



Revista Brasileira de Ciência do Solo

ISSN: 0100-0683

revista@sbccs.org.br

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo

Brasil

Wurdig Roesch, Luiz Fernando; Pereira Passaglia, Luciane Maria; Menezes Bento, Fátima; Triplett,
Eric W.; Oliveira Camargo, Flávio Anastácio

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A PLANTAS DE
MILHO

Revista Brasileira de Ciência do Solo, vol. 31, núm. 6, 2007, pp. 1367-1380

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo

Viçosa, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180214061015>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A PLANTAS DE MILHO⁽¹⁾

**Luiz Fernando Wurdig Roesch⁽²⁾, Luciane Maria Pereira
Passaglia⁽³⁾, Fátima Menezes Bento⁽⁴⁾, Eric W. Triplett⁽⁵⁾ & Flávio
Anastácio Oliveira Camargo⁽⁶⁾**

RESUMO

Bactérias diazotróficas endofíticas são capazes de promover o crescimento do milho por meio da fixação biológica do nitrogênio (FBN) ou pela produção de fitormônios. Neste estudo, objetivou-se caracterizar a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho em diferentes locais do Rio Grande do Sul, que apresentavam variações de clima e solo. Para isso, foi usado um método baseado na amplificação do gene *nifH*grupo I, na análise de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) e no seqüenciamento dos genes amplificados. Foram calculados os índices de Shannon-Weaver e Equitabilidade para estimar a diversidade dos diazotróficos, bem como a diversidade de nucleotídeos e divergência entre seqüências, para estimar a diversidade genética das comunidades amostradas. Na avaliação da diferenciação entre as comunidades foi utilizado o teste F_{ST} . Foi detectada maior variação entre as comunidades das diferentes regiões do Estado do que dentro das comunidades de cada região avaliada, particularmente entre comunidades provenientes de diferentes tipos de solo, regime pluviométrico e regiões geográficas. O índice de diversidade de Shannon-Weaver indicou diferenças em termos de diversidade de unidades taxonômicas entre as comunidades avaliadas. As comunidades amostradas da região norte do Rio Grande do Sul, que mostrou maior disponibilidade de água e conteúdo de argila, tenderam a apresentar maior diversidade quando comparada às comunidades amostradas na região sul. A análise de Equitabilidade mostrou a

⁽¹⁾ Recebido para publicação em janeiro de 2007 e aprovado em julho de 2007.

⁽²⁾ Pesquisador Sênior do Departamento de Microbiologia e Ciência Celular da Universidade da Flórida. 1052 Mu Gainesville, Florida 32611-0700, USA. E-mail: roesch@ufl.edu

⁽³⁾ Professora do Departamento de Genética, UFRGS. Bolsista do CNPq. E-mail: lp Passaglia@terra.com.br

⁽⁴⁾ Professor do Departamento de Microbiologia, UEPGS. Bolsista do CNPq. E-mail: fatimabento@uepg.br

dominância de unidades taxonômicas dentro de cada comunidade avaliada, independentemente da região amostrada. Todas as seqüências obtidas foram classificadas como pertencentes ao gene *nifH*grupo I. Foram obtidas seqüências pertencentes às classes Alfa, Beta e Gama-proteobactéria. Esse resultado demonstraram que existe grande diversidade de bactérias endofíticas fixadoras de N capazes de colonizar o interior de plantas de milho e que as diferentes condições edafoclimáticas estão correlacionadas com a diversidade dos genes *nifH*.

Termos de indexação: gene *nifH*, PCR-RFLP, seqüenciamento, comunidade endofítica.

SUMMARY: DIVERSITY OF DIAZOTROPHIC ENDOPHYTIC BACTERIA ASSOCIATED WITH MAIZE PLANTS

Endophytic diazotrophic bacteria are capable of promoting maize growth through biological nitrogen fixation (BNF) or by the production of plant hormones. The aim of this study was to characterize diversity of endophytic bacteria in maize at sites with different climate and soil conditions in Rio Grande do Sul, Brazil. A PCR-RFLP approach and sequence analysis of nifH Cluster I clone libraries were used to assess diversity in maize plants. The Shannon-Weaver and Equitability indices were calculated to estimate the diazotroph diversity as well as the nucleotide diversity and the average sequence divergence to estimate genetic diversity. To evaluate the variability in populations we performed the F_{ST} test. A greater variation in bacterial communities was detected between rather than within regions, particularly among communities of different soil types and varying water regimes and geographical regions. The Shannon-Weaver index indicated a high difference in terms of diversity of taxonomic units among the communities. The diversity of the communities in the northern region, with higher precipitation and clay content, tended to be higher than that in the south. The Equitability index indicated that there was a dominant taxonomic unit within each community. All clones grouped into nifH gene cluster I. The nifH sequence types from Alpha, Beta and Gammaproteobacteria were recovered. These results demonstrate that there is a large diversity of endophytic nitrogen-fixing bacteria able to colonize maize tissue and that nifH diversity is correlated with the different environmental conditions.

Index terms: nifH gene, PCR-RFLP, sequencing, endophytic community.

INTRODUÇÃO

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

Bactérias diazotróficas endofíticas podem estimular o crescimento das plantas e aumentar a resistência a doenças, além de promoverem a fixação biológica do N (Reis et al., 2000; Bashan et al., 2004; Sala et al., 2005). Além disso, diazotróficos endofíticos podem apresentar vantagens em relação aos associados à

colonizam nichos específicos no interior das plantas que apresentam reduzida tensão de oxigênio, para expressão da nitrogenase (James & Triplett, 1997). As plantas são consideradas um microecossistema composto por diferentes comunidades que podem ser colonizadas simultaneamente pelas bactérias endofíticas (Coutinho & Triplett, 2001; Lodewyckx et al., 2001). A diversidade pode representar uma grande fonte de biodiversidade, que hoje em dia é largamente inexplorada.

