

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 10

Método Molecular Para Estudos Ecológicos de Bactérias Diazotróficas do Gênero *Paenibacillus* em Amostras Ambientais*

*Márcia R. R. Coelho
Newton P. Carneiro
Ivanildo E. Marriel
Lucy Seldin*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Caixa Postal 151

Fone: (31) 3027 1100

Fax: (31) 3027 1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Antônio Álvaro Corsetti Purcino

Secretário-Executivo: Flávia Cristina dos Santos

Membros: Elena Charlotte Landau, Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes,
Paulo Afonso Viana e Clenio Araujo

Revisor de texto: Clenio Araujo

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Editoração eletrônica: Communique Comunicação

1ª edição

1ª impressão (2009): 200 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).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo

Método molecular para estudos ecológicos de bactérias diazotróficas do gênero *Paenibacillus* em amostras ambientais / Márcia Reed Rodrigues Coelho ... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2009.
26 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1217-1981; 10).

1. Microbiologia do solo. 2. Fixação de nitrogênio. 3. Genética. I. Coelho, Márcia Reed Rodrigues. II. Série.

CDD 631.46 (21. ed.)

Sumário

Introdução	5
Metodologia	7
Resultados e discussão	12
Conclusões	21
Referências	22

Método Molecular Para Estudos Ecológicos de Bactérias Diazotróficas do Gênero *Paenibacillus* em Amostras Ambientais*

Márcia R. R. Coelho¹

Newton P. Carneiro²

Ivanildo E. Marriel²

Lucy Seldin¹

Introdução

A conversão da molécula de N₂ não-reativo a NH₃, forma de N prontamente assimilável pelas plantas, ocorre na maioria dos grupos filogenéticos de bactérias e de Archaea (DIXON; KAHN, 2004). Estes microrganismos fixadores de nitrogênio expressam a enzima nitrogenase codificada pelos genes *nif*, *anf* ou *vnf* (JOERGER et al., 1991; WAUGH et al., 1995). O gene *nifH*, que codifica a subunidade proteína Ferro (Fe) da nitrogenase, é o mais bem estudado entre os genes do operon *nif*, com uma extensa coleção de sequências obtidas de microrganismos cultiváveis e não-cultiváveis de diversos ambientes (DESLIPPE; EGGER, 2006; TAN et al., 2003). Bactérias fixadoras de nitrogênio são encontradas na natureza na forma de vida livre ou em associação com plantas. Sua utilização em

*Documento extraído do artigo "Molecular detection of nitrogen-fixing *Paenibacillus* in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) using specific *nifH*-based primer. *Letters in Applied Microbiology*, 48(5): 611-617. 2009.

¹Pós-doutoranda da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Rio de Janeiro, RJ; ^{1*}Prof. Dra. da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Rio de Janeiro, RJ;

²Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil

práticas agrícolas está tornando-se relevante, visto que a adubação nitrogenada representa uma parcela importante dos custos de produção de culturas não-leguminosas. Além disso, mais da metade do nitrogênio mineral aplicado é perdido do sistema solo-planta, o que pode resultar em impactos negativos ao ambiente, principalmente, através da contaminação de águas superficiais e subterrâneas por nitratos (REJESUS; HORNBAKER, 1999). Por isso, várias alternativas estão sendo exploradas para reduzir a dependência da agricultura por fertilizantes nitrogenados, em sua maioria importados, incluindo o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio (BHATTACHARJEE et al., 2008).

O gênero *Paenibacillus*, que inclui 14 espécies de diazotróficos, é amplamente distribuído no ambiente, sendo encontrado em diferentes tipos de solos, rizosfera e tecidos internos de diversas plantas (BERGE et al., 2002; GARBEVA et al., 2003, 2001; SHISHIDO et al., 1999; VON DER WEID et al., 2002), inclusive de milho e sorgo (COELHO et al., 2008; MOTA et al., 2002; SELDIN et al., 1998). Diversas estirpes pertencentes a essas espécies têm sido extensivamente caracterizadas em função de sua capacidade em produzir hormônios indutores de crescimento da planta, como auxinas e citocininas, enzimas como quitinases, amilases, proteases, e antibióticos, bacteriocinas, e de solubilizar fosfatos orgânicos. Conseqüentemente, associado à capacidade de fornecer nutrientes às plantas através do processo de fixação de nitrogênio, estes microrganismos podem ser considerados como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal.

