

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 Museum Road Gainesville, Florida 32611-0700, USA. E-mail: roesch@ufl.edu

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

⁽⁴⁾ Professora do Departamento de Microbiologia, UFRGS. Bolsista do CNPq. E-mail: fatimabento@yahoo.com

⁽⁵⁾ Professor do Departamento de Microbiologia e Ciência Celular da Universidade da Flórida. 1052 Museum Road, Gainesville, Florida 32611-0700, USA. E-mail: ewt@ufl.edu

⁽⁶⁾ Professor do Departamento de Solos, UFRGS. Bolsista do CNPq. E-mail: fcamargo@ufrgs.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. Esses resultados 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 às raízes, uma vez que eles se encontram mais bem localizados para explorar as fontes de C disponibilizadas pelas plantas. Em adição, os diazotróficos endofíticos

colonizam nichos específicos no interior das plantas que apresentam reduzida tensão de oxigênio, necessária para expressão da nitrogenase (James & Olivares, 1997). As plantas são consideradas um complexo microecossistema composto por diferentes *habitats* e podem ser colonizadas simultaneamente por grande diversidade de bactérias endofíticas (Chelius & Triplett, 2001; Lodewyckx et al., 2002). Essa 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 (Reis et al., 2000; Riggs et al., 2001) e grande diversidade de diazotróficos tem sido encontrada colonizando plantas de milho (Chelius & Triplett, 2001). A maioria desses estudos de diversidade é baseada em técnicas de cultivo e subsequente caracterização dos isolados. Entretanto, o cultivo de microrganismos fornece informações limitadas sobre a diversidade, já que a maioria dos organismos existentes não é facilmente isolada por meio de técnicas de cultivo.

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 do Sul (regiões II e III), duas regiões localizadas ao sul (regiões IV e V) e uma região localizada no centro (região I). Em cada região, foram coletadas amostras em cinco a sete lavouras, e de cada lavoura foram coletadas, aleatoriamente, três plantas inteiras, totalizando 30 amostras. Frações de aproximadamente 15 cm 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 retiradas amostras de solo, para análise das características químicas e físicas. De cada um dos 30 locais estudados, 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 estufa 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 anual e quantidade anual de chuva para cada uma das regiões amostradas foram obtidas na Rede Regional 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.