Recentemente, bactérias diazotróficas endofíticas têm sido isoladas de várias espécies de gramíneas (Sala et al., 2000; Riggs et al., 2001) e grande diversidade de diazotróficos tem sido encontrada colonizando plantas de milho (Chelius & Triplett, 2001). No entanto, a maioria desses estudos de diversidade é baseado nas técnicas de cultivo e subsequente caracterização das bactérias isoladas. Entretanto, o cultivo de microrganismos

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A PLANTAS...

Sabendo que bactérias diazotróficas são candidatas potenciais ao aumento da produção, há grande interesse em caracterizar a diversidade desses microrganismos, para que seu potencial seja mais bem explorado. Neste estudo, objetivou-se caracterizar a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho cultivadas em diferentes regiões geográficas do Rio Grande do Sul. Para avaliar a diversidade de bactérias fixadoras de N em diferentes ecossistemas, oligonucleotídeos iniciadores universais foram utilizados para amplificar o gene *nifH*, por meio de técnicas independentes de cultivo (Poly et al., 2001; Bashan et al., 2004). Essas técnicas possibilitam a obtenção de caracterização mais completa da comunidade de diazotróficos do que técnicas dependentes de cultivo. Neste estudo foi testada a hipótese de que a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas varia em função do ambiente.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e preparação das amostras

Foram coletados colmos de plantas de milho cultivadas em lavouras sob sistema de semeadura direta em cinco regiões do Rio Grande do Sul que apresentavam diferenças em relação ao tipo de solo e clima (Figura 1, Quadro 1). As amostras foram coletadas no período de 25 a 28 de fevereiro de 2003, que corresponde ao final do ciclo de crescimento do milho no Rio Grande do Sul. Foram amostradas duas

regiões localizadas ao norte do Rio Grande (regiões II e III), duas regiões localizadas ao sul (IV e V) e uma região localizada no centro (Central - região I). Em cada região, foram coletadas amostras de sete lavouras, e de cada lavoura foram escolhidas aleatoriamente, três plantas inteiras, totalizando 21 amostras. Frações de aproximadamente 1 g da base do colmo das plantas foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados, com gelo, e posteriormente congeladas a -4 °C, até o momento da análise molecular.

Em cada local amostrado também foram coletadas amostras de solo, para análise das características químicas e físicas. De cada um dos 30 locais de amostragem foram coletadas seis amostras simples de solo que foram misturadas para formar uma única amostra representativa do local, pesando aproximadamente 0,5 kg. As amostras de solo foram secas em forno a 60 °C, moídas e peneiradas em peneira de 2 mm. Foram quantificados os conteúdos totais de matéria orgânica, pelo método Walkley-Black (Tedesco et al., 1995); percentagem de argila, pelo método de decantação em solução aquosa (Tedesco et al., 1995); e pH em água.

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

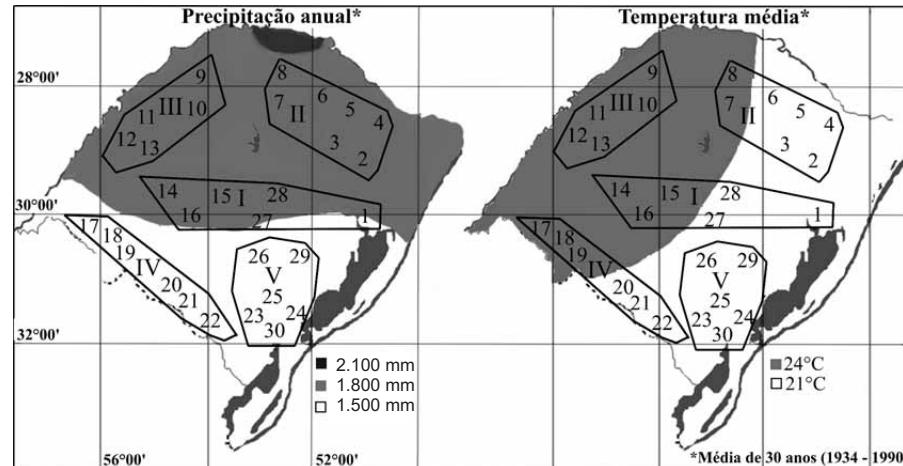


Figura 1. Mapa do Rio Grande do Sul, mostrando as diferenças climáticas e as cinco regiões de amostragem (I a V). As lavouras estão rotuladas com números romanos (I a XXVII). As médias de precipitação anual e temperatura média são indicadas em cada região. As amostras foram coletadas de plantas de milho utilizando o método de amostragem direta.

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

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

Extração do DNA microbiano

Os colmos de milho foram lavados em água destilada e 10 g de cada amostra foram submetidos ao processo de desinfestação superficial. Para isso, as amostras foram imersas completamente em uma solução de etanol 70 %, por cinco minutos. Após essa etapa, os colmos foram novamente lavados em água destilada e esterilizada para remoção da solução de etanol.

HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) + 0,5 M NaCl, suficiente para cobrir a amostra. Os frascos foram submetidos a agitação (150 RPM) por um período de 1 h a 4 °C, para evitar o crescimento bacteriano. No final do período de incubação, o líquido foi filtrado e centrifugado por 10 min a 10.000 g. O péllete, composto principalmente por bactérias, foi homogeneizado com solução de TE, e o DNA da suspensão de células foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Schrank et al. (1999).

