

TÍTULO DA TESE

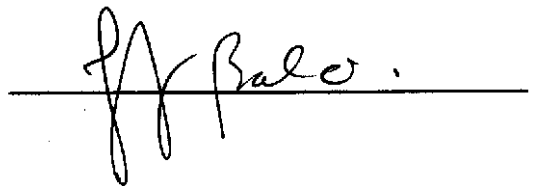
***INFLUÊNCIA DO SOLO E DA PLANTA HOSPEDEIRA SOBRE A
DIVERSIDADE GÊNICA DE ISOLADOS DE *Azospirillum*
amazonense ASSOCIADOS AS RAÍZES DE ARROZ, MILHO E
SORGO***

AUTOR

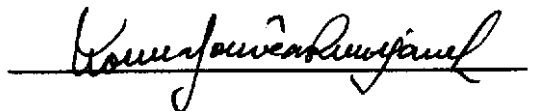
Marcio dos Santos de Azevedo

Aprovada em 18 de dezembro de 1998.

José Ivo Baldani

Handwritten signature of José Ivo Baldani in black ink, written over a horizontal line.

Norma Gouvêa Rumjanek

Handwritten signature of Norma Gouvêa Rumjanek in black ink, written over a horizontal line.

Mônica Cardoso

Handwritten signature of Mônica Cardoso in black ink, written over a horizontal line.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

***INFLUÊNCIA DO SOLO E DA PLANTA HOSPEDEIRA SOBRE A
DIVERSIDADE GÊNICA DE ISOLADOS DE *Azospirillum
amazonense* ASSOCIADOS ÀS RAÍZES DE ARROZ, MILHO E
SORGO***

MARCIO DOS SANTOS DE AZEVEDO

sob a orientação do
Dr. JOSÉ IVO BALDANI

Tese submetida como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Magister Scientiae em Agronomia
Área de Concentração em Ciência
do Solo.

Seropédica, Rio de Janeiro
Dezembro de 1998

A Sueli Maria e Mariana, jóias da minha vida,

e a meus pais, Helio e Sueli,
sempre presentes em
todos os momentos,

dedico.

AGRADECIMENTOS

A Sueli Maria por seu amor e apoio.

Ao Dr. José Ivo Baldani pelo privilégio de sua orientação, confiança e amizade.

A meus pais e irmãos companheiros de jornada, pelos ensinamentos.

Aos Drs. Gudrun Kirchhof e Anton Hartmann pelos esclarecimentos e a experiência proporcionada.

A Dra. Vera Baldani por seu auxílio.

A todos os colegas do laboratório de bioquímica (Dra. Kátia, Vanderlei, Joana, Elison, Vitor, Samuel, André, Patricia, Elan, Janaína, Lúcia, Suzel, Luciana e Jeffé) pela convivência estimulante.

A Chiquita por sua proteção e alegria.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Nascido em 29 de setembro de 1967 na cidade do Rio de Janeiro, filho de Helio de Azevedo e Sueli Monteiro dos Santos de Azevedo, completou o antigo segundo grau em 1985 na Escola Experimental Corcovado no Rio de Janeiro. Foi bolsista de iniciação científica do CNPq no período de 1992 a 1995 sob orientação do Prof. Dr. Osamu Kimura. Diplomou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em janeiro de 1995. Atualmente é responsável pela implantação de um projeto agropecuário em Bonito - MS. O autor é casado com Sueli Maria e é pai de Mariana.

SUMÁRIO

RESUMO.....	Xii
ABSTRACT.....	Xiv
1- INTRODUÇÃO GERAL	1
2 - REVISÃO	4
2.1- Motilidade, Adesão e Colonização Radicular: Eventos Associados à Especificidade Hospedeira?.....	4
2.2- Solo, Microflora e Rizocompetência: Fatores que Influenciam a Estrutura das Populações e Subpopulação de <i>Azospirillum</i> no Solo e na Rizosfera.....	11
2.3- Genes de <i>Azospirillum</i> Envolvidos no Processo de Interação com a Planta.....	17
2.4- Especificidade Hospedeira: Objeto de Controvérsia	24
2.5- A Abordagem Molecular e os Estudos de Diversidade.....	31
2.6- A Estrutura do Trabalho da Tese	40
3- OBJETIVO.....	41
4- MATERIAIS E MÉTODOS	42

4.1- Isolados Bacterianos	42
4.2- Características dos Solos.....	44
4.3- Hibridização com Sondas 23S DNAr.....	45
4.4- Amplificação e Restrição dos Fragmentos Intergênicos 16S-23s DNAr.....	47
4.5- Análises de Agrupamento	52
4.6- Análise da Variância Molecular (AMOVA)	53
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Origem dos 72 isolados e das estirpes de referência e tipo de <i>A. amazonense</i>	43
Tabela 2: Características e especificidades das sondas oligonucleotídicas utilizadas nos experimentos de hibridização.....	47
Tabela 3: Estrutura geral da análise á hierarquica da variância molecular (AMOVA).....	55
Tabela 4: Origem dos isolados de <i>A. amazonense</i> utilizados nos experimentos de hibridização com a sonda AA 23S, específica para a espécie.....	59
Tabela 5: Frequência dos isolados contidos em cada grupo de similaridade.....	73
Tabela 6: Análises da variância molecular dos estudos realizados.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hibridizações <i>dot blot</i> da região 23S DNAr amplificada dos isdados de <i>A. amazonense</i> com as sondas EUB 1440 e AZO 23S.....	58
Figura 2: Hibridizações <i>dot blot</i> da região 23S DNAr amplificada dos isolados de <i>A. amazonense</i> com a sonda AA 23S, especffica para a espécie.....	59
Figura 3: Perfis de amplificação e restrição (gerados pela enzima Cfol) dos fragmentos intergênicos 16S-23S DNAr dos isolados de <i>A. amazonense</i>	83
Figura 4: Perfis de restrição dos fragmentos intergênicos 16S-23S DNAr dos isolados de <i>A. amazonense</i> gerados pelas enzimas RsaI e MspI.....	64
Figura 5: Perfis de restrição dos fragmentos intergênicos 16S-23S DNAr dos isolados de <i>A. amazonense</i> gerados pelas enzimas HaeIII e A/u.....	65
Figura 6: Perfis de restrição dos fragmentos intergênicos 16S-23S DNAr dos isolados de <i>A. amazonense</i> gerados pelas enzimas TaqI e EcoRI.....	66

Figura 7: Reprodutibilidade dos agrupamentos dos isolados de <i>A. amazonense</i> gerados pelas diferentes combinações de coeficientes e métodos de agrupamento.....	68
Figura 8: Dendrograma de similaridade dos 71 isotados de <i>A. amazonense</i> coletados do solo da rizosfera, raízes lavadas e esterilizadas, evidenciando os solos de origem e os grupos formados no nível de similaridade aproximado de 78% (0,78) (I a V).....	69
Figura 9: Dendrograma de similaridade dos 71 isolados de <i>A. amazonense</i> coletados do solo da rizosfera, raízes lavadas e esterilizadas, evidenciando as plantas de origem e os grupos formados no nível de similaridade aproximado de 78% (0,78) (I a V).....	70
Figura 10: Dendrograma de similaridade dos 35 isolados de <i>A. amazonense</i> coletados do solo da rizosfera e das raízes lavadas, evidenciando os solos de origem e os grupos formados no nível de similaridade aproximado de 80% (0,80) (I a V).....	76
Figura 11: Dendrograma de similaridade dos 35 isolados de <i>A. amazonense</i> cotetados do solo da rizosfera e das raízes lavadas, evidenciando os isotados de mesma origem que apresentam um grau de similaridade superior a 88% (0,88) e os grupos exclusivos (A a D)	77
Figura 12: Dendrograma de similaridade dos 38 isolados de <i>A. amazonense</i> coletados das raízes esterilizadas, evidenciando os solos de origem e os grupos formados no nível de similaridade aproximado de 80% (0,80) (I a IV).....	79

Figura 13: Dendrograma de similaridade dos 36 isolados de *A. amazonense* coletados das raízes esterilizadas, evidenciando os isolados de mesma origem que apresentam um grau de similaridade superior a 88% (0,88) e os grupos exclusivos (A a D).....