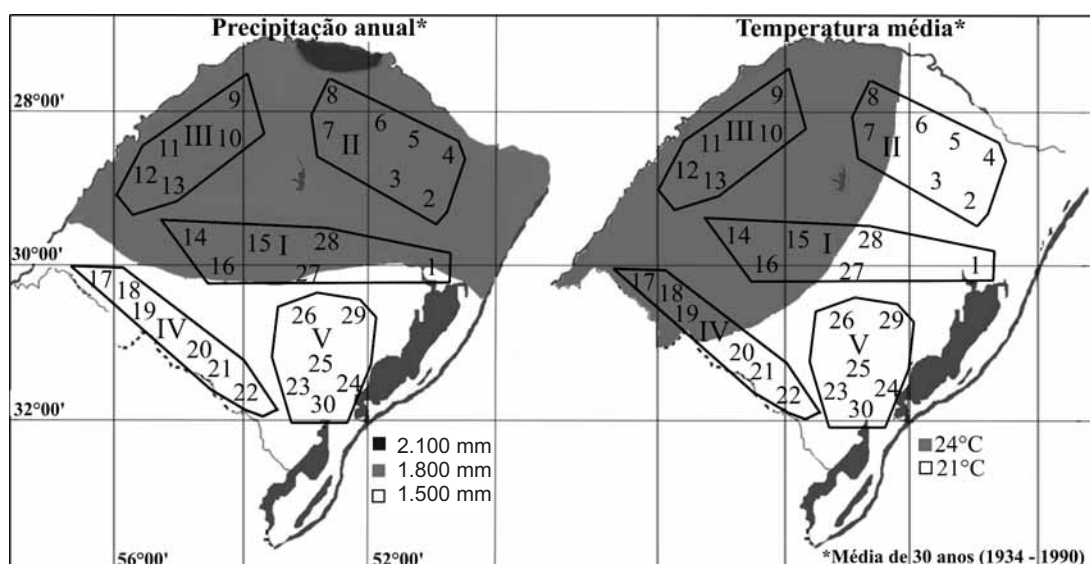


Figura 1. Mapa do Rio Grande do Sul, mostrando as diferenças climáticas e as cinco regiões de amostragem em números romanos (Norte - regiões II e III; Sul - regiões IV e V; Central - região I). Os algarismos arábicos indicam as 30 lavouras onde foram amostradas as plantas de milho utilizadas neste trabalho. As medidas de temperatura média máxima e precipitação anual foram obtidas no oitavo distrito da Rede Regional Meteorológica do Rio Grande do Sul (Instituto de Meteorologia / Ministério da Agricultura). Os valores apresentados representam a média acumulativa dos últimos 30 anos de informação.

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

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. Para extração do DNA das bactérias endofíticas, 10 g do material foram finamente cortados e acondicionados em frascos de vidro com solução-tampão TE (Tris-

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 16 h a 4 °C, para evitar o crescimento bacteriano. Após o período de incubação, o líquido foi filtrado e centrifugado por 10 min a 10.000 g. O pélete, composto por células bacterianas, foi homogeneizado com solução-tampão TE, e o DNA da suspensão de células foi extraído usando o protocolo descrito por Schrank et al. (1987). Após extração, as amostras de DNA foram purificadas com auxílio do kit DNeasy Tissue (Qiagen, Valencia, Calif.), seguindo as instruções do fabricante.

Amplificação do gene *nifH*

Os fragmentos do gene *nifH* foram amplificados usando *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 N. O segundo par de oligonucleotídeos iniciadores foi *nifH*For (5'-ACCCGCCTGATCCTGCACGCCAAGG-3') e *nifH*Rev (5'-ACGATGTAGATTTCTGGGCCTTGTT-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 brasilense* previamente amplificado e seqüenciado, usando o sistema ECL para marcação e detecção direta de ácidos nucleicos (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 *TaqI* e *HaeIII*, que foram escolhidas porque os produtos obtidos pela ação delas sobre o gene *nifH* podem ser utilizados para diferenciação de várias espécies de bactérias diazotróficas (Widmer et al., 1999; Poly et

al., 2001). As digestões foram feitas por um período de 16 h, para que a completa fragmentação do DNA fosse atingida. Os produtos da digestão foram analisados em um gel de poliacrilamida a 10 % e utilizados para construção de uma matriz binária, de acordo com a presença ou ausência dos fragmentos de restrição obtidos. Esta matriz foi utilizada para comparação entre os graus de similaridade das amostras, utilizando-se o coeficiente de Jacard e agrupamento pelo método UPGMA. Para observação das relações genéticas entre as comunidades avaliadas, 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 restrição, foram selecionadas 10 comunidades (cinco amostras de colmo coletadas na região II e cinco na região V), entre as 30 analisadas, para a clonagem e o seqüenciamento dos genes *nifH*. O uso do termo clone nesse sentido significa uma população de células geneticamente idêntica derivada de uma única célula. Esse procedimento foi adotado para que fosse obtida melhor descrição da diversidade dos microrganismos diazotróficos endofíticos de cada comunidade e entre as comunidades, bem como para determinar a identidade dos organismos capazes de colonizar o interior das plantas de milho.

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

Análise de suficiência amostral, diversidade de espécies e filogenia

Após edição manual para eliminação das seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e de seqüências potencialmente incorretas, as seqüências do gene *nifH* foram alinhadas e agrupadas em unidades taxonômicas (UTs). Seqüências que apresentaram 97 % de similaridade ou mais foram consideradas como pertencentes ao mesmo grupo taxonômico. O alinhamento foi realizado utilizando o programa para alinhamentos múltiplos ClustalX 1.83 (Thompson et al., 1997). Com base no alinhamento, foi construída uma matriz de distâncias, usando o programa DNAdist (Felsensten, 1989); finalmente, esta matriz de distâncias foi utilizada como entrada de dados para o programa DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005), que fez a análise de agrupamento,