Diferentes abordagens moleculares, tais como eletroforese em gel de gradiente desnaturante, eletroforese em gel de gradiente de temperatura, polimorfismo do comprimento dos fragmentos terminais de restrição, análise de restrição do DNA ribossomal amplificado e sequenciamento de bibliotecas de clones, estão disponíveis para estudos ecológicos (VAN ELSAS et al., 2006). A maioria destas técnicas baseia-se na amplificação de regiões do gene que codifica o 16S rRNA com diferentes conjuntos de *iniciadores* (iniciadores ou sequências iniciadoras) via PCR (*polymerase*

chain reaction = reação da polimerase em cadeia). Esta técnica, uma das bases para estudos moleculares de diversidade e ecologia microbiana, permite a amplificação de sequências de DNA por meio de iniciadores que são oligonucleotídeos que delimitam uma determinada sequência de DNA que deverá ser amplificada (SAIKI et al., 1988). Dentre as muitas utilidades desta técnica, destaca-se a detecção de microrganismos a partir de amostras ambientais antes consideradas insuficientes para serem analisadas pelos métodos moleculares por possuírem uma quantidade muito pequena de DNA (BRIGLIA et al., 1996; SMALLA et al., 1993), permitindo também o emprego de iniciadores específicos para grupos de microrganismos de interesse. Diferentes sistemas têm sido desenvolvidos para avaliar a diversidade de grupos específicos, como por exemplo, usando iniciadores gênero-específicos (SALLES et al., 2002; SILVA et al., 2003). Neste contexto, o uso de gene *nifH* como marcador molecular pode ser visto como vantajoso, pois pode fornecer evidências da função do processo de fixação biológica de nitrogênio nos ambientes naturais e nos agroecossistemas (YOUNG, 1992).

Com base neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e testar um protocolo de PCR específico para a amplificação de espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Paenibacillus*, utilizando-se a estratégia de clonagem e sequenciamento do gene *nifH*.

Metodologia

Cultivo e estocagem das estirpes bacterianas utilizadas

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

Tabela 1. Estirpes de bactérias utilizadas e especificidade do sistema PCR baseado em genes *nifH* de *Paenibacillus*

Espécies	Estirpes	Produto de PCR (280 bp)	Origem/referência
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	LMD 24.16 ^T	+	University of Delft, The Netherlands
<i>P. peoriae</i>	HSCC 353 ^T	+	Montefusco et al., 1993
<i>P. brasilensis</i>	172 ^T	+	Von der Weid et al., 2002
<i>P. macerans</i>	LMD 24.10 ^T	+	University of Delft, The Netherlands
<i>P. graminis</i>	RSA19 ^T	+	Berge et al., 2002
<i>P. durus</i>	P3L5 ^T	+	Seldin et al., 1984
<i>P. odorifer</i>	TOD45 ^T	+	Berge et al., 2002
<i>P. borealis</i>	KK19 ^T	+	Elo et al., 2001
<i>P. sabinae</i>	DSM 17841 ^T	+	Ma et al., 2007a
<i>P. zanthoxyli</i>	DSM 18202 ^T	+	Ma et al., 2007b
<i>P. campinasensis</i> ^a	KCTC 0364BP ^T	-	Yoon et al., 1998
<i>Bacillus licheniformis</i> ^a	T6-3	-	IMPPG-UFRJ
<i>Azospirillum brasilense</i> ^b	Sp7	-	EMBRAPA-CNPMS/ Agrobiologia
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> ^b	Z67	-	EMBRAPA-CNPMS/ Agrobiologia
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> ^b	PAL5	-	Prof. Orlando B. Martins, UFRJ

^a espécies não fixadoras de N_2

^b outros gêneros de diazotróficos

O experimento de campo foi realizado na Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), Minas Gerais, Brasil, localizada na latitude 19° 28'S e longitude 44° 15'W, em um latossolo vermelho distrófico, fase cerrado, com dois níveis de adubação nitrogenada, 12 e 120 kg ha⁻¹, baixo e alto N, respectivamente. As análises físicas e químicas do solo foram descritas anteriormente (COELHO et al., 2007). No presente estudo, foi utilizada a cultivar de sorgo BRS 308.. As parcelas experimentais foram constituídas de duas linhas de 5 m de comprimento, com espaçamento de 0,8 m entre linhas e 0,2 m entre plantas, com duas repetições em delineamento de blocos casualizados. As amostras compostas de solo rizosférico, constituídas de subamostras de cinco plantas cada, foram coletadas aos 90 dias após o plantio. As plantas foram retiradas do solo com o sistema radicular inteiro e separadas em parte aérea e raízes. As raízes foram sacudidas e somente o solo bem aderido às raízes foi considerado como solo rizosférico. Este foi colocado em sacos plásticos estéreis e levado do campo para o laboratório, onde as amostras foram preparadas e congeladas (-20°C) até o momento das análises.

Extração de DNA das estirpes bacterianas em culturas puras

Os DNAs genômicos foram extraídos de todas as estirpes bacterianas (apresentadas na Tabela 1) usando-se o protocolo descrito por Seldin e Dubnau (1985). O DNA da comunidade microbiana total foi extraído diretamente a partir das amostras de rizosfera (0,5 g de cada amostra), utilizando-se o *kit Fast DNA Spin Kit (for soil)* (BIO 101 Systems, CA, E.U.A.). As preparações de DNA foram visualizadas após eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão 1X TBE (SAMBROOK et al., 1989) e a concentração de DNA foi determinada em um aparelho GenQuant (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra).

Amplificação, clonagem e sequenciamento com os iniciadores PoIF e PoIR

Primeiramente, fragmentos do gene *nifH* (360 pb) das estirpes *P. brasilensis* 172^T e *P. borealis* KK19^T foram amplificados por PCR com os iniciadores PoIF (5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3') e PoIR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3'), utilizando-se as mesmas condições descritas por Poly et al. (2001).

