fotografados com filme Polaroid tipo 667.

Tabela 1. Sítios de corte das enzimas de restrição testadas pela técnica de ARDRA.

Enzimas	Sítios de corte
<i>HaeIII</i>	5' - AG ↓ CT - 3'
<i>AluI</i>	5' - GT ↓ AC - 3'
<i>RsaI</i>	5' - GG ↓ CC - 3'
<i>CfoI</i>	5' - GCG ↓ C - 3'

Análises de agrupamento

Após a restrição, para cada uma das regiões do DNAr utilizada, uma matriz binária dos dados originais foi construída, compreendendo o universo total das bandas de todos os perfis gerados pelas 4 enzimas. Para cada posição de migração, foram atribuídos os valores de 1 ou 0, indicando a presença ou a ausência de uma banda. Os padrões de migração gerados foram comparados e suas semelhanças estimadas pelo coeficiente de Jaccard ([ROHLF, 1992](#)) em

que $J = a/(n-d)$, sendo a o número de combinações com a presença dos fragmentos menos as combinações de ausência dos fragmentos, d o número de combinações de ausência de fragmentos e n o número de combinações possíveis. Os isolados foram agrupados pelo método das médias das distâncias (BUSSABE et al., 1990) e representados graficamente por um dendrograma (NTSYS-pc, versão 1.8, Exeter Software, USA). Para se estimar a capacidade do dendrograma em reproduzir satisfatoriamente a matriz de similaridade, uma matriz cofenética foi calculada e comparada com a matriz de similaridade original.

A correlação observada foi expressa pelo coeficiente de correlação cofenético (r) que nada mais é do que estatística Z do teste de Mantel normalizada.

As Tabelas 2 (isolados de *Brachiaria* spp.) e 3 (estirpes-referência) apresentam as origens e identificação das diversas estirpes utilizadas nos estudos de diversidade apresentados neste trabalho.

Tabela 2. Estirpes de *Azospirillum amazonense* utilizadas neste trabalho.

<i>B. decumbens</i>		<i>B. humidicola</i>		<i>B. brizantha</i>	
37	RE - Ce	64	R - Ce	27	R - Ce
38	RE - Ce	77	R - Ma	36	RE - Ce
41	R - Ce	79	R - Ma	47	RE - Ce
53	RE - Ce	80	RE - Ma	48	R - Ce
72	R - Ma	81	RE - Ma	85	R - Ma
73	RE - Ma	82	R - Ma	87	R - Ma
76	R - Ma	83	RE - Ma	94	R - Ce
87	R - Ma	84	RE - Ma	104	R - Ce
116	RE - Ce	86	RE - Ma	124	R - Ce
118	RE - Ce	97	RE - Ce	125	RE - Ce
120	R - Ma	107	RE - Ce	131	R - Ce
134	RE - Ce	119	R - Ma	138	RE - Ce
137	R - Ce	123	RE - Ce	139	R - Ma
140	R - Ma	127	R - Ce	143	R - Ma
141	R - Ma	132	RE - Ce		
142	R - Ma	135	R - Ce		
		136	R - Ce		

R - raiz; RE - raiz esterilizada superficialmente; Ce - Cerrados; Ma - Mata Atlântica

Tabela 3. Origem das estirpes referência utilizadas neste trabalho.

Espécie/Estirpe	Fonte	Planta	Amostra	Referência
<i>A. lipoferum</i>				
Sp59	BR11008	Trigo	raízes	Tarrand et al. (1978)
Brasilense				
Sp7	BR11002	<i>Digitaria decumbens</i>	rizosfera	Tarrand et al. (1978)
CD	BR11001	<i>Cynodon dactylon</i>	rizosfera	Tarrand et al. (1978)
<i>A. amazonense</i>				
CBAMC	BR11145	Cana-de-açúcar	raízes	-
Y2	BR11140	<i>Hyparrhenia rufa</i>	raízes	Magalhães et al. (1983)
<i>H. seropedicae</i>				
Z67	BR11175	Arroz	raízes	Baldani et al. (1996)

BR – Coleção de Culturas da *Embrapa Agrobiologia*

PCR (Reação em cadeia da polimerase)

Amplificaram-se por PCR diferentes regiões do DNAr de isolados de raízes provenientes de três espécies de *Brachiaria*, assim como das estirpes-referência de *Azospirillum amazonense* (CBAMC, Y2), *A. brasilense* (Cd, Sp7), *A. lipoferum* (Sp59) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67).

Todos os produtos de amplificação da região 16S DNAr (35 isolados) apresentaram uma única banda com tamanho de aproximadamente 1450pb (Figura 1). Esse tamanho do fragmento corresponde ao esperado, pois os *primers* utilizados flanqueiam quase todo o gene que apresenta tamanho médio de 1500pb ([YOUNG et al., 1991](#)).

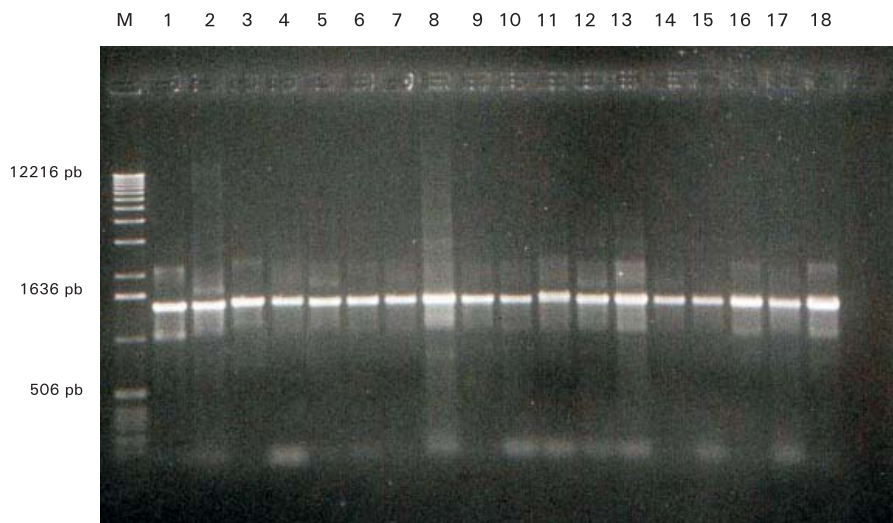


Figura 1. Produtos de amplificação da região 16S DNAr de estirpes-referência de diferentes diazotróficos e novos isolados de *Azospirillum amazonense* provenientes de três espécies de *Brachiaria*. M (marcador 1Kb Ladder), 1 (Y2), 2 (CBAMC), 3 (Z67), 4 (Sp7), 5 (Sp59), 6 (53), 7 (137), 8 (120), 9 (84), 10 (125), 11 (138), 12 (85), 13 (76), 14 (119), 15 (134), 16 (139), 17 (72), 18 (136).

A maioria dos produtos de amplificação da região 23S DNAr (43 isolados) apresentou uma única banda com tamanho de aproximadamente 1400pb ([Figura 2](#)), estando de acordo com a porção desse gene flanqueada pelos *primers*

utilizados neste estudo ([LUDWIG et al., 1994](#)). No entanto, nas colunas 3 e 11 (*Herbaspirillum seropedicae* Z67 e isolado 142) dessa figura, pode-se notar que os fragmentos são um pouco maiores. Diferenças quanto ao tamanho da porção dos genes da 23S RNAr amplificadas por esses *primers* são mostradas quando se estudam bactérias de diferentes subclasses. Das estirpes que apresentaram tamanho maior de seus produtos amplificados, uma pertence à subclasse β das proteobactérias (Z67) e a outra não teve sua classificação confirmada (Isolado 142) (Figura 2), enquanto todas as outras estirpes (*Azospirillum* spp.) pertencem à subclasse α das proteobactérias.

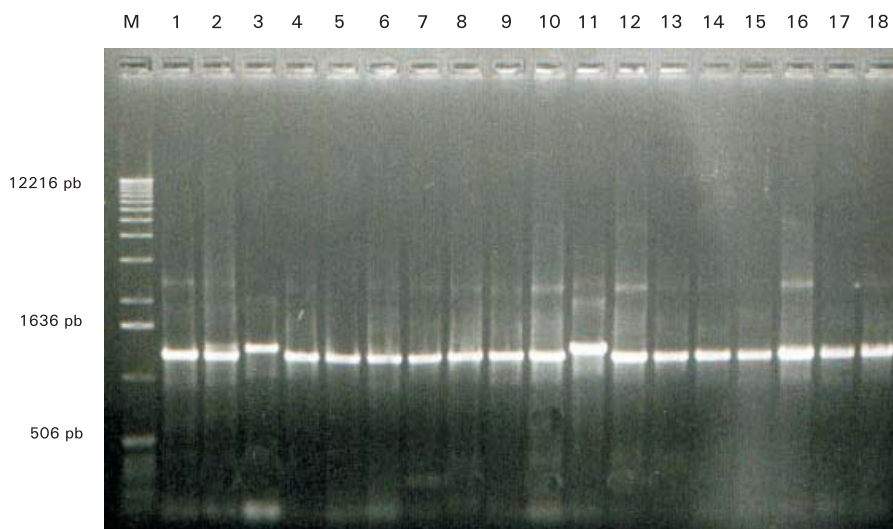


Figura 2. Produtos de amplificação de parte da região 23S DNAr de estirpes-referência de diferentes diazotróficos e novos isolados de *Azospirillum amazonense* provenientes de três espécies de *Brachiaria*. M (marcador 1Kb Ladder), 1 (Y2), 2 (CBAMC), 3 (Z67), 4 (Sp7), 5 (Sp59), 6 (37), 7 (119), 8 (107), 9 (38), 10 (136), 11 (142), 12 (77), 13 (79), 14 (134), 15 (125), 16 (27), 17 (72), 18 (136).