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 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:

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

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

A variação genética total entre as comunidades foi obtida pela comparação da diversidade genética dentro de cada comunidade, e a diversidade genética total, das comunidades combinadas (F_{ST}): $F_{ST} = (\theta_T - \theta_W) / \theta_T$, em que θ_T é a diversidade para todas as amostras e θ_W é a diversidade genética média dentro de cada comunidade em relação a todas as comunidades comparadas. A significância estatística de F_{ST} 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 variação genética total foi calculada pela média da diversidade de nucleotídeos e pela média da divergência entre as seqüências, de acordo com a seguinte equação:

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

em que k é o número de seqüências distintas; p_i , a freqüência de cada seqüência; p_j , a freqüência de cada espécie; e d_{ij} , o número de diferenças entre duas seqüências. Todos os cálculos de diversidade genética foram realizados com o auxílio do programa Arlequin versão 3.0, para análise de dados de populações genéticas (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 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 da extração do 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 N atmosférico. Além disso, tem sido reportado que a análise filogenética obtida por esse gene é largamente consistente com a filogenia do gene ribossomal do 16S (Zehr et al., 2003), e o banco de dados dos genes que codificam a enzima nitrogenase está aumentando e representa atualmente o maior banco de dados não ribossomal de microrganismos não cultivados (Zehr et al., 2003). Com o objetivo de comparar a diversidade evidente em amostras de seqüências do gene *nifH*,

foram feitas análises da diversidade por meio da aplicação de índices ecológicos-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 cinco fragmentos, entretanto esse número variou de 2 a 10 (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 às plantas de milho foi agrupada em dois grandes grupos com 50 % de similaridade. O grupo I (Figura 2) correspondeu às seqüências que foram amostradas nas regiões II e III, localizadas ao norte do Rio Grande do Sul. O grupo II correspondeu às seqüências amplificadas do DNA 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 o grande número de fragmentos obtidos em cada amostra reflete a estrutura e a diversidade da comunidade fixadora 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 que a