82

RESUMO

Este estudo teve por objetivo caracterizar a diversidade gênica de estirpes de *Azospirillum amazonense* isoladas do solo da rizosfera, do rizoplane e do interior radicular dos cereais arroz (C3), milho e sorgo (C4), cultivados em dois solos distintos, Itaguaí e Ecologia, procurando encontrar evidências de um eventual efeito discriminatório exercido pelo solo e/ou planta. A estratégia de investigação baseou-se (i) em experimentos de hibridização dot-blot com sondas oligonucleotídicas 23S DNAr grupo-, gênero- e espécie-específicas e (ii) nas análises de restrição dos fragmentos intergênicos 16S-23S DNAr amplificados. Os resultados gerados pelas 7 enzimas de restrição foram posteriormente analisados através das metodologias de agrupamento e de análise da variância molecular (AMOVA). Somente 28 % dos isolados, em sua maioria do solo Ecologia, foram capazes de hibridizar com a sonda específica para a espécie *A. amazonense*, AA 23S. O padrão de hibridização dos isolados pode estar parcialmente associado ao tipo de solo. Os resultados gerados pelas análises de agrupamento e pela AMOVA revelaram a existência de 4 grupos geneticamente distintos, discretos e internamente heterogêneos. Os níveis de diversidade encontrados em cada grupo foram elevados. Não foi observada nenhuma diferença significativa na estrutura, nos padrões genotípicos e nos níveis de diversidade entre os isolados do solo da rizosfera + rizoplane e os do interior radicular. O tipo de solo/ambiente exerce aparentemente um efeito discriminatório sobre os isolados de *A. amazonense*, em especial sobre os isolados da rizosfera e do rizoplane. A planta, por sua vez, é capaz de, até certo limite, influenciar a diversidade populacional de *A.*

amazonense. Plantas de arroz cultivadas no solo Itaguaí e, menos intensamente, plantas de sorgo cultivadas no solo Ecologia discriminaram parcialmente os isolados do solo da rizosfera e das raízes lavadas. Plantas de arroz, milho e, menos intensamente, sorgo, cultivadas no solo Itaguaí, exerceram efeitos discriminatórios sobre os isolados do interior radicular. Os resultados e conclusões gerados neste estudo evidenciam de maneira clara a conveniência de se utilizar de maneira complementar as análises de agrupamento e da variância molecular para a caracterização de populações de bactérias e a determinação dos efeitos discriminatórios exercidos pelo solo e a planta.

ABSTRACT

In this study, the populational structure of *Azospirillum amazonense* isolates recovered from the rhizosphere soil, washed and sterilized roots of rice (C₃), maize and sorghum (C₄) plants, cropped in two distinct soils, Itaguaí and Ecologia, was characterized. Discriminatory effects exerted by the soil and plant types were also investigated. Two methodological approaches based on (i) dot-blot hybridization experiments with group, gender- and species-specific 23S rDNA based oligonucleotide probes and (ii) restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region, followed by proper statistical analysis (cluster analysis and analysis of molecular variance-AMOVA), were used. *A. amazonense* isolates showed a characteristic hybridization pattern, since only 28% of the isolates hybridized with the *A. amazonense*-specific probe AA 23S. This hybridization pattern seems to be associated with the soil type. Four genetically distinct and highly heterogeneous clusters formed at 78% similarity were observed and diversity level within each cluster was very high. There were no differences in structure, genetical patterns and diversity levels between isolates recovered from rhizosphere + rhizoplane and from the inside of the roots. Apparently the soil/environment type is able to discriminate *A. amazonense* isolates, specially those recovered from rhizosphere soil and rhizoplane. The plant type also seems to exert a discriminatory effect. Rice and sorghum plants, cropped in Itaguaí and Ecologia soils, respectively, partially discriminated the rhizosphere and rhizoplane isolates. Rice, maize and sorghum plants cultivated in Itaguaí soil were able to discriminate the endophytic isolates. The results and

conclusions generated in this study clearly demonstrated the convenience of utilising cluster analysis and AMOVA for characterization of bacterial populations and determination of discriminatory effects exerted by soil and plant types.

1- INTRODUÇÃO GERAL

Bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* composto pelas espécies *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. irakense*, *A. halopraeferans* e *A. largomobile*, têm sido objeto de intensas investigações desde a sua redescoberta em meados da década de 70 (Döbereiner et al., 1976). Desde então, diversos experimentos de inoculação conduzidos em casas de vegetação e no campo foram capazes de identificar algumas propriedades benéficas destas bactérias, notadamente aquelas relacionadas a aumentos de produtividade (Okon, 1965). *Azospirillum* possui um conjunto de características importantes que lhe permite sobreviver em associação com as raízes vegetais. Estes microrganismos são extremamente versáteis, pois são capazes de fixar nitrogênio em condições microaeróbicas, desnitrificar sob condições de oxigênio limitante, acumular material de reserva, dispor de vias metabólicas alternativas, etc. Em termos práticos, talvez a propriedade mais importante esteja relacionada à alteração dos

parâmetros de crescimento vegetal e o conseqüente aumento de produtividade. Estes microrganismos são capazes, por exemplo, de promover aumentos no peso seco total das plantas, nos teores de N da parte aérea e no número e comprimento das raízes laterais. São capazes também de estimular a liberação de exudatos radiculares e, principalmente, aumentar o rendimento de determinadas culturas. Os mecanismos envolvidos nestes processos, por sua vez, não foram totalmente esclarecidos. Acredita-se que as alterações promovidas por *Azospirillum* possam ser o resultado de determinados processos executados isolada- ou simultaneamente e associados à atividade hormonal bacteriana, à fixação de N_2 atmosférico, à produção de nitrito, à troca de sinais moleculares e a um melhor desenvolvimento do sistema radicular (Bashan & Holguin, 1997).

É inquestionável o potencial de utilização de *Azospirillum* no campo. Entretanto, sua aplicação em larga escala (na forma de inoculantes) ainda continua sendo impraticável; isto em função da imprevisibilidade e inconsistência dos resultados obtidos na maioria dos ensaios realizados até o presente (Bashan & Holguin, 1997). Frequentemente os aumentos de produtividade obtidos sob determinadas condições não se reproduzem posteriormente (Bashan & Levanony, 1990). Nos últimos anos, outras aplicações não agronômicas como a produção de vitaminas, a síntese de poli-b-hidroxibutirato para uso medicinal, a degradação de poluentes e a purificação de águas residuais foram identificadas.

Atualmente é consenso que *Azospirillum* somente poderá se transformar numa alternativa comercial viável através do desenvolvimento de uma tecnologia

de inoculação confiável e consistente, capaz de promover aumentos significativos de produtividade. Os obstáculos existentes só poderão ser superados através de uma melhor compreensão dos aspectos básicos que influenciam a associação (Itzigsohn et al., 1995; Fages, 1994). Fatores como (i) os mecanismos de promoção do crescimento das plantas, (ii) a motilidade, adesão e colonização radicular, (iii) a interação e competição com outros microrganismos na rizosfera e o papel da planta hospedeira nestas interações, (iv) a genética da associação planta-bactéria, (v) a influência dos fatores químicos e físicos na atividade e sobrevivência de *Azospirillum* no solo (Bashan & Levanony, 1990) (vi) a estrutura e diversidade populacional destes microrganismos e (vii) a especificidade da interação com a planta, deverão ser investigados e compreendidos para que, assim, algumas soluções e alternativas possam ser vislumbradas.

Nesta breve revisão, abordaremos inicialmente os principais relatos sobre os diversos fatores envolvidos na associação, que poderiam, teoricamente, definir a estrutura populacional de *Azospirillum* e, em última análise, determinar a ocorrência de especificidade hospedeira. Citaremos os principais estudos sobre colonização, especificidade da associação e novos sítios de isolamento, enfatizando a polêmica sobre a ocorrência de especificidade hospedeira e, por fim, abordaremos os relatos mais recentes sobre a utilização de técnicas moleculares e estatísticas para a caracterização das populações de *Azospirillum*.

2- REVISÃO

2.1- Motilidade, Adesão e Colonização Radicular: Eventos Associados à Especificidade Hospedeira?

Um dos aspectos mais controversos envolvendo o processo de associação *Azospirillum* - planta diz respeito à ocorrência ou não de especificidade hospedeira. Quais fatores, quais processos e mecanismos, enfim, como se inicia e se define a interação e até que ponto estes eventos estão associados à especificidade hospedeira são questões que deverão ser inicialmente abordadas e discutidas. Em linhas gerais, o processo de associação *Azospirillum* - raízes vegetais pode ser dividido em três etapas sequenciais: a motilidade e deslocamento das células bacterianas em direção às raízes, a adesão das células

à superfície radicular e a colonização, todas podendo afetar em maior ou menor extensão a estrutura das populações de *Azospirillum* na rizosfera e nas raízes.