Os produtos de amplificação da região intergênica 16S-23S DNAr (43 isolados) apresentaram-se de maneira diversa, dependendo das espécies analisadas. Da amplificação dessa região para a espécie *A. amazonense*, originaram-se três fragmentos característicos ([AZEVEDO, 1998](#)) de aproximadamente 1000 a 1300pb.

(Figura 3). Dois desses fragmentos de aproximadamente 1000pb foram intensamente amplificados e observados prontamente quando separados por eletroforese em gel de agarose. *A. brasilense* e *A. lipoferum* apresentaram padrão idêntico entre si, com a presença de dois fragmentos entre 1000 e 800pb. Um único fragmento de aproximadamente 1000pb foi observado quando a espécie analisada foi *Herbaspirillum seropedicae*.

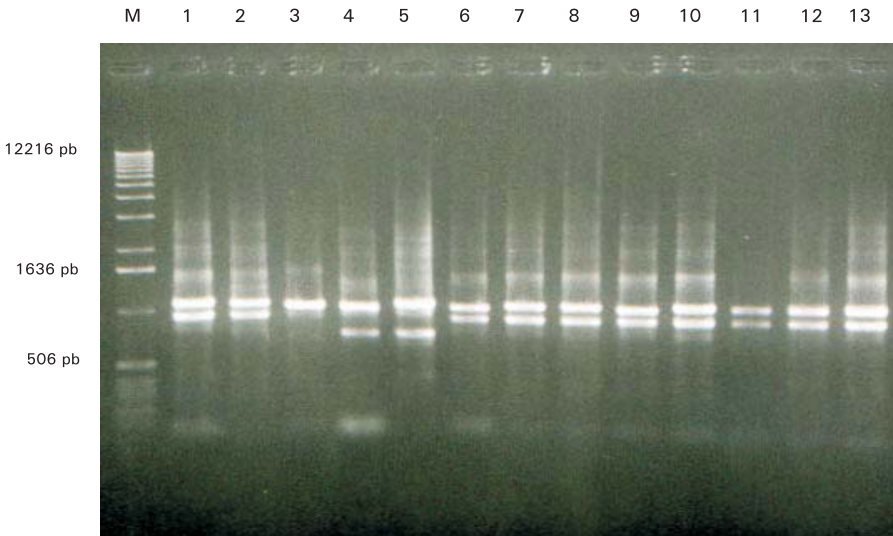


Figura 3. Produtos de amplificação da região intergênica 16S-23S DNAr de estirpes-referência de diferentes diazotróficos e novos isolados de *Azospirillum amazonense* provenientes de três espécies de *Brachiaria*. M (marcador 1Kb Ladder), 1 (Y2), 2 (CBAMC), 3 (Z67), 4 (Sp7), 5 (Sp59), 6 (118), 7 (27), 8 (84), 9 (135), 10 (85), 11 (37), 12 (38), 13 (73).

Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura. Na verdade, em contraste aos genes do RNAr que são bastante conservados entre a maioria das espécies de procaríotos, para a região intergênica, espera-se que existam cópias, geralmente, diferenciadas quanto ao tamanho e composição ([DOLZANI et al., 1995](#)), podendo ainda carregar seqüências conservadas com papéis funcionais (genes de RNAt, seqüências antiterminação) ([SIEVERS et al., 1996](#)). Quando os produtos de amplificação apresentam apenas um fragmento, existe a possibilidade de que, no genoma desse microrganismo, exista apenas uma seqüência-alvo ou que pelo menos o tamanho das múltiplas cópias seja

conservado ([DOLZANI et al., 1995](#)). Um exemplo da variabilidade do tamanho e do número de cópias nessa região é dado por [Lagatolla et al. \(1996\)](#) que, caracterizando diferentes serotipos de *Salmonella*, mostraram quatro a oito fragmentos, variando de 700 a 1100pb, como produtos de amplificação do espaço intergênico 16S-23S para diferentes serotipos. Esses autores concluíram que diferentes serotipos de *Salmonella* são caracterizados por diferentes padrões do espaço intergênico. A presença de apenas um fragmento após a amplificação do espaço intergênico foi demonstrada nos estudos de identificação de acetobactérias ([RUIZ et al., 2000](#)), indicando que não existem variações quanto ao tamanho dessa região entre estirpes desse grupo.

Restrição dos fragmentos amplificados por PCR

A restrição dos fragmentos amplificados da região 16S DNAr pelas 4 enzimas de corte freqüente utilizadas ([Figura 4 a, b, c, e d](#)) e ([Figura 5 a, b, c, e d](#)) gerou o total de 53 bandas polimórficas e 23 perfis de restrição distintos. *HaeIII* produziu o maior número de bandas polimórficas (15), seguida pelas enzimas *RsaI* (14), *CfoI* (13) e *AluI* (11). *HaeIII* também apresentou o maior poder discriminatório, gerando 9 perfis de restrição distintos, seguida pelas enzimas *RsaI* (6), *CfoI* (5) e *AluI* (3).

A restrição dos fragmentos amplificados da região 23S DNAr ([Figuras 6 a, b, c e d](#)) e ([Figura 7 a, b, c, e d](#)) gerou o total de 44 bandas polimórficas e 30 perfis de restrição distintos. Mais uma vez a enzima *HaeIII* produziu o maior número de bandas polimórficas (16), seguida pelas enzimas *AluI* (13), *CfoI* (9) e *RsaI* (6). Novamente *HaeIII* mostrou maior poder discriminatório, gerando 11 perfis de restrição distintos, seguida pelas enzimas *CfoI* (9), *AluI* (6) e *RsaI* (4).

Por fim, a restrição dos fragmentos amplificados da região intergênica 16-23S DNAr ([Figura 8 a, b, c, e d](#)) e ([Figura 9 a, b, c e d](#)) gerou o total de 61 bandas polimórficas e 83 perfis de restrição distintos. A enzima *RsaI* produziu o maior número de bandas polimórficas (19), seguida pelas enzimas *HaeIII* (15), *CfoI* (14) e *AluI* (13). *RsaI* também apresentou maior poder discriminatório, gerando 29 perfis de restrição distintos, seguida pelas enzimas *CfoI* (28), *HaeIII* (16) e *AluI* (10).

Ao analisar esses resultados, pode-se constatar a maior variabilidade apresentada pela região intergênica 16S-23S DNAr quando comparada às regiões 16S e 23S (mais conservadas), ressaltando as variações quanto ao tamanho, número de cópias e composição do espaço intergênico ([RUIZ et al., 2000](#)).