As condições utilizadas para a amplificação dos DNAs genômicos de todas as estirpes bacterianas com o par de iniciadores desenhados neste estudo (*nifHPAENf* e *nifHPAENr*) foram: 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão a 94°C (1 min), 50°C (1 min) e 72°C (2 min), respectivamente, com uma extensão final de 5 min a 72°C. A mistura da reação (50 l) continha 1l de DNA molde (50 a 100 ng), 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 10 mM KCl, 0,5 µM de cada iniciador, 200 mM de cada dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, e 2 U de *Taq* polimerase (Promega, Wisconsin, E.U.A.). Os produtos da PCR foram purificados com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up* (Promega).

Alinhamento de sequências e desenho de iniciadores específicos para *Paenibacillus*

Onze sequências de gene *nifH* de *Paenibacillus* disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), duas sequências de *nifH* de *P. brasilensis* (EU294253) e *P. borealis* (EU294254) obtidos neste estudo, e sequências *nifH* de outros gêneros/espécies de bactérias diazotróficas foram alinhadas utilizando-se o programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997). Após o alinhamento, duas regiões foram encontradas manualmente e consideradas potencialmente úteis para o desenho de iniciadores específicos para as espécies de *Paenibacillus* diazotróficas (Tabela 2); uma com 18-mer (*forward*) - nifHPAENf: 5'TKATYCTGAACACGAAAG'3 e outra com 19-mer (*reverse*) - nifHPAENr: 5'CTCRGGATTGGCATTGCG'3, correspondentes às posições 291 e 563 de *Azotobacter vinelandii* (M20568), respectivamente. Estes iniciadores foram submetidos a uma busca por sequências homólogas no GenBank, através do programa BLAST-N (ALTSCHUL et al., 1990) e somente sequências de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio foram encontradas nos primeiros *hits*. Os iniciadores desenvolvidos foram testados com DNAs de bactérias e de solo rizosférico de sorgo.

Validação dos iniciadores nifHPAENf / nifHPAENr com bactérias em cultura pura

Para a confirmação da especificidade e validação dos iniciadores nifHPAENf / nifHPAENr, foram realizados testes com espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio e de outros gêneros bacterianos (Tabela 1). As amostras de DNAs obtidas a partir destes microrganismos foram utilizadas na reação de PCR com os referidos iniciadores, de acordo com as condições descritas acima.

Validação dos iniciadores nifHPAENf / nifHPAENr com DNAs de solo

Para testar os iniciadores com DNA de solo, foram extraídos DNAs de amostras de solo rizosférico de plantas de sorgo, sob alto e baixo nitrogênio. Neste caso, as amplificações foram realizadas através de um sistema de *nested* PCR, que consistiu numa primeira amplificação com os iniciadores PolF e PolR descritos por Poly et al. (2001) referidos anteriormente. Em seguida, 1 µl desta primeira reação foi utilizado como molde para uma segunda reação com os iniciadores nifHPAENf e nifHPAENr. Foram utilizados controles negativos (sem DNA) para todas as reações de PCR e, após a reação de PCR, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, corados e visualizados para confirmação do tamanho do produto (280 pb).

Clonagem, sequenciamento e análise dos produtos amplificados a partir do DNA rizosférico

Fragmentos do gene *nifH* obtidos de *P. brasilensis* 172^T e *P. borealis* KK19^T e dos DNAs extraídos das amostras de solo rizosférico foram clonados usando a *CloneJET™ Cloning Kit* (Fermentas, Maryland, E.U.A.), de acordo com as instruções do fornecedor. Após a transformação de células de *Escherichia coli* JM109 competentes, os clones foram escolhidos randomicamente e a presença de insertos do tamanho correto foi verificada via PCR, utilizando-se os iniciadores pJET1.2f fornecidos pelo fabricante. Os clones selecionados foram sequenciados utilizando os mesmos iniciadores em um sequenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems Inc., CA, E.U.A.).

A comparação das sequências do gene *nifH* foi efetuada considerando-se o valor de 95% de similaridade. Com base no alinhamento de sequências múltiplas, usando o Clustal X, foi construída uma matriz de distância através dos programas PHYLIP versão 3,6 (FELSENSTEIN, 1989). As estimativas de curvas de rarefação, definição de unidades taxonômicas operacionais (OTUs), índice de diversidade Shannon-Weaver e de

riqueza Chao1 foram efetuadas usando o programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005).