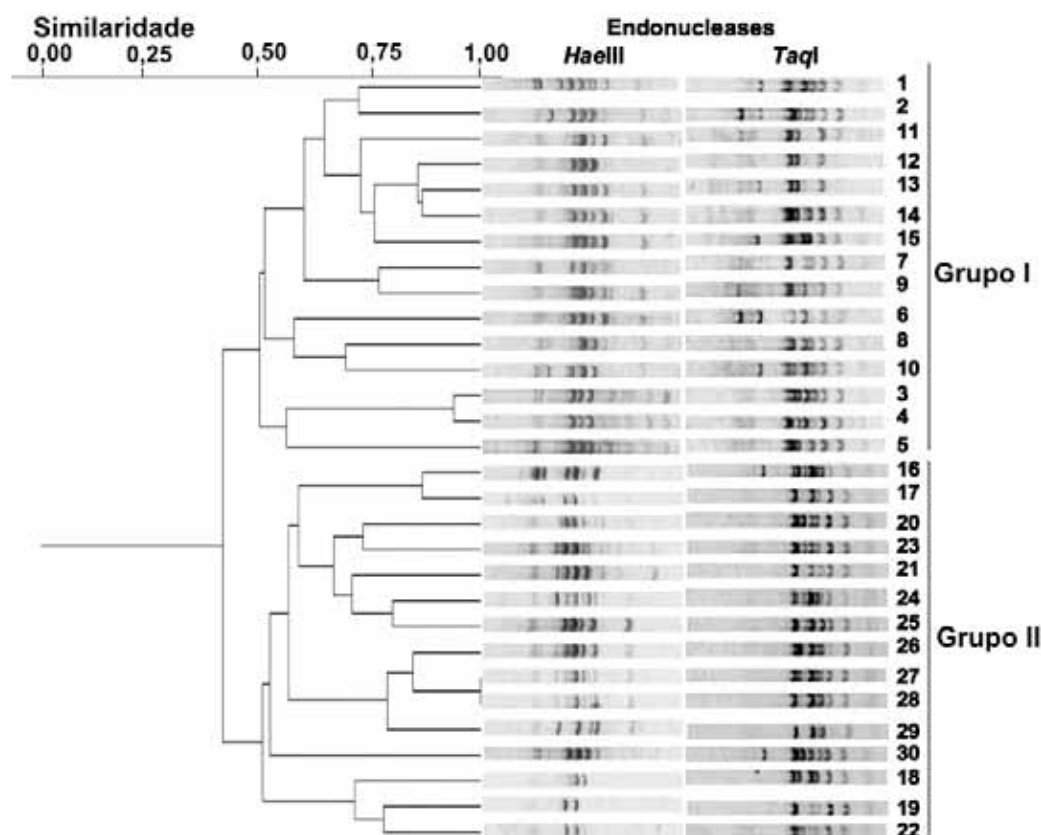


Figura 2. Dendrograma de similaridade, mostrando a análise de agrupamento baseada no polimorfismo dos fragmentos de restrição dos genes *nifH* amplificados a partir do DNA bacteriano extraído do colmo de milho cultivado em diferentes regiões do Rio Grande do Sul, após análise de agrupamento baseada na presença/ausência dos fragmentos de restrição.

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 manipulações do DNA exerceu influência sobre os resultados obtidos, então as curvas de extinção irão refletir a diversidade taxonômica do ecossistema amostrado (Stackbrandt & Goebel, 1994).

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

Diversidade genética e de espécies de bactérias diazotróficas endofíticas associadas ao milho

O número de unidades taxonômicas (UTs) detectadas a 97 % de similaridade variou de 49 (amostra 8) a 29 (amostra 7) para as amostras coletadas na região II, e de 27 (amostras 25 e 26) a 14 (amostra 30) para as amostras coletadas na região V (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.

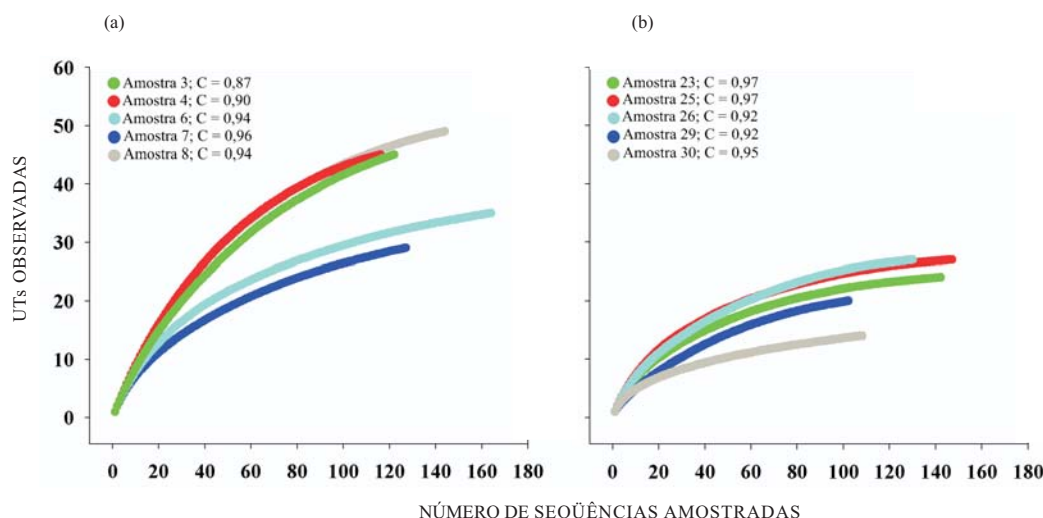


Figura 3. Curvas de extinção calculadas pelo programa DOTUR, usando 97 % de similaridade para o agrupamento das seqüências do gene *nifH* de 10 amostras coletadas nas regiões II (A) e V (B) do Rio Grande do Sul (C = representatividade da amostragem).

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

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

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

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 ± 0,25), enquanto a comunidade presente na amostra 30 apresentou a menor diversidade (1,83 ± 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 diversidade genética (0,977 ± 0,01), ao passo que a comunidade presente na amostra 30 apresentou a menor diversidade genética (0,460 ± 0,07).