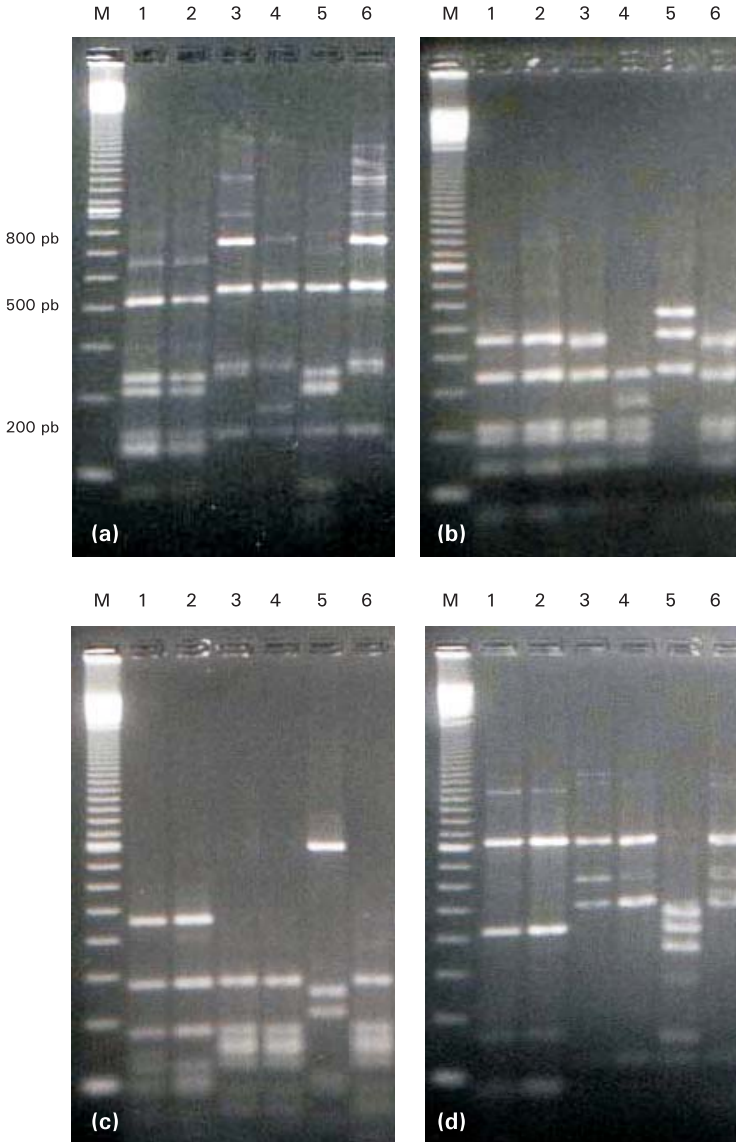


Figura 4. Perfis de restrição dos fragmentos do 16S DNAr de estirpes-referência de *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae*; Enzima *AluI* (a), Enzima *CfoI* (b), enzima *HaeIII* (c), Enzima *RsaI* (d); M (marcador 100pb ladder), 1 (Y2), 2 (CBAMC), 3 (CD), 4 (Sp59), 5 (Z67), 6 (Sp7).

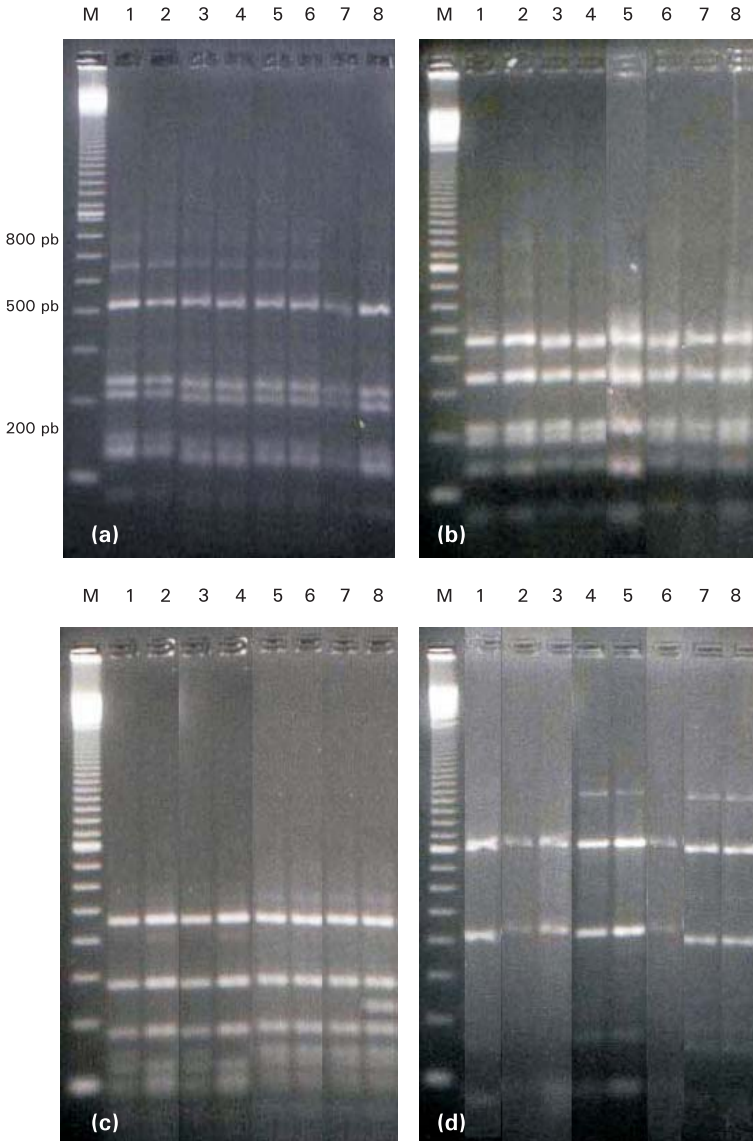


Figura 5. Perfis de restrição dos fragmentos do 16S DNAr de novos isolados de *Azospirillum amazonense* provenientes de três espécies de *Brachiaria*; Enzima *AluI* (a), Enzima *CfoI* (b), Enzima *HaeIII* (c), Enzima *RsaI* (d); M (marcador 100pb ladder), 1 (27), 2 (36), 3 (53), 4 (76), 5 (77), 6 (118), 7 (125), 8 (135).

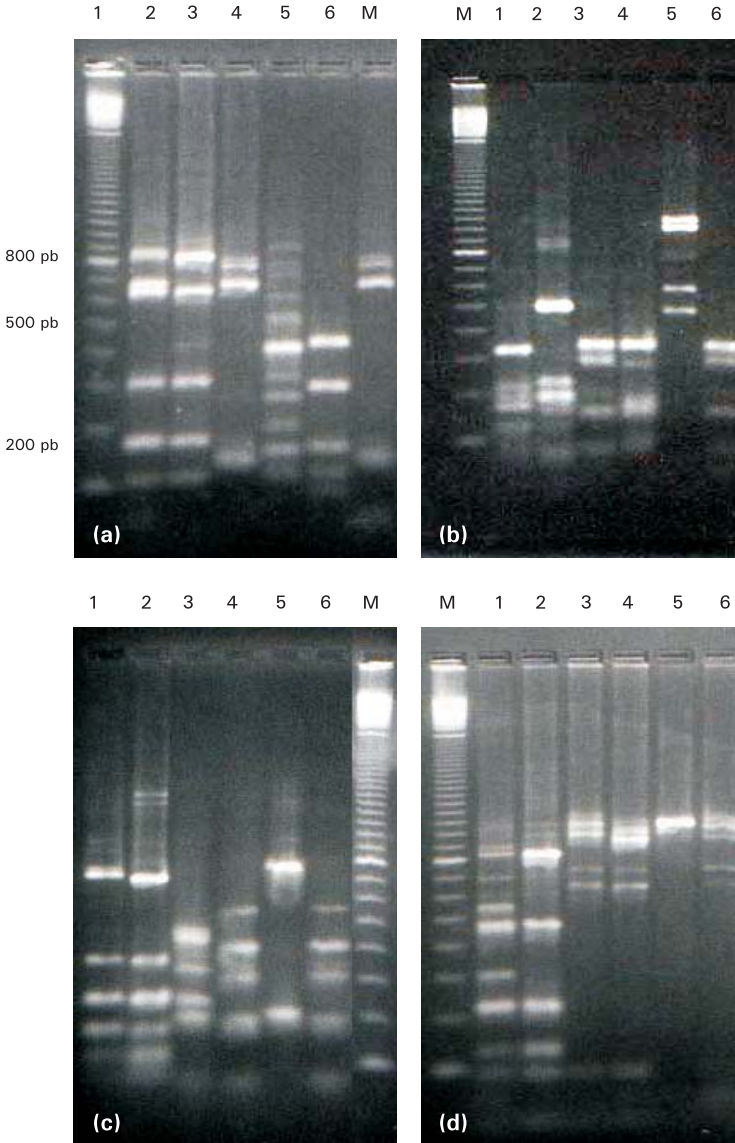


Figura 6. Perfis de restrição dos fragmentos do 23S DNAr de estirpes-referência de *A. lipoferum*, *A. brasiliense*, *A. amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae*; Enzima *AluI* (a), Enzima *CfoI* (b), Enzima *HaeIII* (c), Enzima *RsaI* (d); M (marcador 100pb ladder), 1 (Y2), 2 (CBAMC), 3 (CD), 4 (Sp59), 5 (Z67), 6 (Sp7).