Resultados e discussão

Para o desenvolvimento de iniciadores específicos para as espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio, primeiramente foi feita uma busca no banco de dados NCBI de todas as sequências do gene *nifH* de organismos deste gênero. Como algumas espécies fixadoras não possuíam ainda sua sequência do gene *nifH* depositada no banco de dados, o DNA destas estirpes foi extraído, amplificado com iniciadores universais para o gene *nifH* (POLY et al., 2001) e sequenciado. Este foi o caso das espécies *P. brasilensis* e *P. borealis*, que tiveram suas sequências depositadas no GenBank a partir deste estudo, com os números de acesso EU294253 e EU294254, respectivamente. Após a obtenção das sequências do gene *nifH* das estirpes-tipo de 11 espécies *Paenibacillus*, foi feita uma busca por sequências de outras bactérias fixadoras de nitrogênio pertencentes a 13 grupos taxonômicos frequentemente descritos na literatura. Todas as sequências obtidas foram, então, alinhadas e, em seguida, foi feita uma busca por uma região específica que fosse encontrada apenas nas espécies de *Paenibacillus* e não nos outros organismos analisados. Duas regiões foram, então, escolhidas como base para os iniciadores *forward* (nifHPAENf) e *reverse* (nifHPAENr), específicos para as espécies do gênero *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio. Dentre as sequências de *Paenibacillus* analisadas, foram encontradas algumas divergências entre as bases da região selecionada e, por isso, foram incluídas algumas bases degeneradas nos iniciadores (dados não mostrados). Foram observadas algumas diferenças entre os iniciadores e as sequências de *Paenibacillus*. Entretanto, a especificidade dos iniciadores não foi afetada, já que quando estes foram submetidos a uma análise com a ferramenta BLAST-N em busca de sequências homólogas, somente sequências de *Paenibacillus*

fixadores de nitrogênio foram encontradas nos primeiros *hits* (dados não mostrados).

A confirmação da especificidade dos iniciadores nifHPAENf / nifHPAENr em culturas puras foi realizada amplificando-se amostras de DNA de cultura pura obtidas de 10 espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio, 3 espécies fixadoras de nitrogênio pertencentes a outros gêneros bacterianos^(b) Tabela 1) e 2 espécies não fixadoras de nitrogênio^(a) Tabela 1). Após a amplificação com os novos iniciadores, um produto de aproximadamente 280 pb, conforme o esperado, foi observado nas 10 espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio, enquanto que nas 3 espécies fixadoras de outros gêneros e nas 2 não fixadoras este produto não foi detectado (Tabela 1; Figura 1).

Tabela 2. Alinhamento de sequências de regiões *nifH* entre diferentes *Paenibacillus* diazotróficos e outras espécies de bactérias, mostrando regiões-alvo para o desenho de iniciadores específicos. Apenas os oligonucleotídeos diferente das seqüências dadas são indicados. K = T / G; Y = C / T e R = A / G; - representa uma lacuna. Números entre parênteses correspondem às posições das bases na seqüência de genes *NifH* de *Azotobacter vinelandii* (M20568)

Espécies bacterianas (número de acessos)	Iniciador nifHPAENf: Alvo 5' fl 3' (291-308) TKA TYC TGA ACA CGA AAG	Iniciador nifHPAENr: Alvo 5' fl 3' (563-581) CTC RCG GAT TGG CAT TGC G
<i>Paenibacillus macerans</i> ATCC8244 (AJ224427) C. ... G. .
<i>P. graminis</i> RSA19 (AJ223994) C. ...
<i>P. odorifer</i> TOD45 (AJ223992)C. C. ...
<i>P. borealis</i> KK19 (EU294254)ATT. ...	T. ...
<i>P. brasiliensis</i> PB172 (EU294253)T. C. ... C. ... G. .
<i>P. durus</i> 2RC1 (AJ224419)
<i>P. polymyxa</i> ATCC842 (AJ223997)T.
<i>P. wynnii</i> LMG 22176 (AJ867247)C. A. C. ... G. .
<i>P. peoriae</i> ISSDS-754 (EF620504)T.G.	... C. ... C. ... G. .
<i>P. sabiniae</i> DSM 17841 (DQ349125)C. ...	T. ... C. ... G.T .
<i>P. zanthoxyli</i> DSM 18202 (DQ364788)	T. ... G. ... G. .
<i>P. forsythiae</i> T98 (DQ349124)	T. ... C. ... G. .
<i>P. massiliensis</i> T7 (AY373370)A. .G.	T. ... C. ... G. .
<i>Clostridium pasteurianum</i> (X07473)	.AT .GT .AG GAG GAC TT.	T. T.T A
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (X13303)C ..G .C. .G.	T. ... C. ... G. .
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (V01215)	.C.G .A. .G.	T. ... A. A. ... C. A
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (Z54207)C ..G .C. .G.	T. ... A. C. ... G. .
<i>Azotobacter vinelandii</i> (M20568)CC ..T GC. .G. C. ... G. .
<i>Azospirillum brasilense</i> (M64344)C ..G .C. .G. G. ... G. .
<i>Heliobacterium gestii</i> (AB112406)C ..T .C. .G.	T. ... C. ... C. .