Com base nos valores de F_{ST} calculados para cada par de amostras, foi construído um dendrograma de similaridade, utilizando o algoritmo UPGMA (Figura 4). Por meio deste, pode-se observar a presença de quatro grupos distintos, formados de acordo com a região geográfica da qual as amostras foram retiradas. O grupo I foi formado pelas amostras 3, 8 e 7 (região II); 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).

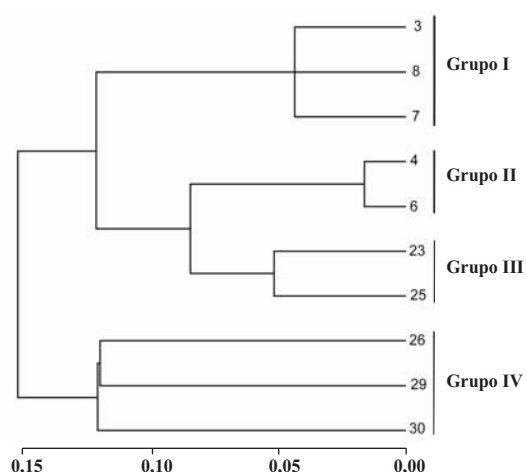


Figura 4. Dendrograma de similaridade, mostrando a relação entre os valores de F_{ST} das comunidades de bactérias diazotróficas endofíticas de diferentes regiões climáticas do Rio Grande do Sul. Os valores de F_{ST} foram significativamente diferentes a 0,05, usando mil permutações.

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 determinação da diversidade dos diazotróficos. Os resultados obtidos sugerem que diferenças regionais podem influenciar a comunidade bacteriana e que, para

obtenção de melhor exploração do potencial das bactérias diazotróficas, uma perspectiva regional pode ser 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 as seqüências depositadas do banco genético do NCBI, usando a ferramenta Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A pesquisa foi realizada utilizando-se a função Blast nucleotídeo-nucleotídeo (Blastn), comparando seqüências de DNA não redundantes do banco de dados. Foram detectadas seqüências pertencentes às classes α -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* e β -*Proteobacteria*. De acordo com as análises comparativas, foram encontradas diversas seqüências similares (similaridade > 90 %) e até mesmo idênticas às espécies bacterianas: *Alcaligenes faecalis* (X96609), *Azoarcus indigenus* (U97118), *Azohydromonas australica* (AB188121), *Azohydromonas lata* (AB201627), *Azomonas agilis* (AF216883), *Azonexus fungiphilus* (DQ029204), *Azonexus* sp. (DQ029203), *Azospirillum brasilense* (X51500), *Azospirillum lipoferum* (AY786992), *Azospirillum oryzae* (AB185395), *Azotobacter vinelandii* (M20568), *Bradyrhizobium elkanii* (AB094963), *Bradyrhizobium japonicum* (AJ563961), *Bradyrhizobium* sp. (AB079616), *Burkholderia vietnamiensis* (AM110718), *Dechloromonas* sp. (AJ563286), *Delftia tsuruhatensis* (AY544164), *Herbaspirillum seropedicae* (Z54207), *Herbaspirillum* sp. (AB196476), *Ideonella* sp. (AY231580), *Klebsiella pneumoniae* (AY242355), *Klebsiella pneumoniae* (X13303), *Klebsiella variicola* (AY367395), *Methylosinus trichosporium* (AJ563953), *Pelomonas saccharophila* (AB188120), *Pseudomonas stutzeri* (AJ297529), *Raoultella terrigena* (AY367396), *Rhodobacter azotoformans* (AB079621), *Rhodovulum strictum* (AB079628), *Sinorhizobium* sp. (AJ505315) e *Xanthobacter flavus* (AY221812). Adicionalmente, seqüências altamente similares entre si foram encontradas em regiões de solo e clima distintos. As espécies detectadas com maior frequência dentro das comunidades analisadas foram *Azospirillum brasilense* e *Klebsiella pneumoniae*.