Nos últimos trinta anos, a motilidade e a resposta quimiotática de *Azospirillum* a um grande número de exudatos radiculares de ocorrência natural foram intensamente analisadas em condições de laboratório (Bashan & Levanony, 1990). Reinhold e colaboradores (1985), por exemplo, investigaram o comportamento quimiotático estirpe-específico de *Azospirillum* e descobriram diferenças nos padrões das respostas, determinados pela espécie e pela estirpe. Três estirpes de *Azospirillum* isoladas de trigo (C_3), milho e kallar grass (C_4) foram investigadas através da técnica câmara-canal. Dentre todas as substâncias testadas, aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos, os últimos foram os que provocaram diferenças mais pronunciadas nas respostas. Os padrões das respostas quimiotáticas foram similares entre as estirpes isoladas de plantas C_4 , diferindo, entretanto, da estirpe isolada de trigo. Estas respostas foram parcialmente correlacionadas com a composição dos exudatos liberados pela planta hospedeira específica. Del Gallo & Fendrik (1994) sugeriram que a estirpe-especificidade da resposta quimiotática de *Azospirillum* poderia ser reflexo dos mecanismos adaptativos da bactéria ao micro-ambiente criado pela planta hospedeira. Seria possível que as características metabólicas da planta, associadas as características micro-ambientais reinantes, pudessem ser responsáveis pelo padrão de comportamento quimiotático dominante. Fedi et al. (1992), citados por Del Gallo & Fendrik (1994) por sua vez, sugeriram que o comportamento quimiotático das estirpes de *Azospirillum* poderia ser definido

muito mais como um processo específico geral e muito menos como um processo específico estrito, altamente dependente da natureza do hospedeiro. Estes autores avaliaram o padrão de resposta quimiotática de 15 estirpes de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, isoladas de diversas raízes de plantas C_3 e C_4 , a exudatos radiculares estéreis de trigo e milho, observando diferenças no comportamento quimiotático das estirpes isoladas de plantas C_3 e C_4 e não encontrando, porém, quaisquer correlações entre os padrões de resposta e a posição taxonômica das estirpes.

Experimentos conduzidos *in situ* forneceram informações valiosas sobre o comportamento de *Azospirillum* em ambientes naturais (Zhulin & Taylor, 1995). Os resultados e conclusões, entretanto, foram até certo grau antagônicos àqueles obtidos em condições de laboratório. No solo, *A. brasilense* é capaz de se locomover por distâncias relativamente grandes em direção à região radicular das plantas (Bashan, 1986; Bashan & Levanony, 1987). Esta movimentação é determinada por um processo ativo, uma vez que, nas avaliações do movimento interradicular de *A. brasilense* realizadas por Bashan & Holguin (1994) uma variante não móvel da estirpe Cd foi incapaz de se deslocar em direção às raízes, permanecendo nos sítios de inoculação. A estirpe selvagem, entretanto, deslocou-se das raízes inoculadas até as não inoculadas. Subtâncias atraentes e repelentes foram os principais fatores que afetaram esta motilidade. Numa segunda avaliação, Bashan & Holguin (1995) observaram que somente uma estirpe selvagem móvel foi capaz de se deslocar entre as diferentes espécies invasoras, independente da espécie, família botânica ou ciclo de produção,

fossem elas anuais ou perenes. Aparentemente, o movimento interradicular de *A. brasilense* é uma etapa preliminar essencial no processo de reconhecimento entre a planta e a bactéria (Bashan & Holguin, 1997). É possível que a motilidade promova o deslocamento das células de *Azospirillum* até os sítios, onde, posteriormente, o processo de ancoragem seja capaz de favorecer a colonização (Bashan & Holguin, 1997). Desta maneira, o deslocamento de *Azospirillum* no solo em direção à região radicular pode ser descrito como um processo ativo e inespecífico, não diretamente influenciado por deficiências nutricionais, mas consequência de uma interação quimiotática não específica influenciada pelo balanço entre substâncias atraentes e possivelmente repelentes liberadas pelas raízes (Bashan & Holguin, 1997).

Estudos dos mecanismos de adesão e colonização superficial radicular de *Azospirillum* realizados anteriormente revelaram que, na maioria das espécies, os principais sítios de associação se localizam nas zonas de alongamento e dos pelos radiculares, onde são observadas agregados celulares (cistos) envolvidos em material fibrilar (Bashan & Levanony, 1990; Pastoreli et al., 1995). Acredita-se que a adesão primária das células bacterianas à superfície radicular seja freqüentemente caracterizada por uma etapa inicial reversível e um tanto quanto inespecífica, seguida por uma etapa posterior de ancoragem irreversível e, em muitos casos, estritamente específica (Marini et al., 1995). No processo de adesão de *Azospirillum* a raízes de trigo, por exemplo, duas etapas distintas são observadas. Uma etapa inicial de adsorção rápida, fraca e mediada possivelmente por proteínas bacterianas do flagelo e uma etapa seguinte de ancoragem mais

demorada, forte, irreversível, onde provavelmente polissacarídeos extracelulares, componentes do glicocálix, estariam envolvidos (Michiels et al., 1990). O estudo das propriedades adesivas de duas classes de mutantes demonstrou a ocorrência destes 2 fenômenos distintos. Entretanto, o caráter seqüencial destes fenômenos não pode ser evidenciado. Uma classe de mutantes, incapazes de sintetizar um determinado polissacarídeo de superfície, perdeu a capacidade de ancoragem, preservando, entretanto, a capacidade de adsorção (mutantes ***Ads⁺ Anc⁻***) (Michiels et al., 1990). Mutantes do segundo tipo (***Ads⁻ Anc⁺***) perderam a capacidade de adsorção, mas não a de ancoragem (Michiels et al., 1990, 1991).

Os componentes celulares bacterianos mais provavelmente envolvidos no processo de adesão e troca de sinais moleculares localizam-se na membrana externa e na estrutura exocelular, o dito glicocálix, e compreendem os lipopolissacarídeos (LPS) (Matora et al., 1995), polissacarídeos capsulares (CPS), exopolissacarídeos (EPS) (Antonyuk et al., 1995; Skvortsov et al., 1995), glicoproteínas e proteínas associadas a polissacarídeos capsulares ou excretadas no ambiente circunvizinho pela bactéria, a fímbria e o flagelo (para uma revisão consulte Del Gallo & Fendrik, 1994). Por sua vez, os componentes celulares da planta mais provavelmente envolvidos compreendem as mucilagens, polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas de superfície (lectinas) e outros componentes dos exudatos radiculares (para uma revisão consulte Del Gallo & Fendrik, 1994).

Lectinas (Halverson & Stacey, 1986; Ignatov et al., 1995; Karpati et al., 1995; Karpati et al., 1997; Alen'kina et al., 1997), CPS (Romantschuk, 1992) e

EPS (Del Gallo & Fendrik, 1994) podem desempenhar importantes funções no processo de reconhecimento e influenciar a especificidade da interação. Em rizóbio, evidências experimentais demonstraram que as lectinas são capazes de se ligar seletivamente a polissacarídeos, envolvendo-se nos processos de troca de sinais moleculares entre a planta e a bactéria (Pühler et al., 1988, citados por Del Gallo & Fendrik, 1994). A hipótese do envolvimento das Minas sugere que estas glicoproteínas da planta hospedeira poderiam interagir seletivamente com os componentes polissacarídicos da superfície bacteriana, iniciando desta maneira o processo de infecção e determinando a especificidade da interação (Halverson & Stacey, 1988).

Em condições artificiais de crescimento, a composição de EPS de *Azospirillum*, ao contrário de CPS, pode variar em função da fonte de carbono fornecida (Speranza et al., 1992, citados por Del Gallo & Fendrik, 1994). Este fato poderia ser relevante para a associação por duas razões: (i) a planta poderia virtualmente influenciar a composição de exopolissacarídeos da bactéria através da exudação e (ii) este fato poderia ser importante para a especificidade da interação (Del Gallo & Fendrik, 1994).

Azospirillum pode ser classificado como um microrganismo diazotrófico endofítico facultativo (Baidani et al., 1997), pois sobrevive na rizosfera e é capaz de colonizar as raízes externa- e, em menor extensão, internamente. Patriquin & Döbereiner (1978), por exemplo, observaram, através do microscópio ótico, células de *A. lipoferum* no interior das raízes de milho, sorgo, trigo, *Panicum maximum* e *Digitaria decumbens*. Estirpes de *A. brasiliense* foram também

visualizadas no interior de folhas e sementes de arroz (Baldani et al., 1993). Algumas estirpes, tais como *A. brasilense* Sp245 e *A. lipoferum* Sp282 foram isoladas de raízes esterilizadas superficialmente de milho, sorgo, trigo e arroz, evidenciando sua possível natureza endofítica (Baldani et al., 1983, 1986; Pereira et al., 1988). Por outro lado, as estirpes de *A. brasilense*, Sp7 e Cd, isoladas respectivamente do solo associado às raízes de *D. decumbens* e *Cynodon dactylon* (Tarrand et al., 1978), tendem a colonizar somente a superfície radicular (James & Olivares, 1997, citando diversos autores). As diferenças entre os padrões de colonização das estirpes ditas endofíticas, tal como Sp245, e ditas colonizadoras de superfície, Sp7, por exemplo, foi confirmada recentemente pelos estudos de Schlöter et al. (1994) e **Aßmus** et al. (1995). Usando anticorpos monoclonais e sondas moleculares estirpe-específicas, estes autores observaram que a estirpe Sp245 era capaz de colonizar o interior dos pelos e dos vasos xilemáticos das raízes de trigo, o mesmo não ocorrendo com a estirpe Sp7, restrita à superfície radicular. De maneira antagônica, Levanony et al. (1989) observaram a estirpe Cd colonizando o interior das raízes de trigo. Entretanto, esta estirpe jamais foi observada no interior da endoderme ou do sistema vascular. Segundo James & Olivares (1997), estes resultados evidenciam um certo grau de estirpe-especificidade na colonização interna das raízes.