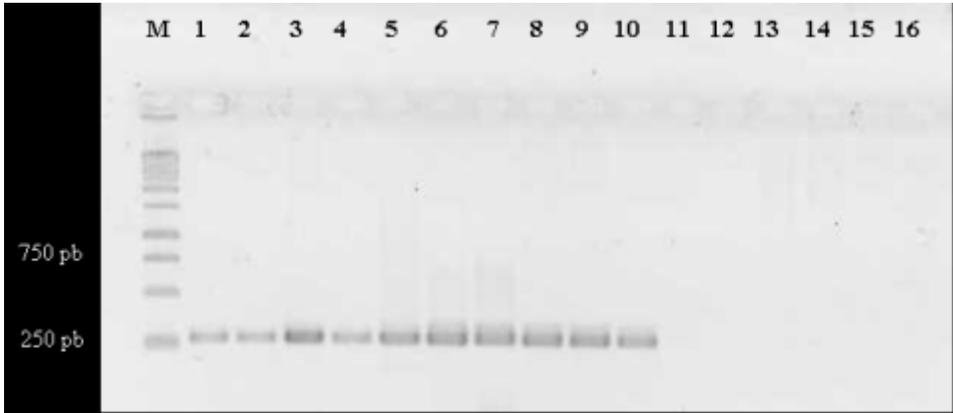


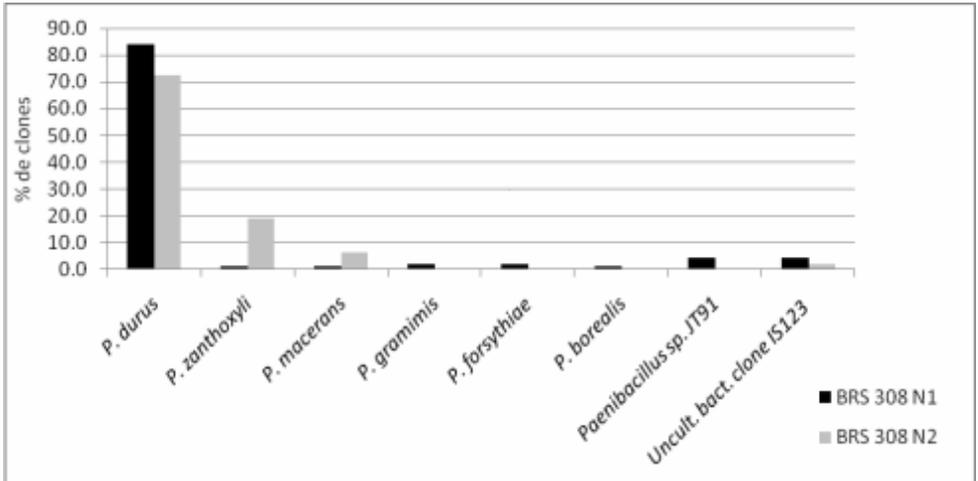
Figure 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com os iniciadores nifHPAENf / nifHPAENr. 1 - *P. polymyxa* (LMD 24.16T), 2 - *P. macerans* (LMD 24.10T), 3 - *P. peoriae* (HSCC 353T), 4 - *P. durus* (P3L5T), 5 - *P. graminis* (RSA19T), 6 - *P. odorifer* (TOD45T), 7 - *P. borealis* (KK19T), 8 - *P. brasilensis* (PB172T), 9 - *P. sabiniae* (DSM7841T), 10 - *P. zanthoxyli* (DSM 18202T), 11 - *P. campinasensis* (KCTC 0364BPT), 12 - *Bacillus licheniformis* (T6-3), 13 - *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5), 14 - *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), 15 - *Azospirillum brasilense* (Sp7), 16 - Controle negativo. M, marcador de peso molecular (1 Kb ladder)

Ao contrário do observado quando a especificidade dos iniciadores nifHPAENf e nifHPAENr foi testada para amplificação de sequências do gene *nifH* a partir de DNA genômico de culturas puras, o rendimento do produto da PCR foi baixo com o DNA extraído do solo. Para aumentar a sensibilidade do método, foi utilizado um protocolo de *nested* PCR, onde os iniciadores PoIF e PoIR (POLY et al., 2001) foram utilizados como iniciadores externos e os iniciadores nifHPAENf e nifHPAENr foram usados como iniciadores internos. Este protocolo de *nested* PCR resultou na amplificação eficiente de todas as estirpes fixadoras de nitrogênio de *Paenibacillus* testadas, gerando produtos de PCR de tamanho esperado (dados não mostrados). Foram, então, realizados experimentos para amplificar diretamente os genes *nifH* de populações de *Paenibacillus*

fixadoras de nitrogênio em amostras de solo da rizosfera de sorgo. Foram alcançados resultados positivos quando foram utilizadas amostras de DNA obtidas da rizosfera da cultivar de sorgo BRS 308, cultivada em solos de Cerrado, na presença de 12 e 120 kg ha⁻¹ de nitrogênio. Todos os produtos de PCR foram do tamanho esperado (280 pb).