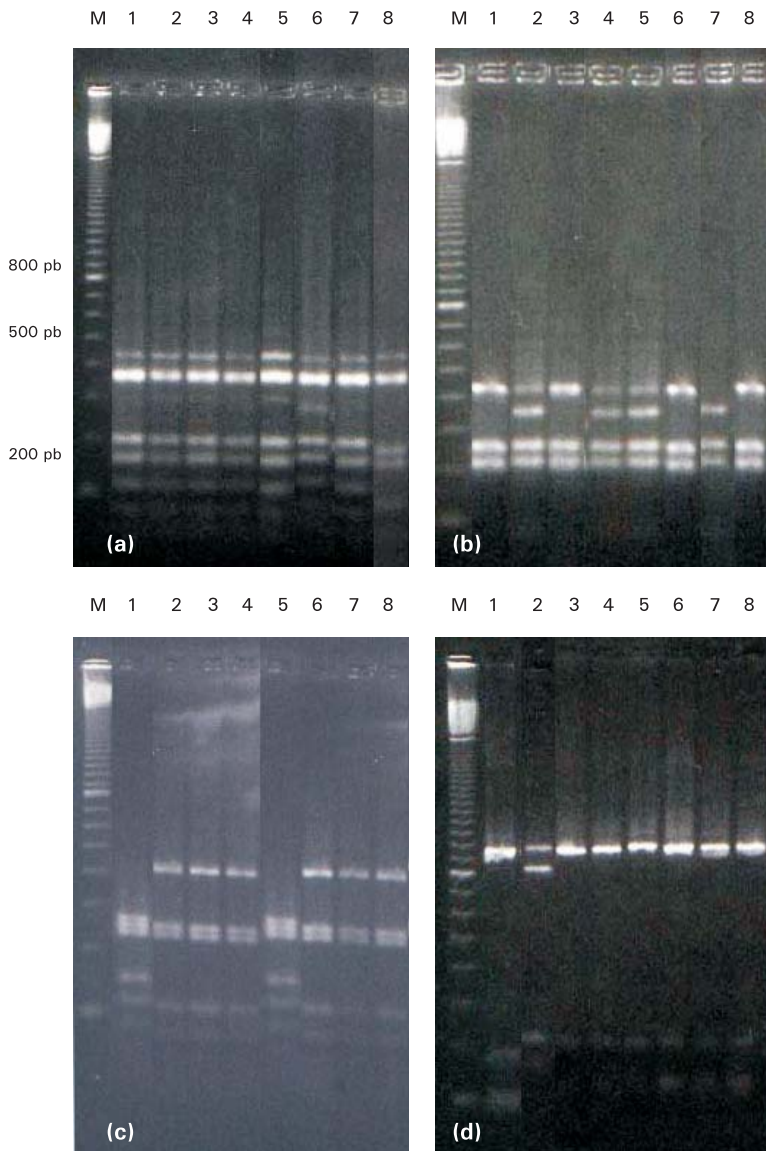


Figura 7. Perfis de restrição dos fragmentos do 23S DNAr de novos isolados de *Azospirillum amazonense* provenientes de três espécies de *Brachiaria*; Enzima *AluI* (a), Enzima *CfoI* (b), Enzima *HaeIII* (c), Enzima *RsaI* (d); M (marcador 100pb ladder), 1 (27), 2 (36), 3 (53), 4 (76), 5 (77), 6 (118), 7 (125), 8 (135).

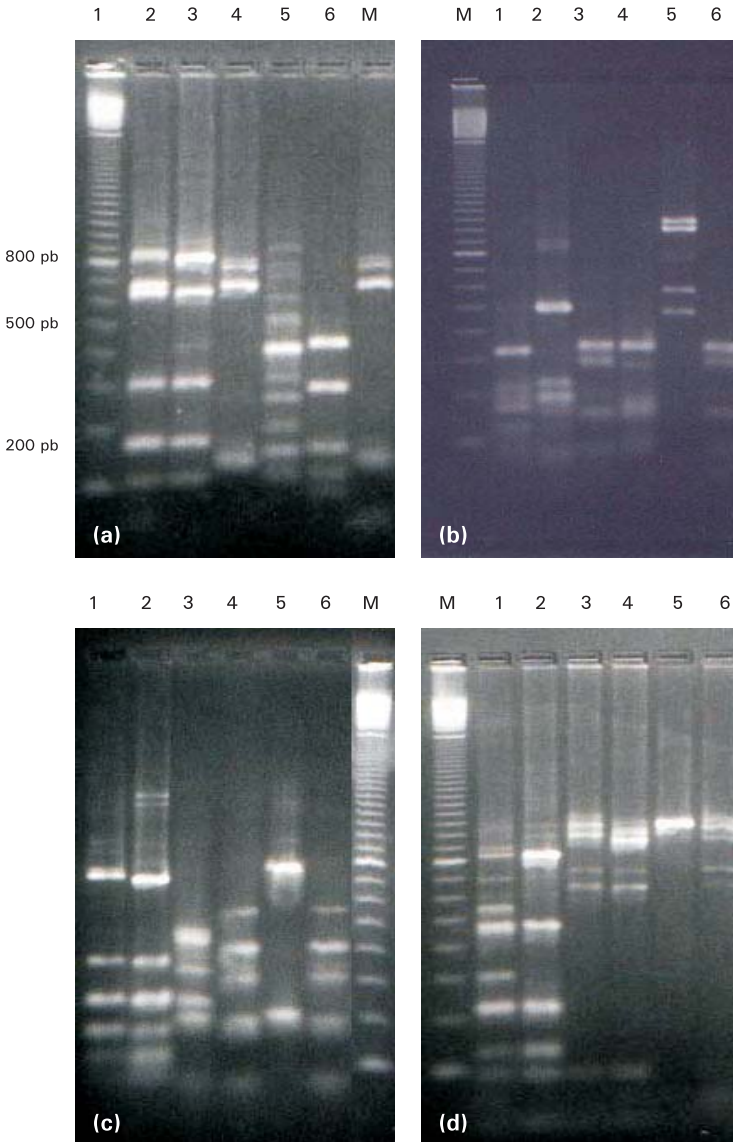


Figura 8. Perfis de restrição dos fragmentos da região intergênica 16S-23S DNAr de estirpes-referência de *A. lipoferum*, *A. brasiliense*, *A. amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae*; Enzima *AluI* (a), Enzima *CfoI* (b), Enzima *HaeIII* (c), Enzima *RsaI* (d); M (marcador 100pb ladder), 1 (Y2), 2 (CBAMC), 3 (CD), 4 (Sp59), 5 (Z67), 6 (Sp7).

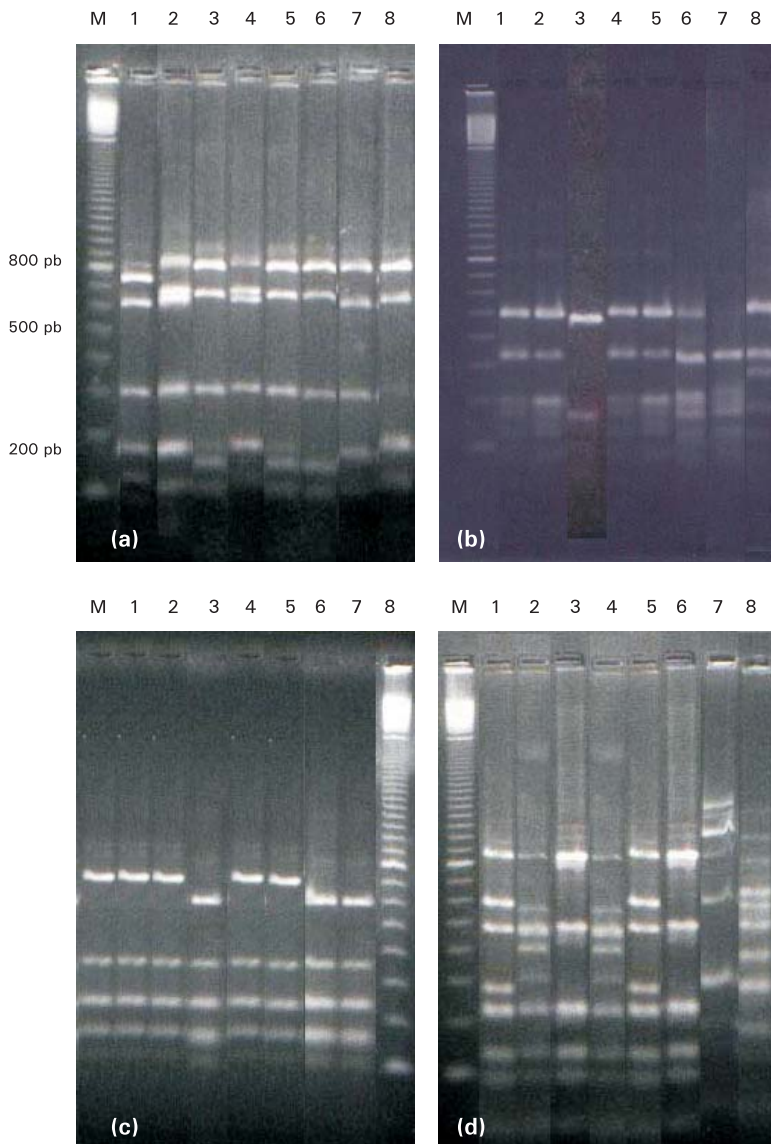


Figura 9. Perfis de restrição dos fragmentos da região 16S-23S DNAr de novos isolados de *Azospirillum amazonense* provenientes de três espécies de *Brachiaria*; Enzima *AluI* (a), Enzima *CfoI* (b), Enzima *HaeIII* (c), Enzima *RsaI* (d); M (marcador 100pb ladder), 1 (27), 2 (36), 3 (53), 4 (76), 5 (77), 6 (118), 7 (125), 8 (135).