No estágio atual do nosso conhecimento seria uma grande pretensão querer esgotar ou mesmo propor um modelo definitivo que procurasse descrever integralmente o processo da associação *Azospirillum* – planta e os mecanismos de especificidade eventualmente envolvidos. Del Gallo & Fendrik (1994)

entretanto, propuseram um modelo que procura descrever de maneira seqüencial e sucinta as etapas da associação descritas acima, enfatizando os aspectos de especificidade. Em síntese, um possível processo de associação *Azospirillum* - raízes poderia ser descrito da seguinte forma:

(i) A bactéria é atraída quimiotaticamente (de maneira parcialmente específica) por exudatos liberados pela raiz. (ii) A bactéria adere inicialmente à superfície das raízes, preferencialmente nas regiões de alongamento e dos pelos radiculares. Esta ligação primária é fraca, reversível e um tanto quanto inespecífica. Proteínas do flagelo e componentes do glicocálix podem estar associados. (iii) Ocorre uma troca de sinais moleculares entre a planta e a bactéria - lectinas e polissacarídeos poderiam estar envolvidos. (iv) Fibrilas são produzidas por *Azospirillum*, promovendo a ancoragem da bactéria. Esta ligação é firme, estritamente específica e irreversível. (v) A associação está plenamente estabelecida. Células de *Azospirillum* são encontradas no rizoplane e no interior radicular.

2.2- Solo, Microflora, e Rizocompetência: Fatores que Influenciam a Estrutura das populações e Subpopulações de *Azospirillum* no Solo e na Risosfera

A sobrevivência e, conseqüentemente, a diversidade populacional e subpopulacional de *Azospirillum* no solo e na rizosfera é determinada por uma

série de fatores bióticos e abióticos existentes. Dentre estes, as interações físicas das células bacterianas com as partículas do solo, as condições ambientais reinantes, as complexas interações de natureza antagonista, sinérgica ou mesmo predatória com a microflora nativa e, em última instância, a maior ou menor capacidade de sobrevivência na rizosfera (rizocompetência), são consideradas as mais importantes e têm sido as mais intensamente estudadas.

A inoculação de plantas com *Azospirillum*, por exemplo, é feita usualmente pela aplicação da bactéria no solo, próxima à planta em germinação; durante este processo, a bactéria é exposta a forças físicas naturais e interações com as partículas do solo (Bashan & Levanony, 1990). Para superar estes obstáculos e atingir as raízes vegetais, a célula de *Azospirillum* é obrigada a desenvolver uma força física considerável, que permita sua locomoção através do solo (Bashan, 1988). Células de *Azospirillum* mantêm-se freqüentemente, e de maneira irreversível, adsorvidas às partículas das porções superiores do perfil do solo, notadamente argilas e material orgânico. Levanony & Bashan (1991), citados por Bashan & Holguin (1997), observaram que células de *A. brasilense* Cd foram intensamente adsorvidas em solos leves e pesados, não sendo, entretanto, adsorvidas & partículas de quartzo. Propriedades físicas e químicas, tais como saturação hídrica, baixos níveis de umidade, pH e disponibilidade de quimioatraentes, podem afetar grandemente o processo de adsorção de *Azospirillum* às partículas do solo (Bashan & Levanony, 1988c, Horemans et al., 1988, citados por Bashan & Levanony, 1990).

A maioria das estirpes de *Azospirillum* sobrevive na rizosfera, embora diversas estirpes possam também ser encontradas no solo (Bashan & Levanony, 1990). *Azospirillum* foi isolado de solos arenosos (Beijerinck, 1925) e aluviais na Somália (Favitti et al., 1988, citados por Bashan & Levanony, 1990). Em regiões temperadas, um pequeno número de células de *Azospirillum* foi capaz de sobreviver no interior de diversos solos independentemente das propriedades texturais (De Coninck et al., 1988, Horemans et al., 1988, citados por Bashan & Levanony, 1990) ao passo que, nos trópicos, um grande número de células bacterianas nativas é frequentemente observado (Döbereiner et al., 1978; Patriquin et al., 1983). Em experimentos no campo e em casas de vegetação, observou-se que *Azospirillum* sobrevivia com dificuldades no solo livre da presença de plantas, quase desaparecendo em menos de 15 dias (Bashan & Levanony, 1990, citando diversos autores). Não obstante e não prevalecendo as condições de estresse ambiental, uma fração da população sobreviveu no solo por períodos prolongados. Bashan (1988) concluía anteriormente que, apesar de sua natureza rizosférica, *Azospirillum* apresenta assim mesmo algumas das características adsorvidas típicas de bactérias do solo. A adsorção, por sua vez determinada por aquelas características, poderia ser superada pela capacidade de locomoção da bactéria, permitindo-a atingir as raízes.

Bashan et al. (1995a e b) procuraram estabelecer correlações entre determinadas características do solo e a sobrevivência das estirpes Cd e Sp245 de *A. brasilense*. As estirpes foram isoladas do interior de 23 tipos de solos obtidos de diversas regiões e condições ambientais de Israel e México e da

rizosfera de trigo e tomate cultivados nestes solos. De maneira geral, as estirpes de *A. brasilense* sobreviveram bem em todas as rizosferas analisadas, independentemente do tipo, origem do solo, estirpe bacteriana ou volume de precipitação antes de cada amostragem. Na ausência de plantas, o padrão de sobrevivência das estirpes foi correlacionado principalmente com a origem do solo e não tanto com as condições ambientais reinantes. Os autores afirmaram que (i) *A. brasilense* seria um colonizador da rizosfera incapaz de sobreviver adequadamente no interior do solo por períodos prolongados e que (ii), em solos não cultivados, algumas características físicas e químicas, notadamente os teores de argila, nitrogênio, matéria orgânica e a capacidade de retenção de água, estariam positivamente correlacionadas com a viabilidade bacteriana, ao passo que outras, como os teores de CaCO_3 e areia grossa, poderiam afetar negativamente a sobrevivência da bactéria.

Após a aplicação no solo, células de *Azospirillum* sofrem um rápido processo de adaptação às condições adversas da rizosfera vegetal. Mudanças frequentes na disponibilidade de nutrientes e interações com os microrganismos nativos, competindo por estes mesmos nutrientes, são alguns dos fatores que podem determinar a sobrevivência de uma determinada estirpe. A natureza das interações com a microflora nativa pode ser do tipo antagonista, sinérgica ou mesmo predatória, onde as células de *Azospirillum* atuariam mais provavelmente como presas das micro- e macrofauna sempre ávidas por nutrientes (Bashan & Levanony, 1990).

As interações entre *Azospirillum* e outros microrganismos têm sido analisadas detalhadamente através de experimentos de co-inoculação (Kaiser, 1995; Flouri et al., 1995; Gori & Favilli, 1995; Bellone & Bellone, 1995; Fabbri & Del Gallo, 1995; Wieland & Fendrik, 1997; Sticchi et al., 1997). Entretanto, estas interações representam somente uma pequena fração das relações existentes entre *Azospirillum* e os demais microrganismos rizosféricos (Bashan & Levanony, 1999). Pouco se sabe, por exemplo, a respeito das interações existentes entre bactérias inoculadas e aquelas nativas, predominantes no solo e pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Azospirillum* e *Bacillus* (Bashan & Levanony, 1990). Diversas espécies de *Azospirillum* produzem bacteriocinas, as quais, surpreendentemente, foram capazes de inibir outras espécies (Oliveira & Drozdowicz, 1981, 1987, Skorupska et al., 1985, citados por Bashan & Levanony, 1990). Estas bacteriocinas não identificadas desapareceram após terem sido aplicadas em diversos solos, persistindo, entretanto, num com pouca matéria orgânica e argilas minerais (Oliveira & Drozdowicz, 1988). O significado ecológico destas bacteriocinas produzidas por *Azospirillum* ainda é desconhecido. *In vitro*, os efeitos antagonistas de alguns microrganismos do solo, especialmente estreptomicetos e fungos, sobre a população de *Azospirillum* foram demonstrados por diversos autores (para uma revisão, consulte Bashan & Levanony, 1990). Se considerarmos que as populações de *Azospirillum* representam somente uma diminuta fração da comunidade microbiana na rizosfera, é razoável crer que muitos outros grupos de microrganismos possam afetar suas capacidades de sobrevivência (Bashan & Holguin, 1997).