Para a validação dos novos iniciadores específicos para *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio com base no gene *nifH* em amostras ambientais, foram construídas bibliotecas de sequências deste gene a partir de amostras de DNA de solo de rizosfera de sorgo. Foram, então, obtidos produtos de PCR com os iniciadores nifHPAENf e nifHPAENr a partir destas amostras de DNA. Estes produtos foram clonados, dando origem a duas bibliotecas, uma de rizosfera com baixo teor de nitrogênio BRS 308N1 (93 clones) e outra com alto teor de nitrogênio BRS 308N2 (94 clones). Os 187 clones foram sequenciados, analisados e identificados com a ferramenta BLAST-N. Os resultados mostraram que todas as sequências obtidas das duas amostras eram relacionadas com o gene *nifH* de *Paenibacillus*, demonstrando a grande especificidade do sistema. Considerando-se apenas o primeiro *hit* do BLAST-N, os clones obtidos da rizosfera com baixo teor de nitrogênio (N1) foram relacionados às espécies *P. durus* (83,9%), *P. zanthoxyli* (1,1%), *P. macerans* (1,1%), *P. graminis* (2,2%), *P. forsythiae* (2,2%), *P. borealis* (1,1%), *Paenibacillus* sp. JT91 (4,3%) e a um clone de bactéria não cultivada IS123 (4,3%), apresentando níveis de similaridade variando entre 86 e 99%. Já os clones da biblioteca construída a partir da rizosfera com alto teor de nitrogênio (N2) foram relacionados às espécies *P. durus* (72,3%), *P. zanthoxyli* (19,1%), *P. maceras* (6,4%) e a um clone de bactéria não cultivada IS123 (2,1%) com valores de similaridade variando entre 86 e 98% (Figura 2). Em ambas as bibliotecas, foi possível verificar a dominância de sequências relacionadas à espécie *P. durus*. No entanto, sequências desta espécie são as únicas que apresentam 100% de homologia com os iniciadores testados (Tabela 2) e, conseqüentemente, as diferenças detectadas podem refletir também diferenças relativas à eficiência dos iniciadores.

Figure 2. Histograma mostrando os clones obtidos a partir de amostras de solo rizosférico da cultivar de sorgo BRS 308 cultivado em baixo N, N1 (93 clones) e alto N, N2 (94 clones). A identificação dos clones foi realizada através da análise de BLAST-N



Para determinar se a amostragem de clones obtidos em cada biblioteca era representativa, a diversidade do gene *nifH* foi avaliada por diferentes métodos. De acordo com as curvas de rarefação (dados não mostrados), o número de clones da biblioteca BRS 308 N1 foi suficiente para revelar o número total de tipos de sequência dentro da biblioteca. No entanto, para a amostra de BRS 308 N2, a curva de rarefação não alcançou um platô, demonstrando que, neste caso, o número de clones na biblioteca *nifH* foi insuficiente para revelar o número total de tipos de sequência dentro desta biblioteca. Estas observações sugerem que a diversidade taxonômica foi maior nas amostras coletadas em alto N do que nas amostras em baixo N. As estimativas de riqueza Chao1 foram comparadas para cada comunidade (Tabela 3). A riqueza foi maior na biblioteca obtida a partir de amostras da rizosfera das plantas em alto N (109) do que em baixo N (35). Ao comparar estes resultados, um número maior de OTUs foi detectado dentro da biblioteca da BRS 308 N2 do que da BRS 308 N1. O índice de diversidade de Shannon-Weaver indicou também uma maior diversidade de bactérias na biblioteca da BRS 308 N2 ($H' = 2,96$) do que na BRS 308 N1 ($H' = 1,88$).

Tabela 3. Análise estatística das bibliotecas de clones

Cultivar/nível de N ^a	Número de clones	Número de OTUs	Shannon-Weaver ^b	Índice de Chao1 ^c
BRS 308 N1	93	14	1.88	35 (19.12-100.12)
BRS 308 N2	94	60	2.96	109 (81.91-171.38)

^a N1 = baixo N (12 kg ha⁻¹), N2 = alto N (120 kg ha⁻¹);

^b Índice de Shannon-Weaver calculado através do programa DOTUR;

^c valores mínimos e máximos (95%).

Em outros trabalhos, diferentes genes, tais como 16S rRNA, *rpoB* e *gyrB*, têm sido usados em análises de diversidade genética entre estirpes de *Paenibacillus* isoladas de solo e rizosfera de plantas. Entre as espécies fixadoras de nitrogênio, *P. durus* tem sido a mais bem estudada. Um conjunto de iniciadores específicos baseados no gene *nifH* (NHA1 e NHA2) já foi descrito, bem como a presença de cópias múltiplas de genes *nifH* no genoma de *P. durus* (CHOO et al., 2003; ROSADO et al., 1998). Além disso, Teixeira et al. (2008) analisaram a expressão de genes estruturais da nitrogenase de *P. durus*, sob diferentes condições de crescimento. No entanto, não havia método molecular disponível para se avaliar a diversidade das espécies de *Paenibacillus* diazotróficos em amostras ambientais. Nesse contexto, foi desenvolvida uma técnica baseada em PCR utilizando iniciadores específicos para o gene *nifH* de *Paenibacillus*