Análises de agrupamento

O dendrograma construído a partir da matriz de similaridade genética de Jaccard, calculada pela análise do perfil de fragmentos de restrição da região 16S DNAr, agrupou a maioria dos 35 isolados de raízes de *Brachiaria* pré-caracterizados morfológicamente como *A. amazonense* (Figura 10). À exceção dos isolados 141 e 142, todos os outros isolados formaram dois grupos muito similares (90% de similaridade) nos quais estão inseridas as duas estirpes-referência de *A. amazonense* (CBAMC, Y2). As outras estirpes-referência formaram grupos distintos, para *A. brasiliense* (CD, Sp7), *A. lipoferum* (Sp59) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), todos afastados pelo menos 60% de *A. amazonense*. A análise desse dendrograma vai ao encontro das afirmações de [Dekhil et al. \(1997\)](#) que, após o seqüenciamento da 16S RNAr de espécies do gênero *Azospirillum*, mostraram a formação de dois subgrupos distintos, com *A. lipoferum* e *A. brasiliense* fazendo parte do primeiro e *A. amazonense*, mais afastado, no segundo subgrupo. Os isolados 141 e 142 formaram grupos individuais e provavelmente pertencem a espécies diferentes daquelas aqui representadas.

Essa análise de restrição foi eficaz no trabalho de confirmação das avaliações morfológicas. [Ruiz et al. \(2000\)](#) utilizaram essa metodologia com eficiência para a identificação de espécies de acetobactérias. Esses autores afirmaram que essa identificação vem sendo tradicionalmente feita com estudos de propriedade fisiológicas e quimiotaxonômicas, mas não são completamente confiáveis e demandam mais tempo que as análises de restrição. Em isolados naturais, provenientes de sete diferentes amostras de solo, caracterizados morfológicamente como *Azospirillum*, a utilização da técnica de ARDRA (16S DNAr) permitiu que [Han e New \(1998\)](#) confirmassem que seus isolados pertenciam a pelo menos quatro espécies desse gênero, *A. brasiliense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense* e *A. halopraeferans*. [Brasil \(2001\)](#) utilizou com sucesso essa mesma técnica para o agrupamento de isolados do gênero *Azospirillum* provenientes de plantas forrageiras da região do Pantanal Sul Mato-Grossense.

O dendrograma construído com base na matriz de similaridade genética de Jaccard, calculada pela análise dos perfis de restrição da porção 23S DNAr amplificada (Figura 11), assim como aquele construído com dados da região 16S DNAr, foi capaz de separar os isolados em nível de espécie. No entanto, com os dados dessa região, pode-se observar maior diversidade intra-específica com os isolados de *A. amazonense* formando dois grupos a partir de 75% de

similaridade. Apesar de a utilização da região do 16S DNAr ser mais difundida em trabalhos de diferenciação e caracterização de microrganismos em nível de espécie, a região do 23S DNAr também pode ser utilizada com essa finalidade. [Teskaye et al. \(1997\)](#) utilizaram a região 23S DNAr para mostrar as relações filogenéticas existentes entre diversas estirpes de diferentes espécies de *Rhizobium*.

Analisando as [Figuras 11 e 12 \(A e B\)](#), pode-se perceber um possível efeito sobre a diversidade dos isolados analisados em função do sítio experimental de onde foram obtidos, assim como da espécie de *Brachiaria* com as quais os isolados encontravam-se associados. Enquanto o grupo I é formado em sua maioria por isolados provenientes de amostras coletadas em Goiás (Cerrado), o grupo II tem mais de 60% dos isolados provenientes de amostras coletadas na Bahia (Mata Atlântica). Da mesma maneira, o grupo II é formado em grande parte por isolados de *B. humidicola* (> 70%), seguidos por isolados de *B. brizantha* e *B. decumbens* em proporções bem inferiores. A provável influência dos sítios experimentais e das espécies das plantas sobre a diversidade desses microrganismos será discutida posteriormente.

Como mostrado no dendrograma construído com dados da região 16S DNAr, os isolados 141 e 142 não se agruparam com o restante dos isolados de *A. amazonense* e, assim como os isolados 94, 143 e 97, devem pertencer a outra espécie.

Como era esperado, o dendrograma construído com os dados da região intergênica 16S-23S DNAr ([Figura 13](#)) apresentou grande diversidade com os isolados de *A. amazonense* formando 4 grupos definidos 70% de similaridade. [Azevedo \(1998\)](#), em estudo semelhante com isolados de *A. amazonense* provenientes de arroz, milho e sorgo, cultivados em dois diferentes tipos de solo, revelou a existência de 5 grupos distintos, predominantes e evidentes, formados a 78% de similaridade. Esse comportamento evidencia, no nível intraespecífico, alta variabilidade genética entre os isolados. De maneira similar, [Rosado et al. \(1998\)](#) também foram capazes de observar alta variabilidade genética entre isolados de *Paenibacillus azotofixans* oriundos da rizosfera e rizoplano de diversas gramíneas. É possível que os padrões genotípicos diversos dos isolados de *A. amazonense* possam ser um reflexo da elevada capacidade de sobrevivência e colonização dessa espécie. Além disso, as alterações no genoma bacteriano, a recombinação e os processos naturais seletivos e evolutivos também poderiam ser responsáveis pela alta variabilidade observada ([AZEVEDO, 1998](#)).

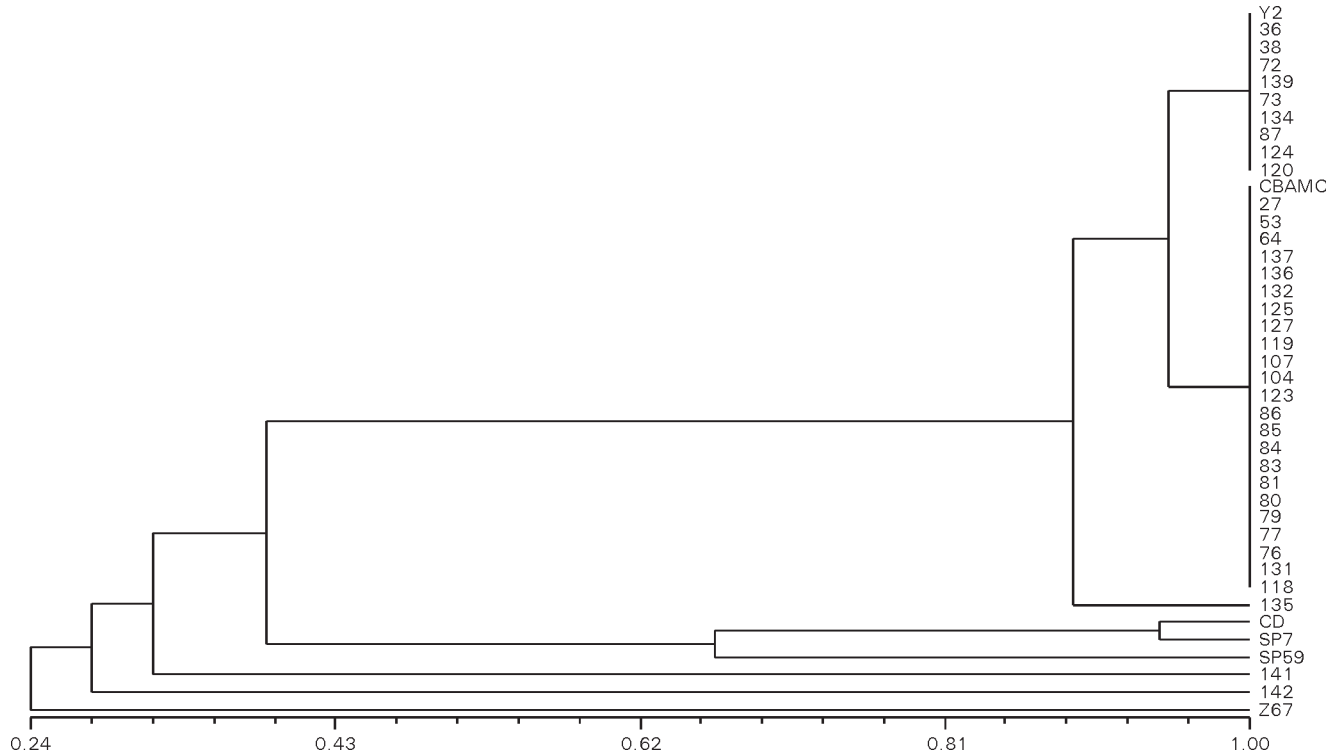


Figura 10. Dendrograma de similaridade de 34 isolados de raízes provenientes das três espécies de *Brachiaria* estudadas e das estirpes-referência de *Azospirillum amazonense* (CBAMC, Y2), *A. brasilense* (CD, Sp7), *A. lipoferum* (Sp59) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67). Esse dendrograma foi gerado pelo algoritmo UPGMA e matriz de similaridade Jaccard a partir dos dados de restrição da porção 16S DNAr amplificada por PCR.