Amplificação do gene *nifH*

Os fragmentos do gene *nifH* foram amplificados usados *nested PCR* (Widmer et al., 1999). Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores. O primeiro par, desenhado por Zehr & McReynolds (1989), foi construído para amplificação de 359 pares de bases (pb) do gene *nifH*. Esse par foi escolhido por amplificar uma região do gene *nifH* altamente conservada na maioria dos procariontes fixadores de N₂. O segundo par de oligonucleotídeos iniciadores foi *nifH*For (5'-ACCCGCCTGATCCTGCACGCCAAGG-3') e *nifH*Rev (5'-ACGATGTAGATTTCTGGGCCTGT-3'), definido por Soares et al. (2006) para amplificar diversos fragmentos de seqüências do gene *nifH*, previamente denominado de *nifH* grupo I composto por microrganismos pertencentes aos filos Proteobactéria, Cianobactéria e Firmicutes (Zehr et al., 2003), com cerca de 314 ou 317 pb, dependendo da espécie bacteriana, quando uma alíquota de DNA obtida na primeira reação de amplificação é usada como molde. A reação de PCR foi feita utilizando uma mistura para PCR (PCR Master Mix - Promega, Madison, Wis.). Na primeira reação de amplificação foram utilizados 25 µL da mistura de reação, 100 ng de DNA purificado e 2,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador a uma concentração de 10 µM. A segunda reação foi feita em 50 µL da mistura de reação, contendo 1 µL do produto da primeira PCR como molde. Após a desnaturação inicial, que consistiu em 5 min a 94 °C, foram aplicados 30 ciclos, em ambas as reações, conforme o seguinte: desnaturação a 94 °C por 45 seg, anelamento a 55 °C por 45 seg e extensão a 72 °C por 45 seg. Para a extensão final, a mistura de reação contendo o DNA molde foi submetida a 72 °C por 5 min. No final da amplificação, as amostras foram resfriadas e mantidas a 4 °C. A quantidade e a qualidade dos produtos amplificados foram analisadas em gel de agarose ultrapura a 1,5 % (Invitrogen, Carlsbad, California). A especificidade das bandas de DNA amplificadas foi testada por meio de hibridização dos produtos da PCR, com uma sonda do gene *nifH* de *Azospirillum brasiliense* previamente amplificado e seqüenciado, usando o sistema ECL para marcação e detecção direta de ácidos nucléicos (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey) (dados não apresentados). O produto da amplificação foi utilizado na análise do polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP), clonagem e seqüenciamento.

Análise do polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP)

Para as análises de restrição foram usados 10 µL do produto da PCR purificado (QIAquick - Qiagen, Valencia, Calif.), amplificado das amostras de colmo do milho. Foram utilizadas as enzimas de restrição *Xba*I e *Hae*III, que foram escolhidas porque os produtos

al., 2001). As digestões foram feitas por um período de 16 h, para que a completa fragmentação fosse atingida. Os produtos da digestão foram analisados em um gel de poliacrilamida e utilizados para construção de uma matriz baseada no acordo com a presença ou ausência dos fragmentos de restrição obtidos. Esta matriz foi utilizada para comparação entre os graus de similaridade entre as amostras, utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard para agrupamento pelo método UPGMA. Para obter uma visão das relações genéticas entre as comunidades bactéricas foi construído um dendrograma de similaridade baseado na análise de agrupamento.

Clonagem e seqüenciamento do gene *nifH*

Com base nos resultados obtidos pela análise de similaridade, foram selecionadas 10 comunidades bactéricas de colmo coletadas na região II (área da região V), entre as 30 analisadas, para a clonagem e seqüenciamento dos genes *nifH*. O uso do termo "clonagem" nesse sentido significa uma população de bactérias geneticamente idêntica derivada de uma única célula-mãe. Esse procedimento foi adotado para que fosse possível uma melhor descrição da diversidade dos microrganismos diazotróficos endofíticos de cada comunidade, bem como para determinar a identidade dos organismos capazes de fixar N₂ no interior das plantas de milho.

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

Análise de suficiência amostral, diversidade de espécies e filogenia

Após edição manual para eliminação das sequências de baixa qualidade, os fragmentos de seqüências potencialmente incorretas, assim como os fragmentos do gene *nifH* que não foram alinhados e agrupados em unidades taxonômicas (UTs). Seqüências que apresentaram 97 % de similaridade ou menor foram consideradas como pertencentes ao mesmo grupo taxonômico. O alinhamento foi realizado utilizando o programa para alinhamentos múltiplos Clustal X (Thompson et al., 1997). Com base no alinhamento, foi construída uma matriz de distâncias, utilizando o programa DNADist (Felsenstein, 1989), que

a construção de curvas de extinção e o cálculo do índice de diversidade de Shannon-Weaver ($H = \sum (P_i \ln [P_i])$, em que P_i é o número de indivíduos de uma dada espécie, dividido pelo número total de espécies observadas). O índice de Shannon-Weaver é um índice geral de diversidade sensível à riqueza e à abundância relativa de espécies (Atlas & Bartha, 1998). A relação entre as espécies detectadas foi avaliada pelo índice de Equitabilidade, calculado pela seguinte equação: $E = H / [\ln S]$, em que S é o número de espécies detectadas e H é o índice de Shannon-Weaver. A Equitabilidade indica se há o domínio de uma população na comunidade amostrada. Todos os programas utilizados foram aplicados usando as configurações-padrão.

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

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

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

Cálculo da diversidade genética

Para análise genética das populações amostradas foram feitos cálculos da diversidade genética das comunidades, diversidade de nucleotídeos, variação genética total dentro da comunidade $\theta(\pi)$ e variação genética total entre as comunidades (F_{ST}). A diversidade genética foi avaliada por meio da variação de nucleotídeos das seqüências obtidas conforme método proposto por Martin (2002), pela seguinte equação:

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

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

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

em que k é o número de seqüências distintas, p_i a freqüência de cada seqüência; p_j , a freqüência de cada seqüência da mesma espécie; e d_{ij} , o número de diferenças entre as seqüências. Todos os cálculos de diversidade genética foram realizados com o auxílio do programa MEGA versão 3.0, para análise de dados de polimorfismos genéticos (Excoffier et al., 2005).