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

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

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

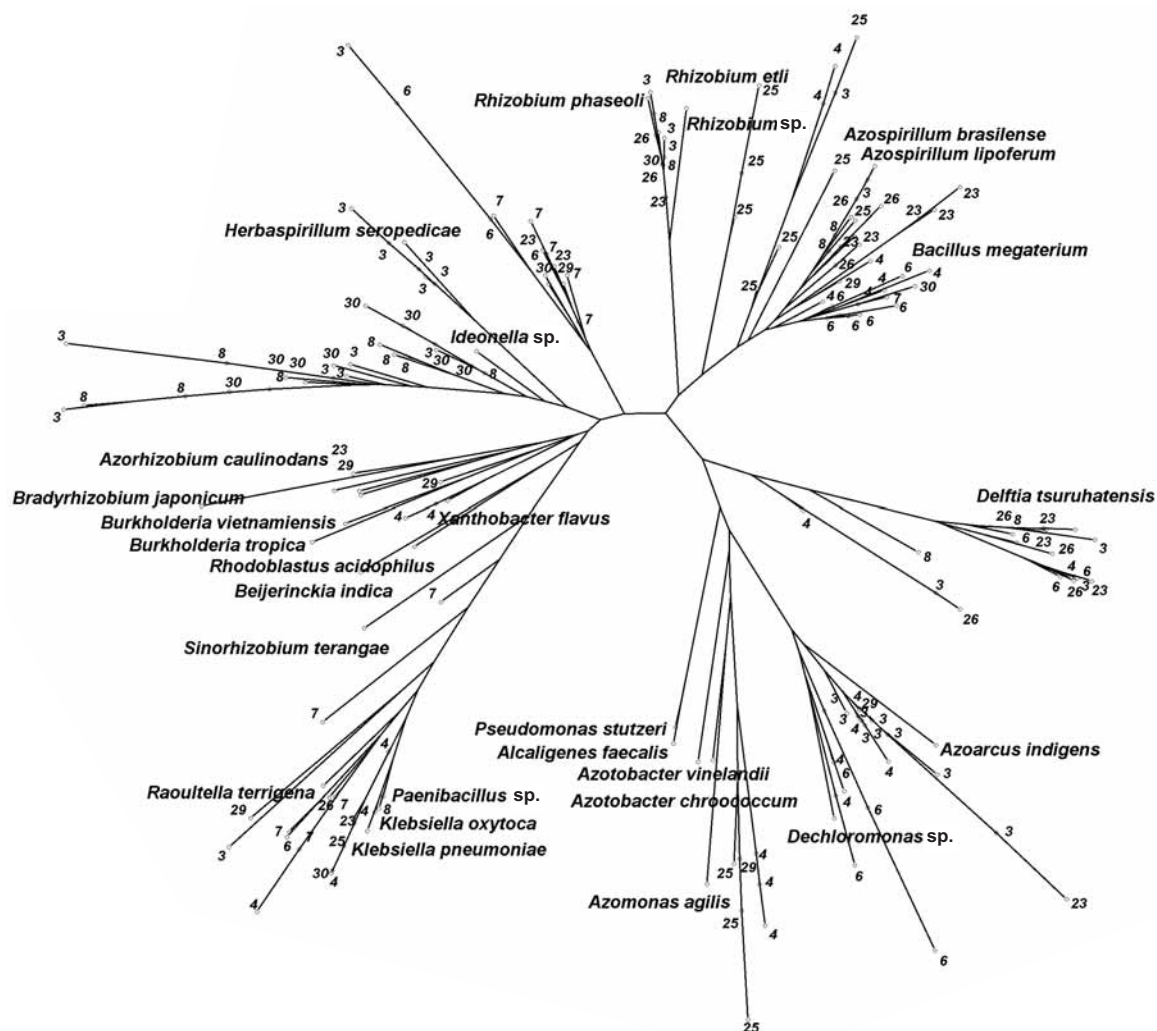


Figura 5. Árvore filogenética das seqüências representativas do gene *nifH* amplificadas a partir do DNA de bactérias endofíticas extraído do colmo de plantas de milho cultivado em diferentes regiões climáticas do Rio Grande do Sul e seqüências de referência do gene *nifH* de bactérias cultivadas removidas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

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 cítrus (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 *Rizobium* 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 & Martínez-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 rotação de culturas, que é o armazenamento de populações residuais de bactérias endofíticas capazes de promover o crescimento das plantas.