Uma avaliação dos intensos estudos das propriedades fisiológicas e bioquímicas de *Azospirillum* demonstrou que este gênero não possui nenhuma característica singular que o distinga de outros gêneros de bactérias associadas às raízes (Pedrosa, 1988, citado por Bashan & Levanony, 1990). Entretanto, determinadas espécies ou mesmo estirpes de *Azospirillum* possuem um conjunto de características encontradas, cada uma delas, separada- e unicamente em espécies bacterianas distintas. Este fato permite a estes organismos competir eficientemente na rizosfera de diversas espécies vegetais com um população nativa de microrganismos e colonizar as raízes, em condições de campo, a partir de um nível de inóculo extremamente baixo (Bashan & Holguin, 1997). Por exemplo, todos os tipos selvagens de *Azospirillum* são capazes de fixar **N₂** sob condições microaeróbicas, o que lhes permite suprir integralmente suas necessidades de nitrogênio (Tarrand et al., 1978). A maioria das estirpes é capaz também de desnitrificar sob condições de oxigênio limitantes. Ademais, *Azospirillum* é nutricionalmente versátil, pois diversas vias metabólicas alternativas o permitem consumir uma variedade de ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos disponíveis na rizosfera, sejam eles originários das raízes ou de outros microrganismos (Hartmann & Zimmer, 1994). Em condições de crescimento normal, *Azospirillum* acumula grandes quantidades de **poli-β-hidroxibutirato**, um material de reserva, que pode ser armazenado para consumo posterior ou para sobrevivência por longos períodos (Tal & Okon, 1985, citados por Bashan & Levanony, 1990). Sob condições de estresse, a bactéria pode formar cistos (agregados celulares); estes lhe conferem uma maior capacidade de

sobrevivência (Bashan & Levanony, 1990, citando diversos autores). Segundo diversos estudos e ao contrário de sua pequena capacidade de sobrevivência no solo, ao menos em condições temperadas, *Azospirillum* parece sobreviver por longos períodos em seu micro habitat natural (Bashan & Levanony, 1990). Entretanto, os diversos mecanismos adaptativos e a importância ecológica daquele fato deverão ainda ser determinados.

De maneira resumida e em função dos resultados e conclusões expostos acima, poderíamos afirmar que a estrutura das populações e subpopulações de *Azospirillum* no solo e na rizosfera nada mais seria do que o reflexo dos mecanismos adaptativos da bactéria ao micro-ambiente (rizocompetência), criado não somente pela planta hospedeira, mas também pelo solo e pela microflora nativa.

2.3- Genes de *Azospirillum* Envolvidos no Processo de Interação com a Planta

Alguns genes supostamente envolvidos no processo de interação com as raízes foram inicialmente identificados com base em suas analogias estruturais com os genes associativos clonados de *Rhizobium* e *Agrobacterium* (Michiels et al., 1994). Regiões do DNA total de *A. brasilense* e *A. lipoferum* homólogas a sondas contendo os genes de *Rhizobium meliloti* *nodDABCIJ* (genes nod comuns)

e *nodQPGEFH* (genes associados à especificidade hospedeira) foram identificadas através de experimentos de hibridização (Fogher et al., 1985, citados por Vande Broek & Vanderleyden, 1995). Dois fragmentos do genoma de *A. brasilense*, apresentando sinais de hibridização com a sonda *nodQPGEFH* de *R. meliloti*, foram clonados e seqüenciados (Vieille & Elmerich, 1999, citados por Vande Broek & Vanderleyden, 1995; Vieille & Elmerich, 1992). As análises revelaram a presença de duas ORFs homólogas aos genes *nodPQ* e *nodG* de *R. meliloti* localizadas no megaplasmídeo de 90 MDa (Vieille & Elmerich, 1999, citados por Vande Broek & Vanderleyden, 1995) e no cromossoma (Vieille & Elmerich, 1992) respectivamente. Nenhuma função patricular pode ser atribuída aos genes *nodPQ* e *nodG* de *Azospirillum*, embora tenha sido demonstrada a natureza constitutiva destes genes (Vande Broek & Vanderleyden, 1995). É possível que estes genes estejam muito menos associados aos processos de interação e, sim, muito mais associados aos processos rotineiros de manutenção celular. De maneira semelhante, Waelkens et al. (1987) citados por Vande Broek & Vanderleyden (1995), observaram a hibridização dos genes *chvA* e *chvB* de *Agrobacterium tumefaciens* com determinados fragmentos de restrição do genoma de diversas *estitpes* de *Azospirillum*. Os genes *chv* estariam associados a capacidade de adesão radicular e virulência de *A. tumefaciens* (Douglas et al., 1982).

Sabe-se, como descrito anteriormente, que os polissacarídeos da superfície celular dos simbiontes e patógenos bacterianos de plantas exercem, freqüentemente, um papel essencial no processo de interação (Vande Broek &

Vanderleyden, 1995). Para elucidar o possível papel destes componentes na associação, deu-se início a um esforço conjunto para identificação dos genes de *Azospirillum* envolvidos no processo de biossíntese dos polissacarídeos da superfície celular. Numa primeira abordagem, foram isolados mutantes de *A. brasilense* não fluorescentes em ágar contendo calcofluor, um corante fluorescente específico para polissacarídeos formando ligações **β -glicosídicas** (Michiels et al., 1990). Observou-se que os mutantes Cal⁻ de *A. brasilense* produziram quantidades de EPS equivalentes às dos não mutantes, sugerindo que, em *A. brasilense*, outro tipo de polissacarídeo de superfície estaria envolvido no processo de ligação a calcofluor (Michiels et al., 1990). A natureza desse(s) polissacarídeo(s) é ainda desconhecida. Os mutantes Cal⁻ de *A. brasilense* tiveram sua capacidade de adesão às raízes de trigo comprometida (Michiels et al., 1991). Numa segunda abordagem, diversos loci gênicos de *A. brasilense* foram identificados através da técnica de complementação intergenética de mutantes exo de *R. meliloti* com cosmídeos de *A. brasilense* Sp7. Em *R. meliloti*, os genes exo estão associados à biossíntese de polissacarídeos da superfície celular. Os clones cosmidiais de *A. brasilense* capazes de restituir o poder de síntese de EPS e a efetividade simbiótica dos mutantes exoB,C,G,K,M,N,P de *R. meliloti* foram isolados (Michiels et al., 1988; Eysers, 1990, citado por Vande Broek & Vanderleyden, 1995). O mutante exoC de *R. meliloti* complementado teve somente o seu fenótipo fluorescente/calcofluor restaurado. Não foi capaz, entretanto, de formar nódulos ativos fixando **N₂** (Michiels et al., 1988). Curiosamente, observou-se que o mutante exoB de *R. meliloti* podia ter o seu

fenótipo restituído pela complementação de dois distintos loci génicos de *Azospirillum* (De Troch et al., 1995) *exoB1* (Michiels et al., 1989) e *exoB2* (De Troch et al., 1995), localizados no megaplasmídeo p90 e no cromossoma, respectivamente. Dentre os clones restauradores do fenótipo, somente aqueles complementando os mutantes *exoB* e *exoC* foram caracterizados posteriormente (para uma revisão, consulte Vande Broek & Vanderleyden, 1995).

Todas as *espécies* de *Azospirillum* possuem plasmídeos (Vande Broek & Vanderleyden, 1995). Em especial, dois plasmídeos, o de 90 Mda (p90) e o outro de 115 Mda (p115), são observados (Franché & Elmerich, 1981, Plazinski et al., 1983, citados por Vande Broek & Vanderleyden, 1995). Em estudos de deleção de plasmídeos não foram observadas diferenças fenotípicas entre a estirpe selvagem Sp7 de *A. brasilense* e seu derivativo p115 curado com respeito a produção de AIA, fixação de N₂, motilidade, quimiotaxia e a capacidade de adesão e colonização de raízes de trigo (Croes et al., 1993). Por sua vez e através de eletroforese SDS e métodos imunoeletroréticos com anticorpos monoespecíficos gerados contra a fração lipopolissacarídica das estirpes Sp245 e Sp7 de *A. brasilense*, Matora et al. (1997) investigaram os antígenos polissacarídicos das estirpes parentais e suas variantes com número alterado de plasmídeos. Os anticorpos obtidos contra a estirpe selvagem Sp245 não interagiram com os LPS do mutante, desprovido de três plasmídeos. O perfil eletrorético dos LPS do mutante diferiram efetivamente do perfil da estirpe Sp245. Clones da estirpe Sp7 forma S (plasmídeo p115 incorporado ao cromossomo), diferindo em sua estrutura lipopolissacarídica e conteúdo plasmidial - plasmídeo p115 aparecendo

novamente como uma molécula capaz de se replicar independentemente - foram obtidos e apresentaram as propriedades fenotípicas características da forma inicial R (plasmídeo p115 não incorporado ao cromossomo). Este resultado indica que as propriedades antigênicas lipopolissacarídicas da estirpe Sp7 e sua forma S são possivelmente determinadas pela forma como o plasmídeo p115 A carregado, seja incorporado ao cromossomo ou não. Os autores concluíram que o conteúdo plasmidial influi na estrutura lipopolissacarídica das células das estirpes Sp245 e Sp7 de *A. brasilense*.