Números de acesso das seqüências de nucleotídeos

Todas as seqüências do gene *nifH* obtidas neste estudo foram enviadas ao GenBank e receberam os seguintes números de acesso: DQ425209 a DQ426510.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Muitas pesquisas que abordam a diversidade de bactérias diazotróficas foram baseadas no isolamento e na caracterização dos isolados por meio de procedimentos bioquímicos e, ou, moleculares. Neste estudo, a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho cultivadas no Rio Grande do Sul foi avaliada por meio do cálculo da diversidade genética total da comunidade baseada no DNA ambiental da comunidade bacteriana, amplificação, clonagem e seqüenciamento do gene *nifH*. Esse gene foi selecionado por estar presente na maioria dos sistemas biológicos capazes de fixar atmosférico. Além disso, tem sido reportado que a análise filogenética obtida por esse gene é mais consistente com a filogenia do gene ribosômico 16S (Zehr et al., 2003), e o banco de dados dos genes que codificam a enzima nitrogenase está aumentando representativamente e melhor, bancado por uma grande quantidade de sequências.

foram feitas análises da diversidade por meio da aplicação de índices ecológicos-padrões de diversidade de espécies e de índices de diversidade genética. Também foram feitas análises da suficiência amostral, para determinar se a amostragem realizada foi representativa da diversidade total das bactérias diazotróficas presentes em cada comunidade. Embora essas análises representem um avanço nos estudos da biodiversidade de bactérias diazotróficas, deve-se salientar que os processos de extração de DNA, bem como as amplificações do gene marcador por PCR, podem exercer influência sobre os resultados obtidos (Martin-Laurent et al., 2001); portanto, precauções adicionais devem ser tomadas na interpretação dos resultados.

Análise de agrupamento baseada no polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) dos genes *nifH*

A amplificação do gene *nifH* com oligonucleotídeos iniciadores específicos e o corte com as endonucleases *TaqI* e *HaeIII* produziram número variável de fragmentos nas diferentes amostras analisadas (Figura 2). A enzima *TaqI* produziu, em média, cinco fragmentos, e esse número variou de três a oito (desvio-

padrão = 1,23), dependendo da comunidade analisada. A enzima *HaeIII* produziu uma média de 12,5 fragmentos, entretanto esse número variou de 10 a 18 (desvio-padrão = 1,92), de acordo com a comunidade analisada. Ambas as endonucleases produziram fragmentos menores do que 300 pb.

A análise filogenética mostrou que a população de bactérias diazotróficas endofíticas associada ao milho foi agrupada em dois grandes grupos com base na similaridade. O grupo I (Figura 2) corresponde às sequências que foram amostradas nas regiões localizadas ao norte do Rio Grande do Sul. O grupo II correspondeu às seqüências amplificadas e extraído das amostras pertencentes à região sul do Estado (regiões IV e V; Figura 1). As amostras coletadas na região central (região I; Figura 1) foram agrupadas aleatoriamente em ambos os grupos.

De acordo com os grupos detectados a partir das amostras ambientais, evidencia-se que existem diferenças no número de fragmentos obtidos em cada amostra, bem como na estrutura e a diversidade da comunidade de N analisada pela variabilidade do gene *nifH*. As diferenças detectadas entre os locais de amostragem, de acordo com a análise de RFLP, são consistentes com resultados da literatura, os quais apontam

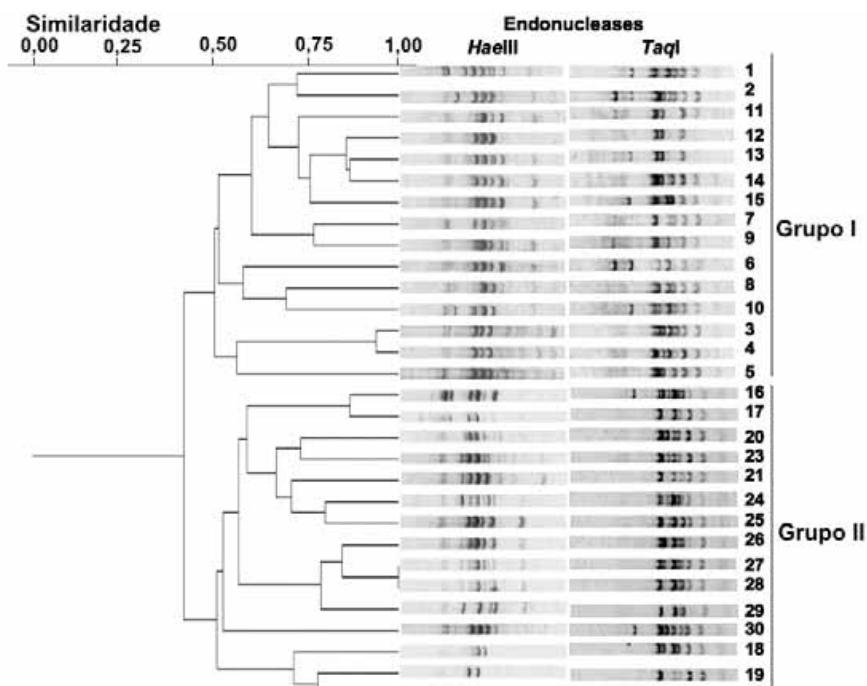


Figura 2. Dendrograma de similaridade, mostrando a análise de agrupamento baseada no polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) dos genes *nifH*.

variabilidade da comunidade fixadora de N é influenciada pelos diferentes tipos de solo e pelo microambiente existente em cada tipo de solo (Widmer et al., 1999; Poly et al., 2001). Entretanto, é importante salientar que a técnica usada não permite a análise funcional da comunidade fixadora de N, já que a presença de genes *nifH* não necessariamente significa atividade da nitrogenase (Dean & Jacobson, 1992).

Com base nos resultados obtidos pela análise dos fragmentos de restrição, que indicou a presença de comunidades diazotróficas distintas entre as regiões localizadas ao norte e ao sul do Estado, foram selecionadas 10 amostras para clonagem e seqüenciamento dos genes *nifH* amplificados. Foram selecionadas cinco amostras da região II (amostras 3, 4, 6, 7 e 8, coletadas ao norte do Rio Grande do Sul) e cinco da região V (amostras 23, 25, 26, 29 e 30, coletadas ao sul do Rio Grande do Sul) (Figura 1; Quadro 1), que apresentaram os maiores contrastes relacionados ao clima e ao tipo de solo. Utilizando as seqüências do gene *nifH* das amostras selecionadas, foram realizadas análises de suficiência amostral, diversidade genética e de espécies diazotróficas e a identificação dos organismos endofíticos associados ao milho.