A especificidade dos iniciadores nifHPAENf e nifHPAENr foi confirmada através de testes com diferentes estirpes de bactérias (culturas puras) e com diferentes graus de similaridade às espécies de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio (Tabela 1, Figura 1). Quatro espécies de *Paenibacillus* (*P. forsythiae*, *P. donghaensis*, *P. wynnii* e *P. massiliensis*) não foram testadas em culturas puras, mas sequências nucleotídicas homólogas foram encontradas no banco de dados GenBank, sugerindo que os iniciadores poderiam ser usados para detectar estas espécies. Além disso, a especificidade destes oligonucleotídeos foi confirmada também em amostras de solo pela análise de sequências de clones escolhidos aleatoriamente, obtidos da rizosfera de plantas de sorgo, na presença de dois níveis de N (Figura 2). Neste caso, uma reação de *nested* PCR foi necessária para aumentar a sensibilidade do método de detecção. Diferentes estudos demonstram que o uso deste tipo de protocolo é necessário para a detecção de comunidades bacterianas encontradas em baixa densidade (ROESCH et al., 2006; WARTIAINEN et al., 2008). Todos os 187 clones sequenciados foram identificados como clones afiliados ao gênero *Paenibacillus*, e a espécie *P. durus* foi prevalente em ambas as bibliotecas. Um número mais elevado de clones

afiliados a *P. zanthoxyli* e *P. macerans* foi encontrado na biblioteca obtida das amostras sob alto N. Em um estudo anterior, utilizando os iniciadores para o gene *nifH* descritos por Poly et al. (2001), Coelho et al. (2008) também encontraram clones afiliados a *P. durus* em bibliotecas obtidas a partir de amostras de solo rizosférico de cultivar de sorgo ineficiente no uso de N (IS5322-C), plantado com baixo teor deste nutriente Além disso, os clones relacionados com *P. macerans* estavam presentes em quatro bibliotecas, de duas cultivares de sorgo (IPA1011 e IS5322-C), em alto e baixo N, construídas por Coelho et al. (2007), utilizando iniciadores *rpoB*.

Quando as sequências obtidas dos clones foram avaliadas, notou-se uma variação intraespecífica nas sequências, como anteriormente demonstrado para *P. durus* (CHOO et al., 2003; ROSADO et al., 1998). Estas variações podem refletir sobre o número de OTUS e sobre a riqueza das sequências observadas na biblioteca obtida a partir da rizosfera de plantas sob alto N (BRS 308N2, Tabela 3). Resultados similares foram observados (índices de diversidade mais elevados) por Coelho et al. (2007), quando as bibliotecas de clones *nifH* obtidos de duas outras cultivares de sorgo (IPA 1011 e IS 5322-C), sob alto N, foram comparadas com as de baixo N. Estes resultados corroboram a eficiência dos iniciadores específicos para *Paenibacillus* baseados em genes *nifH*, desenhados neste estudo, em acessar a diversidade da comunidade fixadora de nitrogênio deste gênero de bactérias em amostras ambientais.

Conclusões

Todas as amostras de DNA de estirpes de *Paenibacillus* diazotróficos testadas e de DNA de solo rizosférico foram amplificadas quando os iniciadores nifHPAENf e nifHPAENr foram utilizados, gerando um fragmento de 280 pb.

O sequenciamento e a análise de clones do gene *nifH* de *Paenibacillus*, obtidos a partir da amplificação com os iniciadores nifHPAENf e nifHPAENr, revelaram uma dominância da espécie *P. durus* e uma maior diversidade de sequências nas amostras de solo rizosférico de plantas de sorgo com alto suprimento de nitrogênio.

Comparado aos demais sistemas disponíveis, o método de detecção por PCR proposto é mais adequado para avaliar a presença de bactérias diazotróficas do gênero *Paenibacillus* no ambiente e pode ser usado no futuro para determinar o papel ecológico desse grupo de microrganismos para o suprimento de nitrogênio às plantas.

Referências

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403-410, 1990.

BERGE, O.; GUINEBRETIERE, M. H.; ACHOUAK, W.; NORMAND, P.; HEULIN, T. *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 52, p. 607-616, 2002.

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 80, p. 199-209, 2008.

BRIGLIA, M.; EGGEN, R. I. L.; DE VOS, W. M.; VAN ELSAS, J. D. Rapid and sensitive method for the detection of *Mycobacterium chlorophenolicum* PCP-1 in soil based on 16S rRNA genotargeted PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 1478-1480, 1996.

CHOO, Q.-C.; SAMIAN, M.-R.; NAJIMUDIN, N. Phylogeny and characterization of three *nifH*-homologous genes from *Paenibacillus azotofixans*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 3658-3662, 2003.

COELHO, M. R. R.; DE VOS, M.; CARNEIRO, N. P.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, E.; SELDIN, L. Diversity of *nifH* gene pools in the rhizosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 279, p. 15-22, 2008.

COELHO, M. R. R.; MOTA, F. F.; CARNEIRO, N. P.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, E.; ROSADO, A. S.; SELDIN, L. Diversity of *Paenibacillus* spp. in the rhizosphere of four sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars sown with two contrasting levels of nitrogen fertilizer accessed by *rpoB*-based PCR-DGGE and sequencing analysis. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 753-760, 2007.