Genes de *A. brasilense* Sp7 supostamente envolvidos no processo de motilidade foram identificados através de seis deleções geradas no plasmídeo p90 (Croes et al., 1991, citados por Vande Broek & Vanderleyden, 1995). A comparação dos mutantes correspondentes por deleção com a estirpe selvagem revelou a presença de três loci envolvidos com a motilidade (Mot1, Mot2 e Mot3). Mot1 e Mot2 afetaram a motilidade da bactéria em meio sólido, mas não em meio líquido. O mutante gerado pela deleção do locus Mot3 mostrou-se completamente imóvel em meio sólido e líquido (Croes et al., 1991, citados por Vande Broek & Vanderleyden, 1995) não apresentando os flagelos laterais e polar (Croes et al., 1993). Este mutante apresentou também uma reduzida capacidade de adsorção às raízes de trigo e colonização. Fora a ausência da proteína do flagelo, a flagelina, nenhuma diferença nos perfis eletroforéticos 2D-PAGE das proteínas externa e totais da membrana entre a estirpe selvagem e o mutante Mot3 foi observada (Croes et al., 1993). Não foram observadas diferenças na capacidade de adsorção das células de *Azospirillum* que cresceram em meio sólido

(possuidoras de flagelos laterais e polar) e meio líquido (possuidoras do flagelo polar unicamente). Os autores sugeriram que o flagelo polar, ou algum componente deste, poderia estar envolvido na primeira etapa do processo de adesão.

A indução da expressão do flagelo lateral em *A. brasilense* Sp7 foi investigada através da fusão *laf1::gusA* (Moens et al., 1996, citados por Moens & Vanderleyden, 1997); o gene *laf1* codifica a flagelina do flagelo lateral de *A. brasilense* (Moens et al., 1995, citados por Moens & Vanderleyden, 1997). O "cross-linking" de bactérias possuidoras do flagelo polar com um antisoro policlonal flagelo polar específico induziu a expressão da fusão *laf1::gusA*, indicando que a indução da expressão dos flagelos laterais surge pelo bloqueio rotacional do flagelo polar (Moens & Vanderleyden, 1997). Em condições de temperatura controlada (23° C), a expressão da fusão foi sensivelmente reduzida em um mutante contendo um cassete de resistência à canamicina inserido num suposto regulador transcricional (*lafR*). Este resultado indica que a temperatura é capaz de afetar a expressão dos flagelos laterais. Adicionalmente, Moens & Vanderleyden (1997) não observaram, num ensaio de colonização de raízes de trigo, diferenças entre um mutante *laf1* e a estirpe selvagem. Tampouco a fusão *laf1::gusA* foi induzida.

Mutantes pleiotrópicos incapazes de metabolizar nitrato, fixar nitrogênio e se locomover foram obtidos através de mutações pontuais no gene *rpoN* (Pereg-Gerk et al., 1997). A não motilidade foi atribuída à ausência dos flagelos laterais e polar. Pouca ou nenhuma colonização da superfície radicular pelos mutantes *rpoN*

foi observada e as bactérias permaneceram confinadas à região dos pelos radiculares (Pereg-Gerk et al., 1997). Os autores concluíram, em função destes resultados, que o gene *rpoN* exerce um controle no processo de colonização.

A complementação genética de um mutante espontâneo não floculante de *A. brasilense* (Katupitiya et al., 1995, citados por Pereg-Gerk et al., 1997) permitiu a identificação de um novo gene regulatório, *flcA*. A análise do processo de floculação através de microscopia eletrônica revelou importantes alterações morfológicas entre a estirpe selvagem e os mutantes não floculantes contendo uma inserção *Tn5* na sequência codificadora *flcA* (Pereg-Gerk et al., 1997). O gene *flcA* controla a agregação das células, a formação do revestimento externo e do material capsular e a secreção de polissacarídeos que formam a rede que envolve as células bacterianas. Em associação com as raízes, os mutantes *Tn5* apresentaram feições semelhantes as suas formas vegetativas e este fato foi correlacionado com uma intensa diminuição da colonização da superfície. Pereg-Gerk et al. (1997) sentiram-se tentados a concluir que o gene *flcA* é responsável pelo controle da diferenciação das células em cistos associados às raízes.

Com o desenvolvimento de ferramentas moleculares básicas para o estudo genético de *Azospirillum*, vários genes envolvidos no processo de interação (exercendo talvez uma influência num eventual mecanismo de especificidade?) foram identificados, tomando *Azospirillum* uma das bactérias associativas promotoras de crescimento mais bem caracterizadas. A análise das sequências homólogas *nod* e *chv*, das sequências complementares *exo*, dos genes associados à motilidade e floculação, enfim, o entendimento dos mecanismos de

atuação destes e outros genes poderá esclarecer diversas dúvidas relativas à associação e, em última análise, relativas à diversidade populacional e subpopulacional de *Azospirillum*. Entretanto, e principalmente pela falta de um fenótipo diagnóstico da planta capaz de revelar claramente a ocorrência das deficiências no processo de interação, a análise genética dos mecanismos envolvidos na associação ainda é de difícil execução (Vande Broek & Vanderleyden, 1995).

2.4- Especificidade Hospedeira: Objeto de Controvérsia

Um dos aspectos mais intrigantes e controversos relativos a associação *Azospirillum* - planta diz respeito à questão da especificidade hospedeira. Até o presente momento, não se obteve nenhuma evidência inequívoca da ocorrência deste fenômeno.

Em meados da década passada, Döbereiner (1981) e Baldani et al. (1983) ressaltaram a importância do conhecimento dos fenômenos de especificidade hospedeira através de estudos de inoculação de gramíneas com *Azospirillum*. Em milho e trigo inoculados, respectivamente, com estirpes específicas de *A. lipoferum* e *A. brasilense*, foram observados aumentos significativos na incorporação de nitrogênio (Döbereiner, 1981). De fato em trigo, somente as estirpes homólogas de *A. brasilense* foram capazes de promover na fase de

enchimento de grãos, aumentos significativos no N total acumulado na parte aérea (Baldani et al., 1983).

Baldani & Döbereiner (1980, 1981) e Baldani (1980) demonstraram, através de métodos fenotípicos tradicionais, um certo grau de especificidade por diferentes espécies de *Azospirillum* na infecção de raízes de milho, trigo e arroz cultivados em casa de vegetação. Raízes de trigo e arroz, de sequeiro e irrigado (**C₃**), foram infectadas predominantemente por estirpes de *A. brasilense*, ao passo que as raízes de milho (**C₄**) foram infectadas em sua maioria por *A. lipoferum*. Em condições de campo, as estirpes apresentaram um padrão de infecção sernelhante; trigo sendo preferencialmente infectado por estirpes de *A. brasilense* e milho por estirpes de *A. lipoferum*. O estabelecimento preferencial de *A. lipoferum* em raízes esterilizadas de milho, observado posteriormente, reforçou as evidências obtidas nos experimentos conduzidos em casa de vegetação e no campo (Döbereiner, 1983). Entretanto, os resultados obtidos com arroz de sequeiro, cultivado em condições de campo, não foram confirmados, já que a maior parte dos isolados das raízes lavadas foi identificada fenotipicamente como *A. lipoferum* nir⁻ (Baldani, 1984). Baldani (1984) observou o estabelecimento de *A. amazonense* na maioria das amostras das raízes de arroz, sorgo e milho, cultivados em dois solos distintos, Itaguaí e Ecologia, concluindo que, embora estes e outros resultados sugerissem a ocorrência de uma certa especificidade na infecção de gramíneas pelas espécies *A. lipoferum* e *A. brasilense*, o mesmo parecia não ocorrer com a espécie *A. amazonense*.