Análise da suficiência amostral

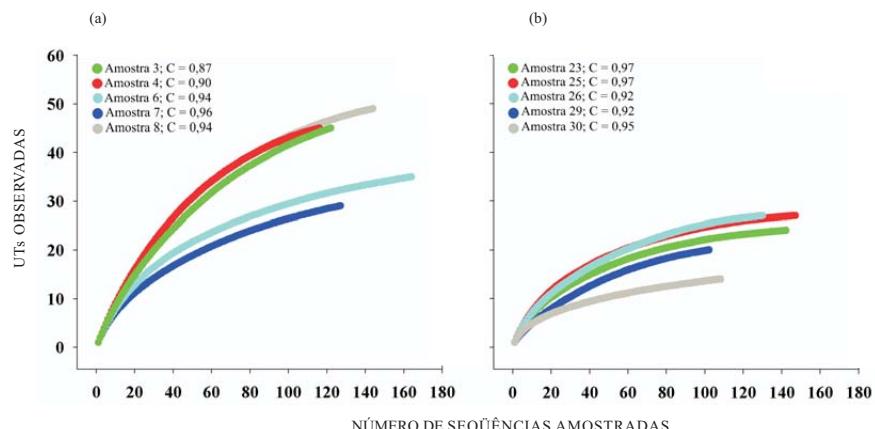
De acordo com Hughes et al. (2001), em uma comunidade o número de tipos de organismos observados aumenta com o incremento no número de amostras tomadas, até que todos os tipos presentes sejam observados. Uma forma de saber se a amostragem foi suficiente para revelar a diversidade total de uma comunidade é por meio da plotagem de curvas de extinção. Para cálculo de tais curvas necessita-se de dados quantitativos e qualitativos de todas as seqüências amostradas dentro de uma comunidade, bem como dos resultados médios obtidos pela reamostragem aleatória do número acumulativo

dos tipos observados versus o número total de amostras tomadas. Considerando que nenhuma das mudanças no DNA exerceu influência sobre os resultados, então as curvas de extinção irão refletir a diversidade taxonômica do ecossistema amostrado (Stach & Goebel, 1994).

Curvas de extinção e cálculos da representatividade amostral fornecem uma estimativa quantitativa relacionada ao tamanho da amostra quanto refletiu a diversidade aparente dentro da comunidade. Todas as curvas de extinção começaram a atingir um platô, usando 97 % de similaridade critério de agrupamento (Figura 3), indicando que o número de clones sequenciado se aproximou ao total de indivíduos presentes dentro da comunidade amostrada. Os cálculos da representatividade amostral também indicaram que uma representatividade amostral de 87 % (amostras 23 e 25), sendo a representatividade amostral igual a 93,4 %. Neste estudo, o número de seqüências amostradas foi suficiente para revelar o número de espécies dentro de cada comunidade avaliada, vez que foi obtida uma amostragem representativa que foi possível realizar as análises subsequentes de comparação entre comunidades e das diferenças de diversidade genética.

Diversidade genética e de espécies de diazotróficas endofíticas associadas ao milho

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



DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A PLANTAS...

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

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

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

A média do índice de Shannon-Weaver foi maior para a região II (3,29) em relação à região V, cujo valor médio calculado foi de 2,35 (Quadro 2). A comunidade presente na amostra 8 apresentou a maior diversidade ($3,65 \pm 0,25$), enquanto a comunidade presente na amostra 30 apresentou a menor diversidade ($1,83 \pm 0,42$). Com relação à Equitabilidade (E), observou-se que para a região II os valores calculados variaram de 0,937 (amostra 8) a 0,816 (amostra 7), e a média geral foi de 0,891. Para a região V, os valores de Equitabilidade variaram de 0,852 (amostra 25) a 0,617 (amostra 29), e a média geral foi de 0,757. Esses resultados sugerem que a diversidade de espécies foi diferente entre as duas regiões avaliadas e que a região II, localizada ao norte do Estado, tendeu a apresentar maior diversidade quando comparada com a região V, localizada ao sul do Estado.

As estimativas de diversidade de nucleotídeos e os valores de $\theta(\pi)$ não foram diferentes entre os locais amostrados (Quadro 2). Embora as análises tenham apresentado variação nos valores calculados para algumas das amostras, as 10 comunidades analisadas exibiram valores aproximadamente idênticos de diversidade de nucleotídeos e da variação genética total dentro da comunidade.

A estimativa da diversidade genética das comunidades variou entre as duas regiões analisadas, sendo, em média, maior na região II do que na região V (Quadro 2), em concordância com os resultados obtidos pelo cálculo do índice de Shannon-Weaver. A comunidade presente na amostra 8 mostrou maior

Com base nos valores de F_{ST} calculados par de amostras, foi construído um dendrograma de similaridade, utilizando o algoritmo (Figura 4). Por meio deste, pode-se observar a existência de quatro grupos distintos, formados de acordo com a região geográfica da qual as amostras foram extraídas. O grupo I foi formado pelas amostras 3, 8 e 7; o grupo II, pelas amostras 4 e 5 (região II); o grupo III, pelas amostras 23 e 25 (região V); e o grupo IV, pelas amostras 26, 29 e 30 (região V).

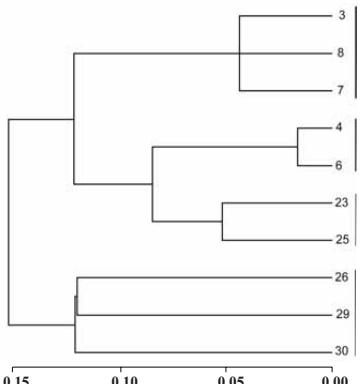


Figura 4. Dendrograma de similaridade, mapeamento da relação entre os valores de F_{ST} das comunidades diazotróficas endofíticas e da fita de PCR.