DESLIPPE, J.; EGGER, K. Molecular diversity of *nifH* genes from bacteria associated with high arctic dwarf shrubs. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, p. 516-525, 2006.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews**, London, v. 2, p. 621-631, 2004.

ELO, S.; SUOMINEN, I.; KÄMPFER, P.; JUHANOJA, J.; SALKINOJA-SALONEN, M.; HAAHTELA, K. *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 51, p. 535-545, 2001.

FELSENSTEIN, J. PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2). **Cladistics**, Westport, v. 5, p. 164-166, 1989.

GARBEVA, P.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN VUURDE, J. W. L.; VAN ELSAS, J. D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by planting and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, p. 369-383, 2001.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. **Microbial Ecology**, New York, v. 45, p. 302-316, 2003.

JOERGER, R. D.; WOLFINGER, E. D.; BISHOP, P. E. The gene encoding dinitrogenase reductase 2 is required for expression of the second alternative nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 4440-4446, 1991.

MA, Y.; XIA, Z.; LIU, X.; CHEN, S. *Paenibacillus sabinae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere soils of shrubs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 57, p. 6-11, 2007a.

MA, Y.; ZHANG, J.; CHEN, S. *Paenibacillus zanthoxyli* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Zanthoxylum simulans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 57, p. 873-877, 2007b.

MONTEFUSCO, A.; NAKAMURA, L. K.; LABEDA, D. P. *Bacillus peoriae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 43, p. 388-390, 1993.

MOTA, F. F.; NÓBREGA, A.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, E.; SELDIN, L. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of four maize genotypes plantes in Cerrado soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 20, p. 119-132, 2002.

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, Paris, v. 152, p. 95-103, 2001.

REJESUS, R. M.; HORNBAKER, R. H. Economic and environmental evaluation of alternative pollution-reducing nitrogen management practices in central Illinois. **Agriculture Ecosystems and Environment**,

Amsterdam, v. 75, p. 41-53, 1999.

ROESCH, L. F. W.; OLIVARES, F. L.; PASSAGLIA, L. M. P.; SELBACH, P. A.; SA, E. L. S. de; CAMARGO, F. A. O. de. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen supply. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, p. 967-974, 2006.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 4, p. 2770-2779, 1998.

SAIKI, R. K.; GELFAUD, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, p. 487-494, 1988.

SALLES, J. F.; SOUZA, F. A. de; VAN ELSAS, J. D. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1595-1603, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.

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

SELDIN, L.; DUBNAU, D. DNA homology among *Bacillus polymyxa*, *Bacillus macerans*, *Bacillus azotofixans* and other nitrogen fixing *Bacillus* strains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 35, p. 151-154, 1985.

SELDIN, L.; ROSADO, A. S.; CRUZ, D. W.; NÓBREGA, A.; VAN ELSAS, J. D.; PAIVA, E. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 3860-3868, 1998.

SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D.; PENIDO, E. G. C. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and grass roots. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 34, p. 451-456, 1984.

SELDIN, L., VAN ELSAS, J. D.; PENIDO, E. G. C. *Bacillus* nitrogen fixers from Brazilian soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 70, p. 243-255, 1983.

SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C. P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Haren, v. 29, p. 191-196, 1999.

SILVA, K. R. A.; SALLES, J. F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Assessment of the diversity of *Paenibacillus* spp. in the rhizosphere of different maize cultivars in two soils by *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE and sequence analysis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 54, p. 213-231, 2003.

SMALLA, K.; CRESWELL, L. C.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; WOLTERS, A.; VAN ELSAS, J. D. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 74, p. 78-85, 1993.

TAN, Z.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in root of rice. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 1009-1015, 2003.

TEIXEIRA, R. L. F.; VON DER WEID, I.; SELDIN, L.; ROSADO, A. S. Differential expression of *nifH* and *anfH* genes in *Paenibacillus durus* analysed by reverse transcriptase-PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 46, p. 344-349, 2008.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, London, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

VAN ELSAS, J. D.; JANSSON, J. K.; TREVORS J. T. **Modern soil microbiology**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.

VON DER WEID, I.; DUARTE, G. F.; VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L. *Paenibacillus brasiliensis* sp. nov., a new nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 52, p. 2147-2153, 2002.

WARTIAINEN, I.; ERIKSSON, T.; ZHENG, W.; RASMUSSEN, U. Variation in the active diazotrophic community in rice paddy – *nifH* PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 39, p. 65-75, 2008.

WAUGH, S. I.; PAULSEN, D. M.; MYLONA, P. V.; MAYNARD, R. H.; PREMAKUMAR, R.; BISHOP, P. E. The genes encoding the delta subunits of dinitrogenases 2 and 3 are required for Mo-independent diazotrophic growth by *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.

177, p. 1505-1510, 1995.

YOON, J.-H.; YIM, D. K.; LEE, J.-S.; SHIN, K.-S.; SATO, H. H.; LEE, S. T.; PARK, Y. K.; PARK, Y.-H. *Paenibacillus campinasensis* sp. nov., a cyclodextrin-producing bacterium isolated in Brazil. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 833-837, 1998.

YOUNG, J. P. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVENS, H. J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 43-87.