Diferenças nos padrões de infecção de gramíneas **C₃** e **C₄** por *Azospirillum* foram observadas através de métodos de cultivo tradicionais (Rocha et al., 1981; Baldani et al., 1981). Sorgo e diversas gramíneas forrageiras **C₄** (*P. maximum*, *D. decumbens*, *C. dactylon*, *Pennisetum purpureum* e *Brachiaria* sp.) foram preferencialmente infectados por *A. lipoferum*, ao passo que cereais de clima temperado **C₃** (aveia, cevada e centeio) foram infectados por *A. brasilense*. Cana-de-açúcar, entretanto, apresentou um comportamento distinto. Apesar de apresentar via fotossintética **C₄**, foi infectada preferencialmente por *A. brasilense*.

Efeitos morfogenéticos nos pelos radiculares da variedade de trigo BH 1148 foram atribuídos a estirpes de *Azospirillum* distintas (Patriquin et al., 1983). Estirpes homólogas (isoladas das raízes esterilizadas da mesma planta) promoveram a deformação de uma maior quantidade de pelos radiculares ("tuning forks") do que as estirpes heterólogas (isoladas de outras plantas), o que evidenciou, de certa forma, um certo grau de especificidade (Patriquin et al., 1983). A avaliação de outras variedades de trigo demonstrou também que não só as estirpes, mas também a cultivar, podem exercer uma influência na deformação dos pelos radiculares (Jain & Patriquin, 1983a, citados por Baldani, 1984).

Por outro lado, resultados obtidos através dos estudos com as estirpes Cd e Sp7 de *A. brasilense* não indicaram a ocorrência de especificidade hospedeira (Bashan & Levanony, 1999, citando diversos autores). Mais recentemente, Bashan & Holguin (1997) com base em relatos atualizados da ocorrência de *Azospirillum* em diversas espécies vegetais até então não reconhecidas como hospedeiras, sugeriram que as estirpes de *Azospirillum* não apresentam preferência por

qualquer tipo de planta, podendo ser desta maneira aplicadas em plantas sem histórico prévio da presença da bactéria. Por exemplo, duas estirpes de *A. lipoferum* foram capazes de promover um aumento significativo no crescimento de plantas de girassol (Fages & Arsac, 1991, citados por Bashan & Holguin, 1997) assim como a estirpe Cd de *A. brasilense* o fez em plantas de aveia (Zaady et al., 1993, citados por Bashan & Holguin, 1997). Estirpes de *Azospirillum* promoveram alterações significativas nos parâmetros fisiológicos, de crescimento e de produtividade das plantas de cenoura, batata doce, cactus e 4 espécies tropicais nigetianas (para uma revisão, vide Bashan & Holguin, 1997). A estes trabalhos mais recentes somam-se aqueles, onde se relata a promoção do crescimento em tomate, beringela, pimenta e algodão, e a capacidade da bactéria em colonizar, pelo menos, 84 espécies de plantas, das quais 48 consideradas invasoras (Bashan & Holguin, 1997).

Azospirillum é comumente encontrado em gramíneas, embora diversos estudos já tenham demonstrado a sua ocorrência em outros grupos de plantas. A bactéria já foi detectada nas raízes de coqueiro, nos nódulos das raízes, nódulos do colmo e no colmo de *Aeschynomene indica* e *Aeschynomene aspera* (para uma revisão, vide Bashan & Holguin, 1997). Uma bactéria semelhante a *A. brasilense* foi isolada das raízes de 5 plantas cultivadas não pertencentes ao grupo das gramíneas (*Spinacia oleracea*, *Brassica chinensis*, *Brassica rapa* var. *pervidis*, *Glycine max* e *Cucumis sativus*) (Gamo & Ahn, 1991, citados por Bashan & Holguin, 1997). Bashan e Holguin (1997) concluem que *Azospirillum* pode ser

considerado uma bactéria de ocorrência universal, encontrada praticamente em qualquer ambiente.

O conflito de opiniões gerado pelos resultados aparentemente antagônicos citados anteriormente é fruto das dificuldades em se determinar com exatidão e clareza a ocorrência de especificidade na associação *Azospirillum* - planta. A ubigüidade de *Azospirillum*, demonstrada pelos estudos mais recentes, não pode ser contestada. Entretanto, a exclusão de toda e qualquer possibilidade de ocorrência de especificidade hospedeira, como sugerida por Bashan & Holguin (1997) nos parece um tanto quanto precipitada. É possível que a especificidade da interação ocorra de maneira menos estrita e intensa e sim de uma maneira mais geral, não tão evidente (Fedi et al., 1992, citados por Del Gallo & Fendrik, 1994). Há, de fato, indícios de que a interação específica possa ocorrer no nível de estirpes e não no de espécies (Bashan & Levanony, 1990). Ademais, a inexistência de testes comparativos para estirpes obtidas de diversas origens em diferentes plantas e o número reduzido de estirpes avaliadas até o presente dificultam a determinação da ocorrência de especificidade hospedeira (Bashan & Levanony, 1990).

As ferramentas metodológicas disponíveis podem também causar dificuldades adicionais para a caracterização das populações de *Azospirillum* e para a determinação da ocorrência de especificidade hospedeira. Boa parte das investigações realizadas anteriormente, por exemplo, limitou-se a caracterizar parcial- e fenotipicamente os isolados. Uma grande limitação desta abordagem se deve ao fato de que o fenótipo de uma bactéria pode não expressar

necessariamente as reais condições de semelhança e parentesco existentes – estes, em última análise, são determinados pelo genótipo (Untereiner & Vancanneyt, 1997). Isto é particularmente verdadeiro quando se analisa grupos de microrganismos evolutivamente muito próximos (estirpes de uma mesma espécie, por exemplo). Uma segunda grande limitação que impede a caracterização precisa da diversidade microbiana nativa é causada pelo emprego de técnicas de cultura pura e cultivo tradicionais. Apesar da tremenda utilidade e importância para o desenvolvimento das ciências microbiológicas, estas técnicas são altamente inadequadas para descrever e caracterizar as complexas comunidades de microrganismos nativos (De Long, 1996). Estima-se, por exemplo, que 95 a 99% dos microrganismos existentes não possam ser cultivados em meios de cultura tradicionais, o que representa um vasto universo de microrganismos não caracterizados (Amann et al., 1995; Bloomfield et al., 1998) que permanecem ocultos aos olhos dos pesquisadores. Dependendo do solo em estudo, as populações nativas de microrganismos ativos e quiescentes podem ser subestimada em pelo menos uma ou duas ordens de magnitude (Hartmann et al., 1997). Infelizmente, a maioria dos estudos realizados anteriormente empregou métodos de cultivo tradicionais, tais como os métodos de contagem em placa e número mais provável, para quantificar as populações bacterianas do solo e das raízes.

Entender como os microrganismos sobrevivem em seus microhabitats e interagem com o ambiente químico, físico, com a população nativa e seus eventuais hospedeiros tornou-se não somente o principal objetivo das

investigações ecológicas, mas também, essencial para a determinação da ocorrência de especificidade hospedeira. Nos últimos anos, tomou-se óbvia que a avaliação e identificação precisa de um microrganismo só seria possível através de abordagens mais refinadas. Os métodos de detecção e identificação *in situ* e a caracterização polifásica, dentre outras, surgem como alternativas mutuamente complementares e essenciais para a correta análise das populações de bactérias. A identificação e a detecção de microrganismos *in situ* viabilizaram o estudo do comportamento das populações bacterianas em seu microambiente natural. Métodos imunológicos (Schloter et al., 1994; Schloter et al., 1995; Hartmann et al., 1997) e de hibridização *in situ* (Hartmann et al., 1995; Hartmann et al., 1997; Kirchhof et al., 1997a), por exemplo, aliados a modernas técnicas de microscopia e análise de imagens, são capazes de fornecer informações sobre a identidade e distribuição espacial de células bacterianas no solo e nas raízes. A abordagem polifásica (Gillis & Reinhold-Hurek, 1994; Colwell, 1970, citada por Vandamme et al., 1995; Stackebrandt, 1996; Colwell, 1996), por sua vez, não só analisando dados fenotípicos, mas também genotípicos, filogenéticos e de comunidade/habitat, é capaz de, dentro de certos limites, ampliar sob diversos aspectos o nível de informações sobre determinados microrganismos, o que permite sua identificação mais precisa. Na realidade, a abordagem polifásica pode ser descrita como a integração dos diferentes conhecimentos e informações sobre um determinado microrganismo, representando essencialmente um tipo de taxonomia consensual (Vandamme et al., 1995). Esta abordagem, entretanto, exige uma série de procedimentos e análises trabalhosas e demoradas, que a

tornam inadequada para a rápida caracterização de um grande número de microrganismos.