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

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

Verificou-se maior variação entre as comunidades do que dentro de cada uma delas. As bactérias diazotróficas endofíticas analisadas exibiram grande diferença, particularmente entre comunidades amostradas de diferentes tipos de solo, regime hídrico e regiões geográficas. Essa variação mostrou-se dependente do ecossistema avaliado, demonstrando forte influência regional sobre as bactérias diazotróficas endofíticas. Diversos aspectos, incluindo solo e clima, podem ter contribuído para a determinação dessas diferenças. Reis Junior et al. (2004) avaliaram a influência da sazonalidade sobre as populações de *A. amazonense* associadas às raízes de espécies de *Brachiaria*. Segundo os autores, o fator ambiental apresentou efeito significativo sobre a população dessas bactérias. De acordo com Poly et al. (2001), características físicas e químicas do solo, como textura, C total e conteúdo de N, podem ser correlacionadas com as diferenças na estrutura genética dos grupos de genes *nifH*. Tan et al. (2003) também relataram que fatores ambientais, como tipo de solo e regime hídrico, são determinantes da estrutura da comunidade de diazotróficos. Se a comunidade de bactérias endofíticas é representada por uma fração da comunidade microbiana presente no solo (Seghers et al., 2004), então a composição da comunidade endofítica será determinada pelas influências ambientais e pela especificidade entre microrganismo e hospedeiro. A disponibilidade de água, que representa uma das maiores diferenças climáticas entre as regiões norte e sul do Rio Grande do Sul, foi também um importante fator na

obtenção de melhor exploração do potencial das bactérias diazotróficas, uma perspectiva relevante para uma importante consideração.

Identificação das bactérias diazotróficas endofíticas associadas ao milho

As seqüências do gene *nifH* obtidas neste estudo foram submetidas a análises comparativas com seqüências depositadas no banco genético GenBank usando a ferramenta Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A pesquisa foi realizada utilizando a opção Blast nucleotídeo-nucleotídeo (Blastn), com seqüências de DNA não redundantes do banco GenBank. Foram detectadas seqüências pertencentes às classes α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria e β -Proteobacteria. De acordo com as análises comparativas, foram encontradas diversas seqüências com similaridade > 90 % e até mesmo identificadas espécies bacterianas: *Alcaligenes faecalis* (U97118), *Azoarcus indigens* (AB188121), *Azohydromonas australica* (AB201627), *Azomonas agilis* (AF216883), *Azospirillum fungiphilus* (DQ029204), *Azonexus* sp. (DQ029205), *Azospirillum brasiliense* (X51500), *Azotobacter lipoferum* (AY786992), *Azospirillum brasilense* (AB185395), *Azotobacter vinelandii* (U00090), *Bradyrhizobium elkanii* (AB094963), *Bradyrhizobium japonicum* (AJ563961), *Bradyrhizobium elkanii* (AB079616), *Burkholderia vietnamensis* (AJ563286), *Dechloromonas* sp. (AJ563286), *Delftia tsuruensis* (AY544164), *Herbaspirillum seropedaeae* (AY231580), *Herbaspirillum seropedaeae* (AY231580), *Klebsiella pneumoniae* (X13303), *Klebsiella pneumoniae* (AY367395), *Methylosinus trichosporium* (AM001920), *Pelomonas saccharophila* (AB188120), *Pseudomonas stutzeri* (AJ297529), *Raoultella terrigena* (AM001920), *Rhodobacter azotoformans* (AB079621), *Rhodopseudomonas* sp. (AB079628), *Sinorhizobium* sp. (AM001920) e *Xanthobacter flavus* (AY221812). Adicionalmente, foram detectadas seqüências altamente similares entre si formando agrupamentos distintos. As seqüências detectadas com maior freqüência dentro das comunidades analisadas foram *Azospirillum brasilense* e *Klebsiella pneumoniae*.

Conforme esperado, a análise filogenética (Figura 5) demonstrou que todas as seqüências analisadas foram enquadradas no grupo dos organismos que possuem o gene *nifH*, anteriormente classificado como grupo I (Zehr et al., 2003). Este grupo é principalmente, em seqüências do gene *nifH*, composto por bactérias Cianobactérias, Firmicutes e Proteobactérias, que, coletivamente, representam o grupo de nitrogenases mais bem estudadas (Raymond et al., 2004). Em concordância com a pesquisa realizada pelo programa Blast, as seqüências pertencentes ao grupo I foram, em sua maioria, agrupadas no

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A PLANTAS...

Embora seqüências do gene *nifH* das Proteobactérias correspondam aproximadamente a filogenia observada pela análise de seqüências do gene ribossomal do 16S, alguns microrganismos cultivados não foram agrupados no seu respectivo filo (Figura 5), indicando que a análise filogenética dos genes *nifH* de alguns representantes cultivados deste grupo não apresenta consistência com a classificação filogenética baseada no 16S (Raymond et al., 2004). De acordo com Zehr et al. (2003), os grupos formados pelas classes Gama e Alfa-proteobactéria são geralmente bem definidos, porém existem alguns microrganismos cultivados que não se agrupam de forma consistente por meio da análise filogenética baseada no gene *nifH*. Além disso, muitos microrganismos apresentam múltiplas cópias

dos genes que codificam a enzima nitrogênase e suas enzimas homólogas que são classificadas em diferentes grupos filogenéticos (Zehr et al., 2003). A maioria das seqüências amplificadas diretamente do colmo de milho apresentou similaridade com seqüências de bactérias cultivadas; entretanto, algumas sequências não foram consistentemente relacionadas a microrganismos, sugerindo a existência de bactérias diazotróficas endofíticas não cultiváveis associadas ao milho.

Embora os índices de diversidade de *nifH* tenham demonstrado diferenças relacionadas às regiões de coleta das amostras, alguns gêneros de bactérias como *Klebsiella* e *Azospirillum*, parecem ser comumente encontradas diazotróficas endofíticas associadas ao milho.