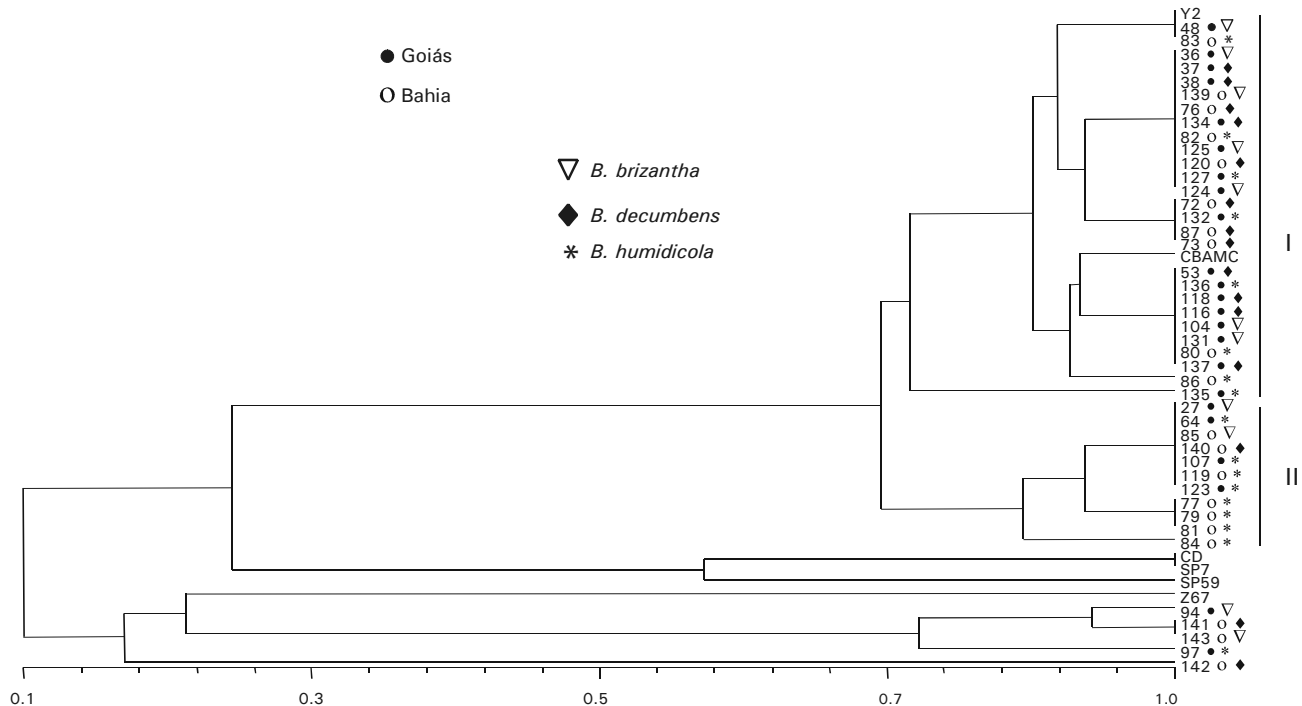


Figura 11. Dendrograma de similaridade de 43 isolados de raízes de *Brachiaria* (evidenciando os sítios de origem e espécies de *Brachiaria*) e das estirpes-referência de *Azospirillum amazonense* (CBAMC, Y2), *A. brasilense* (CD, Sp7), *A. lipoferum* (Sp59) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67). Esse dendrograma foi gerado pelo algoritmo UPGMA e matriz de similaridade Jaccard a partir dos dados de restrição da porção **23S DNAr** amplificada por PCR.

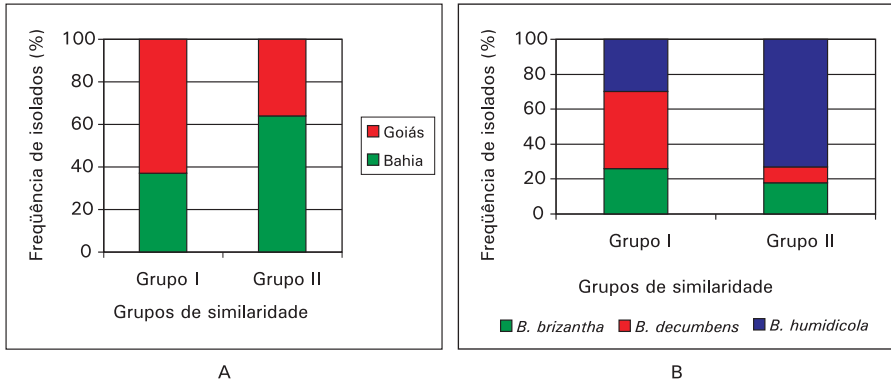


Figura 12. Frequência dos isolados de *A. amazonense* contidos em cada grupo de similaridade, estabelecidos com base nos dados da restrição da porção 23S DNAr amplificada, apresentados na [Figura 11](#), levando-se em consideração o sítio de coleta das amostras (A) e a espécie de *Brachiaria* associada a esses isolados (B). As frequências foram obtidas pela divisão do número de isolados de cada sítio (A) ou espécie (B) representados em determinado grupo pelo número total de isolados presentes nesse grupo.

Devido à formação de grupos intra-específicos com baixos valores de similaridade, a análise taxonômica dos isolados de espécies é dificultada. [Ruiz et al. \(2000\)](#), estudando a diversidade de acetobactérias, fizeram observação semelhante. Esses autores concluíram que em razão da alta variabilidade no tamanho e nas seqüências, presentes no espaço intergênico das acetobactérias, essa região pôde ser usada para o estudo intra-específico, porém, não foi adequada para ser utilizada na classificação de espécies em razão da falta de padrões de identidade entre estirpes pertencentes a uma mesma espécie.

Mais uma vez, nota-se a possível influência dos sítios experimentais na variabilidade genética dos isolados analisados. A grande maioria dos isolados provenientes de Goiás está distribuída nos grupos I a III, enquanto o grupo IV, o mais distante (55% de similaridade), é formado em grande parte por isolados da Bahia ([Figuras 13 e 14A](#)). Esses resultados podem evidenciar influência do tipo de solo na variabilidade genética dos isolados e que poderia ser atribuída às diferentes características ambientais (químicas, físicas e biológicas) de ambos os solos. [Latour et al. \(1996\)](#) demonstraram intensa influência exercida pelo tipo de solo na estrutura populacional de isolados de *Pseudomonas*, sugerindo que as diferentes características ambientais existentes poderiam ser as responsáveis pelo

efeito discriminatório apresentado. [Dalmastrì et al. \(1999\)](#) compararam o efeito de diferentes tipos de solo, cultivares de milho e localização radicular sobre a microdiversidade de *Burkholderia cepacia*. Os resultados indicaram que entre todos os fatores estudados, o solo foi o que apresentou maior efeito sobre a diversidade dos isolados. [Azevedo \(1998\)](#), também mostrou a indiscutível influência do solo (Podzólico Vermelho-Amarelo ou Hidromórfico Cinzento) sobre a diversidade de *A. amazonense*. Sabe-se que os teores de argila, nitrogênio e a capacidade de retenção de água, assim como os teores de areia grossa, podem estar relacionados com a viabilidade de *Azospirillum* ([BASHAN et al., 1994, 1995](#)). Os solos Latossolo Vermelho-Escuro (Goiás) e Podzólico Amarelo (Bahia) apresentam características como textura e retenção de água significativamente distintas, o que poderia explicar em parte as diferenças genéticas observadas entre as estirpes. No entanto, outros fatores não podem ser esquecidos, como as interações com a microfauna do solo. [Latour et al. \(1996\)](#) atribuíram diferenças nos níveis de diversidade de *Pseudomonas* à maior competição por ferro e carbono observada em um dos solos, associada, por sua vez, a uma maior atividade microbiana.

A influência das espécies de *Brachiaria* sobre a diversidade dos isolados analisados foi ainda mais nítida. Analisando as [Figuras 13 e 14B](#), observa-se que a grande maioria dos isolados de *B. decumbens* e *B. brizantha* está distribuída nos grupos I a III e que os isolados de *B. humidicola* concentram-se no grupo IV, o mais distante com 55% de similaridade. Um fato interessante é que *B. decumbens* cv. Basilisk (cultivar utilizada neste trabalho) é na verdade um ecótipo intermediário entre as espécies de *B. brizantha* e *B. decumbens* ([VALLE et al., 2000](#)). Enquanto *B. decumbens* cv. Basilisk e *B. brizantha* cv. Marandu são tetraplóides, *B. humidicola* é hexaplóide. Segundo [Valle et al. \(2000\)](#), diferenças na ploidia permitem inferir sobre a distância genética entre os acessos de *Brachiaria*.