CONCLUSÕES

1. Foi detectada menor diversidade na distribuição 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 chuvas das regiões amostradas.

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

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

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão das bolsas de doutorado e de estágio de doutorado no exterior (PDEE) ao primeiro autor. Ao Departamento de Microbiologia e Ciência Celular da Universidade da Flórida, pela cessão dos laboratórios e materiais para execução deste estudo.

LITERATURA CITADA

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAEFFER, A.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 specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.*, 12:433-439, 1980.
- BALOTA, E.L.; LOPES, E.S.; HUNGRIA, M. & DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca. *Pesq. Agropec. Bras.*, 34:1265-1276, 1999.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. & DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.*, 50:521-577, 2004.
- BELL, C.R.; DICKIE, G.A.; HARVEY, W.L.G. & CHAN, J.W.Y.F. Endophytic bacteria in grapevine. *Can. J. Microbiol.*, 41:46-53, 1995.

- 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.
- GUTIÉRREZ-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.
- LACAVAL, 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.; VANGRONVELD, 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, A.P. Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:3673-3682, 2002.
- MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L.; HALLET, S.; CHAUSSOD, R.; GERMON, J.C.; SOULAS, G. & CATROUX, G. DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 2354-2359, 2001.
- MULLINS, T.D.; BRITSCHGI, T.B.; KREST, R.L. & GIOVANNONI, S.J. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. *Limnol. Ocean.*, 40:148-158, 1995.
- PALUS, J.A.; BORNEMAN, J.; LUDDEN, P.W. & TRIPLETT, E.W. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* *Itis* and *Doebley*. *Plant Soil*, 186:135-142, 1996.
- POLY, F.; RANJARD, L.; NAZARET, S.; GOURBIERE, F. & MONROZIER, L.J. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:2255-2262, 2001.
- RAYMOND, J.; SIEFERT, J.L.; STAPLES, C.R. & BLANKENSHIP, R.E. The natural history of nitrogen fixation. *Molec. Biol. Evol.*, 21:541-554, 2004.
- REIS JUNIOR, F.B.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S. & REIS, V.M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *R. Bras. Ci. Solo*, 28:103-113, 2004.
- REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. & DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 19:227-247, 2000.
- REITER, B.; BÜRGMANN, H.; BURG, K. & SESSITSCH, A. Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato. *Can. J. Microbiol.*, 49:549-555, 2003.
- RIGGS, P.J.; CHELIUS, M.K.; INIGUEZ, A.L.; KAEPLER, S.M. & TRIPLETT, E.W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aus. J. Plant Physiol.*, 28:829-836, 2001.
- ROSENBLUETH, M. & MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Arch. Microbiol.*, 181: 337-344, 2004.
- SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO, P.B. & SILVEIRA, A.P.D.S. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. *R. Bras. Ci. Solo*, 29:345-352, 2005.
- SCHLOSS, P.D. & HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:1501-1506, 2005.
- SCHLOTER, M.; WIEHE, W.; ASSMUS, B.; STEINDL, H.; BECKE, H.; HOFLICH, G. & HARTMANN, A. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:2038-2046, 1997.
- SCHRANK, I.S.; ZAHA, A.; ARAÚJO, E.F. & SANTOS, D.S. Construction of a gene library from *Azospirillum brasilense* and characterization of a recombinant containing the Nif structural genes. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 20:321-330, 1987.

- SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, 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.; BOHNEN, H. & WOLKWEISS, S.J. *Análises de solo, plantas e outros materiais*. 2 ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. & HIGGING, D.G. The CLUSTAL-X 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. & SEIDLER, R.J. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:374-380, 1999.
- ZEHR, J.P. & McREYNOLDS, L.A. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *NifH* gene from the marine Cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:2522-2526, 1989.
- ZEHR, J.P.; JENKINS, B.D.; SHORT, S.M. & STEWARD, G.F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison. *Environ. Microbiol.*, 5:539-554, 2003.