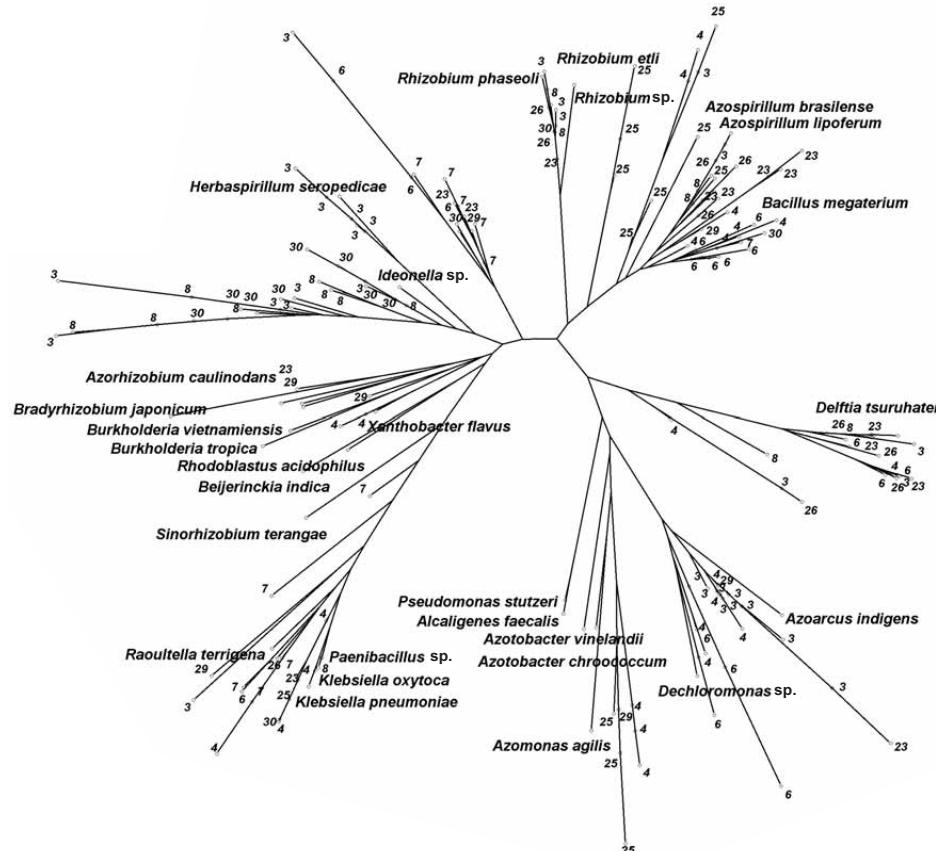


Figura 5. Árvore filogenética das seqüências representativas do gene *nifH* amplificadas a partir de bactérias endofíticas extraídos do colmo de plantas de milho cultivado em diferentes regiões do Rio Grande do Sul e seqüências de referência do gene *nifH* de bactérias cultivadas removidas da base de dados Genbank. Filogenia inferida usando o algoritmo de vizinhos mais próximos. Árvore gerada com o software MEGA 4.0.

ambos foram encontrados em praticamente todas as comunidades analisadas, independentemente da região de coleta das amostras. Ambos já foram detectados em associação com plantas de milho por muitos estudos, incluindo trabalhos baseados em cultivo e isolamento (Baldani & Döbereiner, 1980; Palus et al., 1996) e estudos baseados em técnicas independentes de cultivo (Chelius & Triplett, 2001). Tem sido reportado que bactérias do gênero *Azospirillum* podem colonizar o interior de diversas gramíneas e cereais (Reis et al., 2000) e que bactérias do gênero *Klebsiella* podem colonizar o interior de videira (Bell et al., 1995), plantas de trevo-vermelho (Sturz et al., 1998), mandioca (Balota et al., 1999), arroz (Elbeltagy et al., 2000), batata-doce (Reiter et al., 2003) e citruss (Lavaca et al., 2006). Os resultados indicam que esses dois gêneros podem estar presentes no interior das sementes das plantas de milho analisadas ou que eles estavam presentes nos diferentes solos do Rio Grande do Sul, podendo colonizar plantas de milho, independentemente das características do solo ou das condições climáticas da região.

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

CONCLUSÕES

1. Foi detectada menor diversidade na dinâmica das seqüências do gene *nifH* na região sul do Rio Grande do Sul em comparação com a região norte do Estado; essas diferenças podem estar relacionadas ao teor de argila dos solos e à distribuição de certas regiões amostradas.

2. Diversas seqüências do gene *nifH* similares, mas até mesmo idênticas entre si, foram detectadas em plantas cultivadas em regiões de clima e solo diferentes, indicando que a presença de algumas espécies de bactérias diazotróficas endofíticas, como *Azospirillum*, independe do ambiente.

3. Este estudo revelou que influências genéticas e ambientais podem gerar a associação de certas bactérias diazotróficas endofíticas com plantas de milho, demonstrando que a exploração do solo de bactérias diazotróficas associadas ao milho deve ser feita em uma perspectiva regional.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão das bolsas de estudo e de estágio de doutorado no exterior (L.F.W.R.) e ao primeiro autor. Ao Departamento de Microbiologia e Biologia Celular da Universidade da Flórida, pelo apoio dos laboratórios e materiais para execução desse trabalho.

LITERATURA CITADA

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAEFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997.
- ATLAS, R.M. & BARTHA, R. *Microbial ecology: Fundamentals and applications*. 4.ed. Menlo Park, Benjamin/Cummings, 1998. 694p.
- BALDANI, V.L.D. & DOBEREINER, J. Host-plant interaction in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Plant Soil*, 12:433-439, 1980.
- BALOTA, E.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M. & DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas micorrízicas arbusculares na cultura da mandioca. *Agropec. Bras.*, 34:1265-1276, 1999.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. & DE-BASHER, R. *Azospirillum-plant relationships: physiological, agricultural, and environmental advances* (eds.). *Can. J. Microbiol.*, 50:521-577, 2004.

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A PLANTAS...