A composição de plantas em determinada área pode influenciar a diversidade da comunidade microbiana devido à variabilidade da composição química de seus exsudatos ([CHRISTENSEN, 1989](#)). Esses compostos influenciam a comunidade microbiana alterando a composição química do solo nas vizinhanças das raízes e servindo como substratos seletivos para o crescimento dos microrganismos do solo. Na verdade, a variedade de compostos orgânicos liberados pelas plantas tem sido enfatizada como o fator-chave de influência na diversidade de microrganismos presentes na rizosfera de diferentes espécies vegetais (BOWEN; ROVIRA, 1991, citado por [GRAYSTON et al., 1998](#)).

Sabe-se que a quantidade e a qualidade dos exsudatos e compostos relacionados, liberados no solo pelas raízes das plantas, podem variar em função de vários fatores além da espécie da planta, como região da raiz, tipo de solo, condição nutricional, idade e estresses, entre outros (YANG; CROWLEY, 2000). Vietor (1982) obteve resultados mostrando que *Paspalum notatum* translocou 7% dos fotossintatos para as raízes e exsudou 1,1%, já *Panicum coloratum* e *Pennisetum americanum* translocaram 12%, mas exsudaram apenas 0,4%. Pode ser mais que uma coincidência que *P. notatum* seja característico de regiões subtropicais com solos pobres onde é maior a necessidade de associações com fungos micorrízicos e/ou bactérias diazotróficas.

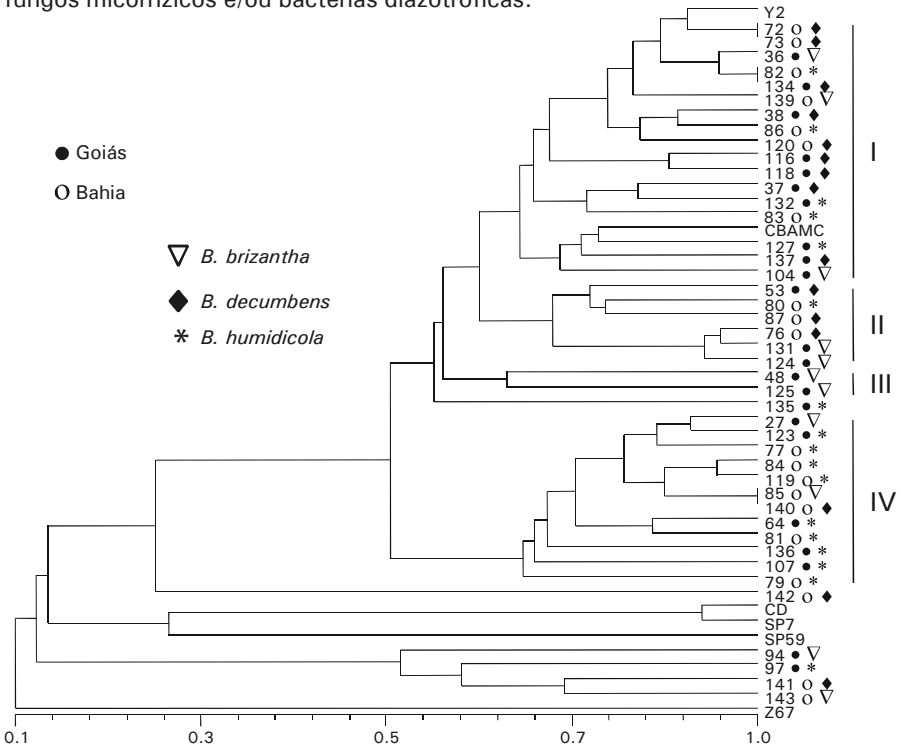


Figura 13. Dendrograma de similaridade de 43 isolados de raízes de *Brachiaria* (evidenciando os sítios de origem e espécies de *Brachiaria*) e das estirpes-referência de *Azospirillum amazonense* (CBAMC, Y2), *A. brasilense* (CD, Sp7), *A. lipoferum* (Sp59) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67). Esse dendrograma foi gerado pelo algoritmo UPGMA e matriz de similaridade Jaccard a partir dos dados de restrição da região intergênica 16S-23S DNAr amplificada por PCR.

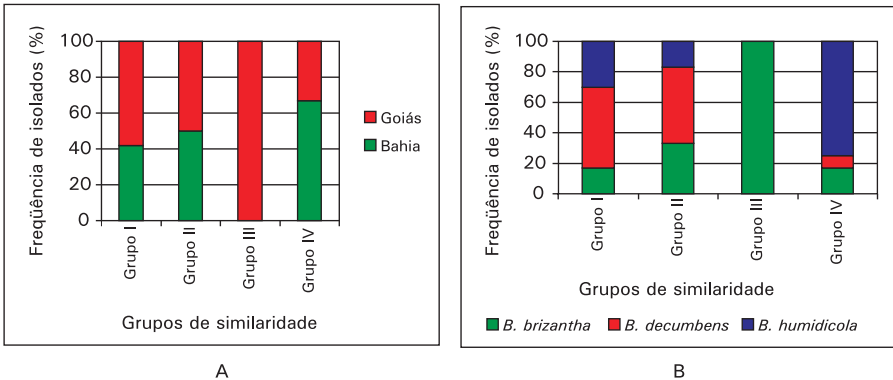


Figura 14. Frequência dos isolados de *A. amazonense* contidos em cada grupo de similaridade, estabelecidos com base nos dados da restrição da região intergênica 16S-23S DNAr amplificada, apresentados na [Figura 13](#), levando em consideração o sítio de coleta das amostras (A) e a espécie de *Brachiaria* associada a esses isolados (B). As frequências foram obtidas pela divisão do número de isolados de cada sítio (A) ou espécie (B) representados em determinado grupo pelo número total de isolados presentes neste grupo.

[Lemanceau et al. \(1995\)](#) e [Latour et al. \(1996\)](#) observaram efeitos discriminatórios de plantas sobre isolados de *Pseudomonas* quando cultivada em mesmo solo. Zhang et al. (1999), citado por [Schloter et al. \(2000\)](#), investigaram a filogenia e a diversidade de 22 estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* isoladas de nódulos de duas cultivares de amendoim. Utilizando marcadores fenotípicos e genotípicos, esses autores mostraram forte influência das cultivares sobre a diversidade desses microrganismos.

[Azevedo \(1998\)](#) mostrou que a microdiversidade de *A. amazonense* isolada do interior de raízes poderia estar sendo influenciada pela espécie da planta, com efeitos discriminatórios altamente significativos, embora parciais, exercidos por plantas de arroz, milho e, em menor intensidade, sorgo. Em função dessas evidências, esse autor propôs que os padrões de especificidade da interação *A. amazonense* – planta pudessem ocorrer em nível intra-específico e não em nível de espécie.

Estes resultados de estudos de diversidade de *A. amazonense*, podem ser indicados como possíveis fatores de influência nas taxas de FBN associadas a essas plantas, assim como na sua adaptabilidade a solos de baixa fertilidade.

A associação entre *Azospirillum* e *Brachiaria* pode nos fazer vislumbrar a possibilidade de inoculação de áreas de pastagens. [Zaady et al. \(1994\)](#) e [Itzigsohn et al. \(2000\)](#) mostraram que a inoculação de *Azospirillum* em pastagens tem grande potencial para tornar-se uma técnica aplicável a esses sistemas em condições de deficit hídrico e/ou baixa fertilidade. Apesar de existirem formulações de inoculantes de *Azospirillum* comercialmente disponíveis em alguns países, estudos sobre sua utilização ou de outras rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, em pastagens, são muito escassos. Ainda não existem informações suficientes dos efeitos da inoculação de *Azospirillum* sobre essas áreas. No entanto, o uso desses microrganismos, associado a um adequado manejo do solo, baseado em comparações com a aplicação de fertilizantes, parece ser mais vantajoso economicamente ([OKON; VANDERLEYDEN, 1997](#)) e do ponto de vista ecológico e ambiental apresenta relativamente nenhum impacto negativo ao meio ambiente ([ITZIGSOHN et al., 2000](#)).

Conclusões

1. O perfil de fragmentos de restrição da região 16S e 23S DNAr confirma a identidade dos isolados de *A. amazonense* que anteriormente havia sido caracterizado com base em características morfológicas.
2. As análises de agrupamento, realizadas com os resultados da restrição das regiões 23S e intergênica do DNAr, evidenciam a variabilidade genética dos isolados de *A. amazonense* e apontam para possíveis efeitos dos tipos de solo/ambiente e espécie de *Brachiaria*.

Referências Bibliográficas

ARTURO, A.; ODELSOR, D. A.; HICHEY, R. F.; TIEDJE, J. M. Bacterial community fingerprint of amplified 16S and 16S-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: Akkermans, A. D. L.; Elsas, J. D. V.; Bruijn, F. J. (Ed.). **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 1-8.

AUDY, P.; BRAAT, C. A.; SAIDON, G.; HUANG, H. C.; LATOCHE, A. A rapid and sensitive PCR-Based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, p. 361-366, 1996.

AZEVEDO, M. S. **Influência do solo e da planta hospedeira sobre a diversidade gênica de isolados de *Azospirillum amazonense* associados às raízes de arroz, milho e sorgo.** 1998. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BALDANI, J. I. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz.** 1984. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans* a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group1) as *Herbaspirillum* Species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 46, p. 802-810, 1996.

BASHAN, Y.; PUENT, M. E.; RODRIGUEZ-MENDOZA, M. N.; HOLGUIN, G.; TOLEDO, G.; FERRERA-CERRATO, R.; PEDRIN, S. Soil parameters which affect survival of *Azospirillum brasilense*. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. (Ed.). ***Azospirillum VI and related microorganisms***: genetics, physiology, ecology. Berlin: Springer, 1994. p. 441-449.

BASHAN, Y.; PUENT, M. E.; RODRIGUEZ-MENDOZA, M. N.; TOLEDO, G.; HOLGUIN, G.; FERRERA-CERRATO, R.; PEDRIN, S. Survival of *Azospirillum brasilense* Cd and Sp-245 in the rhizosphere of 23 soil types. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1938-1045, 1995.

BODDEY, R. M.; VICTORIA, R. L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ¹⁵N labelled organic matter and fertilizer. **Plant & Soil**, The Hague, v. 90, p. 256-292, 1986.

BRASIL, M. S. **Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal da Nhecolândia – MS.** 2001. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BUSSABE, W. O.; MIAZAKI, É. S.; ANDRADE, D. F. **Introdução à análise de agrupamentos.** São Paulo: ABE: IME; USP, 1990 105 p. Trabalho apresentado no 9º Simpósio Brasileiro de Probabilidade e Estatística, 1990, São Paulo.

CHRISTENSEN, M. A view of fungal ecology. **Mycologia**, New York, v. 81, p. 1-19, 1989.

DALMASTRI, C.; CHIARINI, L.; CANTALE, C.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. **Microbial Ecology**, New York, v. 38, p. 274-283, 1999.

DEKHIL, S.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largomobolis* subsp. *largomobolis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobolis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 20, p. 72-77, 1997.

DOLZANI, L.; TONIN, E.; LAGATOLLA, C.; PRANDIN, L.; MONTI-BRAGADIN, C. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, p. 1108-1113, 1995.

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

GRIFONI, A.; BAZZICALUPO, M.; DI SERI, C.; FANCELLI, S.; FANI, R. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of 16S rDNA and of the histidine operon. **FEMS Microbiological Letters**, v. 127, p. 85-91, 1995.

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

HERBERT, R. A. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. **Methods in Microbiology**, v. 19, p. 1-40, 1990.

ITZIGSOHN, R.; BURDMAN, S.; OKON, Y.; ZAADY, E.; YONATAM, A.; PEREVOLOTSKY, A. Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under suboptimal growth conditions. **Arid Soil Research and Rehabilitation**, v. 13, p. 151-158, 2000.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, p. 65-76, 1999.

LAGATOLLA, C.; DOLZANI, L.; TONIN, E.; LAVENIA, A.; DI MICHELE, M.; TOMMASINI, T.; MONTI-BRAGADIN, C. PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 2440-2443, 1996.

LAGUERRE, G.; MAVING, P.; ALLARD, M. R.; CHARNAY, M. D.; LOUVRIER P.; MAZURIER, S. I.; GOIS, L. R.; AMARGED, N. Typing of Rhizobia by PCR DNA Fingerprinting and PCR - Restriction Fragment Length Polymorfism Analysis of chromossomal and symbiotic gene regions : Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2029-2036, 1996.

LANE, D. L.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribossomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Washington, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LATOUR, X.; CORBERAND, T.; LAGUERRE, G.; ALLARD, F.; LEMANCEAU, P. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2449-2456, 1996.

LEMANCEAU, P.; CORBERAND, T.; GARDAN, L.; LATOUR, X.; LAGUERRE, G.; BOEUGRAS, J.; ALABOUVET, C. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Licopersicum esculentum* Mill.), on the diversity of soilborn populations of fluorescent pseudomonads. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1004-1012, 1995.

LOUREIRO, M. F.; BODDEY, R. M. Balanço de nitrogênio em quatro gramíneas do gênero *Brachiaria*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 1343-1353, 1988.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiological Review**, v. 15, p. 155-173, 1994.

LUDWING, W.; DORN, S.; SPRINGER, N.; KIRCHHOF, G.; HARTMANN, A. PCR-based preparation of 23S rRNA-target group-specific polynucleode probe.

Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 60, p. 3236-3244, 1994.

MAGALHÃES, F. M. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News**, v. 63, p. 364-370, 1997.

OLIVEIRA, O. C.; OLIVEIRA, I. P.; FERREIRA, E.; ALVES, B. J. R.; CADISCH, G.; MIRANDA, C. H. B.; VILELA, L.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. A baixa disponibilidade de nutrientes do solo como uma causa potencial da degradação de pastagens no cerrado brasileiro. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS - SINRAD, 3, 1997, Ouro Preto. **Anais...** Viçosa: UFV, 1997. p. 110-117.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri Tipo B. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 12, p. 16, 1986.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc – Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: State University of New York, 1992.

ROSADO, A. S.; AZEVEDO, F. S. de; CRUZ, D. W. da; VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L. Phenotypic and genetic diversity of *Paenibacillus azotofixans* strains from the rhizoplane or rhizosphere soil of different grasses. **Journal of Applied Microbiology**, Danvers, v. 84, p. 216-226, 1998.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. A moderna microbiologia do solo: aplicação de técnicas de biologia molecular. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FRUTINI-NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, 1999. p. 429-448.

RUIZ, A.; POBLET, M.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1981-1987, 2000.

SAIKI, R. K.; SCARF, F.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic

sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

Science, Washington, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SCHLOTTER, M.; LEBUHN, M.; HEULIN, T.; HARTMANN, A. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. **FEMS Microbiological Review**, v. 24, p. 647-660, 2000.

SIEVERS, M.; ALONSO, L.; GIANOTTI, S.; BOESCH, C.; TEUBER, M. 16S-23S ribossomal RNA spacer regions of *Acetobacter europaeus* and *A. xylinum*, tRNA genes and antitermination sequences. **FEMS Microbiological Letters**, v. 142, p. 43-48, 1996.

SOUTO, S. M. **Variação estacional da fixação de N₂ e desnitrificação em gramíneas forrageiras tropicais**. 1982. 268 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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

TESFAYE, M.; PETERSON, D. J.; HOLL, F. B. **Comparison of partial 23S rDNA sequences from *Rhizobium* species**. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 526-533, 1997.

VALLE, C. B.; EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M. Características das plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 17., 2000, Piracicaba. **A planta forrageira no sistema de produção**: anais. Piracicaba: FEALQ, 2000. p. 65-108.

VIETOR, D. M. Variation of carbon 14-labelled photosynthate recovery from roots and rooting media of warm season grasses. **Crop Science**, Madison, v. 22, p. 362-366, 1982.

WANG, H.; QI, M.; CUTLER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 21, p. 4153-4154, 1993.

YANG, C.-H.; CROWLEY, D. E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 345-351, 2000.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a

16S rRNA segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 2271-2277, 1991.

ZAADY, E.; OKON, Y.; PEREVOLOTSKY, A. Growth response of Mediterranean herbaceous swards to inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Journal of Range Management**, Denver, v. 47, p. 12-15, 1994.

ZAK, J. C.; WILLIG, M. R.; MOORHEAD, D. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of bacterial communities: a quantitative approach. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1101-1108, 1994.

Restriction Analysis of the Amplified rDNA for Diversity Evaluation of *Azospirillum amazonense* Isolated from Different *Brachiaria* Species

Abstract - *The limitation of nitrogen is considered one of the most important factors for the Brazilian pastures degradation. However there are evidences that pastures formed by some species of Brachiaria could be benefited by the biological nitrogen fixation (BNF) guaranteeing a higher longevity to these pastures. Previous studies showed that the diazotrophic bacteria found in association with Brachiaria were mainly from the Azospirillum amazonense specie. Since associations between these microorganisms and plants are generally conditioned by the vegetation, it is possible that different Brachiaria genotypes can exercise a selective effect on the Azospirillum populations. The aim of this work was to study the intra-specific diversity of A. amazonense isolates and to establish possible influences of different Brachiaria species and edaphoclimatic conditions. The characterisation of the diversity among these isolates was conducted using restriction analysis of different portions of the rDNA. This methodology was capable to show important information regarding the diversity among the studied isolates of A. amazonense, showing possible effects of the environment and Brachiaria species.*

Index terms: Biological nitrogen fixation; diazotrophic bacteria; microbial ecology, pastures.