- BODDEY, R.M. Biological nitrogen-fixation associated with sugarcane and rice - Contributions and prospects for improvement. *Plant Soil*, 174:195-209, 1995.
- CHELIUS, M.K. & TRIPLETT, E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbiol. Ecol.*, 41:252-263, 2001.
- DEAN, D.R. & JACOBSON, M.R. Biochemical genetics of nitrogenase. In: STACY, G.; BURRIS, R.H. & EVANS, H.J., eds. *Biological nitrogen fixation*. New York, Chapman & Hall, 1992.
- ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SUZUKI, H.; SATO, T.; SATO, Y.; MORISAKI, H.; MITSUI, H. & MINAMISAWA, K. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 46:617-629, 2000.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G. & SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolut. Bioinform Online*, 1:47-50, 2005.
- FALSENSTEN, J. PHYLIP-Phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics*, 5:164-166, 1989.
- GORDON, M.P.; AKEN, B.; van STRAND, S.E.; DOTY, S.L.; MOORE, A.L.; DOSHER, M.R.; SINGLETON, G.L. & STETTLER, R.F. Identification of an endophytic Rhizobium in stems of *Populus*. *Symbiosis*, 39:27-35, 2005.
- GUTIERRÉZ-ZAMORA, M.L. & MARTINEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J. Biotechnol.*, 91:117-126, 2001.
- HUGHES, J.B.; HELLMANN, J.J.; RICKETTS, T.H. & BOHANNAN, B.J.M. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:4399-4406, 2001.
- HUSON, D.H. & BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molec. Biol. Evol.*, 23:254-267, 2006.
- JAMES, E.K. & OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 17:77-119, 1997.
- KUMAR, S.; TAMURA, K. & NEI, M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinf.*, 5:150-163, 2004.
- LACAVA, P.T.; ANDREOTE, F.D.; ARAÚJO, W.L. & AZEVEDO, J.L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. *Pesq. Agropec. Bras.*, 41:637-642, 2006.
- LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M. & van der LEITE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 21:583-606, 2002.
- MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L.; HA... CHAUSSOD, R.; GERMON, J.C.; SOU... CATROUX, G. DNA extraction from soils: the new microbial diversity analysis methods. *Appl. Microbiol.*, 67: 2354-2359, 2001.
- MULLINS, T.D.; BRITSCHGHI, T.B.; KRES... GIOVANNONI, S.J. Genetic comparisons reveal unknown bacterial lineages in Atlantic a... bacterioplankton communities. *Limnol. Oce... 158*, 1995.
- PALUS, J.A.; BORNEMAN, J.; LUDDEN, P.W. & E.W. A diazotrophic bacterial endophyte in stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* *Iltis* a... *Plant Soil*, 186:135-142, 1996.
- POLY, F.; RANJARD, L.; NAZARET, S.; GOURL... MONROZIER, L.J. Comparison of *nifH* genes in soils and soil microenvironments with c... properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:2255-2261, 2001.
- RAYMOND, J.; SIEFERT, J.L.; STAPLES, J.; BLANKENSHIP, R.E. The natural history of diazotrophic nitrogen fixation. *Molec. Biol. Evol.*, 21:541-554, 2004.
- REIS JUNIOR, F.B.; SILVA, M.F.; TEIXEIR... URQUIAGA, S. & REIS, V.M. Identificação de *Azospirillum amazonense* associados a Brachypodium sylvaticum em diferentes épocas e condições de cultivo e fixação de nitrogênio pelo microrganismo. *R. Bras. Ci. Solo*, 28:101-106, 2004.
- REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. & DONZELI, V.P. Biological dinitrogen fixation in gramineous trees. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 19:227-247, 2000.
- REITER, B.; BÜRGMANN, H.; BURG, K. & SES... Endophytic *nifH* gene diversity in African savanna trees. *Can. J. Microbiol.*, 49:549-555, 2003.
- RIGGS, P.J.; CHELIUS, M.K.; INIGUEZ, A.L.; K... S.M. & TRIPLETT, E.W. Enhanced maize growth by inoculation with diazotrophic bacteria. *Appl. Physiol.*, 28:829-836, 2001.
- ROSENBLUETH, M. & MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* maize populations and their competitive colonization. *Arch. Microbiol.*, 181: 337-344, 2004.
- SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FR... GALLO, P.B. & SILVEIRA, A.P.D.S. Ocorrência de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. *R. Bras. Ci. Solo*, 29:345-352, 2005.
- SCHLOSS, P.D. & HANDELSMAN, J. Introducing a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Microbiol.*, 71:1501-1506, 2005.
- SCHLOTER, M.; WIEHE, W.; ASSMUS, B.; ST... BECKE, H.; HOFLICH, G. & HARTMANN, M. Colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv *trifoli* R39 strains and a monospecific polyclonal antisera. *Appl. Microbiol.*, 63:2038-2046, 1997.
- SCHRANK, I.S.; ZAHA, A.; ARAÚJO, E.F. & SA...

- SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E.M.; VERSTRAEDE, W. & SICILIANO, S.D. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community Appl. Environ. Microbiol., 70:1475-1482, 2004.
- SOARES, R.S.; ROESCH, L.F.W.; ZANATTA, G.; CAMARGO, F.A.O. & PASSAGLIA, L.M.P. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. Appl. Soil Ecol., 33:221-234, 2006.
- STACKBRANDT, E. & GOEBEL, B.M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol., 44:846-849, 1994.
- STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R. & MATHESON, B.G. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. Can. J. Microbiol., 44:162-167. 1998.
- TAN, Z.; HUREK, T. & REINHOLD-HUREK, B. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. Environ. Microbiol., 5:1009-1015, 2003.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.H. & WOLKWEISS, S.J. Análises de solo, plantas e materiais. 2 ed. Porto Alegre, Universidade do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWES, D.B.; JEANMOUGIN, F. & HIGGING, D.G. The CLUSTAL windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality tools. Nucleic Acids Res., 25:4876-4882, 1997.
- WIDMER, F.; SHAFFER, B.T.; PORTEOUS, L.A. & R.J. Analysis of *nifH* gene pool complexity in forest litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Coast Range. Appl. Environ. Microbiol., 65:4876-4882, 1999.
- ZEHR, J.P. & McREYNOLDS, L.A. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *NifH* gene from the marine Cyanobacterium *Trichodesmium*. Appl. Environ. Microbiol., 55:2522-2526, 1989.
- ZEHR, J.P.; JENKINS, B.D.; SHORT, S.M. & STEVENS, J. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison. Environ. Microbiol., 5:539-554, 2003.