A ocorrência de especificidade hospedeira só sera confirmada através da correta e detalhada caracterização e identificação dos microrganismos envolvidos na associação. Entretanto, e na falta de métodos mais adequados que permitam a rápida análise de um grande número de bactérias, indícios ou evidências da ocorrência daquele fenômeno poderiam ser obtidas através de uma ou poucas metodologias que descrevessem com razoável precisão os padrões de diversidade existentes. A abordagem molecular, especificamente a abordagem genotípica, surge como uma alternativa poderosa e eficiente para a rápida caracterização da diversidade populacional e subpopulacional de microrganismos e a identificação das relações ecológicas existentes no ecossistema natural.

2.5- A Abordagem Molecular e os Estudos de Diversidade

Nos últimos anos, avanços consideráveis foram feitos no desenvolvimento de ferramentas moleculares para a identificação específica de bactérias (Kirchhof et al., 1997c). Análises comparativas das seqüências dos genes ribossomais (Fani et al., 1995; Bally et al., 1995; Dekhil et al., 1997) hibridizações com sondas geradas a partir das seqüências 16s e 23s DNAr (Dung et al., 1995; Hartmann et al., 1995; Kabir & Faure, 1995; Kabir et al., 1996; Kirchhof et al., 1997b), análises

dos padrões de amplificação RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente), rep e interLINE (seqüências palindrômicas extragênicas repetidas) (Fani et al., 1995; Kabir et al., 1996; Kirchhof et al., 1997b), restrição e eletroforese em gel submetido a um campo pulsátil (pulsed-field gel electrophoresis - PFGE) (Gündisch et al., 1993), ribotipagem (Gündisch et al., 1993; Dung et al., 1995) e análises de restrição do DNA (DNA total, DNA ribossomal amplificado - ARDRA, da região intergênica 16s-23s DNAr - IGS - e operon da histidina) (Gündisch et al., 1993; Fani et al., 1995; Grifoni et al., 1995) são algumas das ferramentas utilizadas nos estudos de diversidade, caracterização e identificação de isolados bacterianos. Algumas destas técnicas são capazes de promover a identificação e a discriminação das bactérias no nível das espécies (hibridizações com sondas 16s e 23s DNAr). Algumas chegam mesmo a identificar subgrupos (análises comparativas das seqüências dos genes ribossomais, ARDRA, análise de restrição da IGS) ou mesmo estirpes (RAPD, rep-PCR, interLINE, PFGE, ribotipagem, análise de restrição do operon da histidina) dentro de uma mesma espécie (Vandamme et al., 1995; Bashan & Holguin, 1997; Rademaker & De Bruijn, 1996).

Fani et al. (1995), por exemplo, determinaram as relações filogenéticas de 17 estirpes de *Azospirillum* (14 pertencendo às 5 espécies até então conhecidas e 3 não possuindo uma colocação taxonômica definida) com base no seqüenciamento integral dos genes 16s DNAr amplificados. As relações filogenéticas entre as 5 espécies determinadas pelo seqüenciamento mostraram-se congruentes com resultados fenotípicos e moleculares - análise de restrição do

operon da histidina e análise dos padrões de amplificação RAPD - preliminarmente obtidos. O gênero *Azospirillum* constitui, aparentemente, uma entidade filogenética separada, na qual *A. brasilense* e *A. lipoferum* estão muito próximos e *A. amazonense* mais afastado (Fani et al., 1995) As seqüências dos genes 16s DNAr de 5 espécies de *Azospirillum* foram determinadas parcialmente e comparadas com as seqüências ribossomais de bactérias pertencentes a subdivisão α das Proteobactéria (Bally et al., 1995). Um dendrograma gerado pelo algoritmo Neighbour-Joining revelou que as 5 espécies de *Azospirillum* formam um grupo filogenético discreto e significativo, relacionado intimamente com *Magnetospirillum magnetotacticum* e *Rodospirillum rubrum*. Mais recentemente, através de caracterizações fenotípicas e análises das seqüências dos genes 16s DNAr, Dekhil et al. (1997) tomaram evidente a grande similaridade existente entre *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* e as espécies do gênero *Azospirillum*. Os autores propuseram reclassificar aquela espécie, transferindo-a para o gênero *Azospirillum* como *Azospirillum largomobile* comb. nov., e promover a espécie *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* sp. nov. à nova espécie - tipo. As evidências observadas (um segundo subgrupo formado pelos algoritmos de agrupamento) poderiam também servir de argumento para a transferência de *A. amazonense* e *A. irakense* para um novo gênero. Entretanto, em função da ausência de características fenotípicas discriminatórias, nenhuma proposição semelhante poderia ter sido feita de imediato.

Usando 3 sondas espécie-específicas geradas a partir dos genes 16S DNAr, Kabir & Faure (1995) foram capazes de identificar 154 estirpes, isoladas do

solo e do rizoplane de sorgo, como *Azospirillum* sp. Cento e cinquenta e uma estirpes foram identificadas como *A. brasilense*, pois apresentaram sinais positivos de hibridização com a sonda Aba (específica para *A. brasilense* e *A. amazonense*) e padrões fenotípicos e bioquímicos característicos da espécie, e somente 3 foram identificados como *A. lipoferum*, pois apresentaram sinais com a sonda Al (específica para *A. lipoferum*) e padrões fenotípicos característicos. Nenhum sinal foi observado nas hibridizações com a sonda Al (específica para *A. irakense*). Um estudo comparativo das populações de *Azospirillum* em um solo infestado ou não pela espécie invasora *Striga* sp. em Mali, foi realizado (Kabir et al., 1990). Setenta e dois isolados, presumidamente pertencentes ao gênero *Azospirillum*, foram obtidos dos solos infestados e não infestados. Através de experimentos de hibridização com sondas direcionadas à subunidade 16s RNAr e testes bioquímicos, sessenta e dois isolados foram identificados como *A. brasilense* e dois como *A. lipoferum*. A análise dos perfis de amplificação rep (ERIC-PCR) mostrou as diferenças existentes entre os padrões dos isolados dos solos infestados e não infestados, indicando que a espécie invasora exerce uma influência na diversidade genética da bactéria (Kabir et al., 1996). Bactérias diazotróficas endofíticas, isoladas de *P. purpureum*, *Miscanthus sinensis*, *Miscanthus sacchariflorus* e *Spartina pectinifera*, foram caracterizadas fenotípica- e genotipicamente através de testes morfológicos e fisiológicos e do uso de sondas oligonucleotídicas (Kirchhof et al., 1997b). Diversos isolados foram identificados como *A. lipoferum* e *Herbaspirillum seropedicae*. Outros, entretanto, foram identificados como pertencentes ao gênero *Herbaspirillum*, possivelmente

representando uma nova espécie. Através da análise dos padrões de amplificação interLINE, descobriu-se que a diversidade gênica entre estes isolados era limitada. Este fato poderia indicar a existência de adaptação dos isolados às condições específicas existentes no interior das plantas (Kirchhof et al., 1997b).

A eletroforese em gel submetido a um campo pulsátil (pulsed-field gel electrophoresis - PFGE) foi utilizada por Gündisch et al. (1993) para analisar o polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) de estirpes de *A. brasilense* e *A. lipoferum*. A separação evidenciou um padrão de bandejamento estirpe-específico em quase todos os casos. Após a transferência dos fragmentos de restrição pelo método de Southern e a hibridização com sondas 23s rRNA (ribotipagem), as espécies puderam ser identificadas. Os autores concluíram que a combinação de ambos os métodos tomou possível a identificação de reisolados do solo no nível específico e de estirpes. Dung et al. (1995) caracterizaram fenotipicamente 51 estirpes de *Azospirillum* isoladas do solo e das raízes de arroz cultivado no norte do Vietnã. Experimentos de hibridização com sondas direcionadas à região 23s rDNA e a análise dos padrões de hibridização da sonda 16s rDNA com os fragmentos de restrição do DNA total (ribotipagem) confirmaram os resultados obtidos anteriormente. Dos cinquenta e um isolados analisados, a maioria foi identificada como *A. brasilense*, alguns como *A. lipoferum* e dois como possivelmente um novo grupo de *Azospirillum* (Dung et al., 1995).

Perfis de diversas estirpes de *Azospirillum* foram analisados através da restrição dos genes 16s rDNA amplificados (análise de restrição do DNA ribossomal amplificado - ARDRA) e da restrição dos genes biossintéticos da

histidina (RFLP do operon da histidina) (Grifoni et al., 1995). As evidências obtidas revelaram que ARDRA é uma ferramenta de fácil e rápida execução, cujos resultados podem ser prontamente reproduzidos, e se presta enormemente para a identificação de estirpes de *Azospirillum* no nível de espécies. O RFLP do operon da histidina permitiu, em muitos casos, a diferenciação de estirpes de uma mesma espécie. Ambas as análises geraram padrões equivalentes de agrupamento das estirpes e de agrupamento de novos isolados (Grifoni et al., 1995).

Lemanceau et al. (1995) avaliaram, através de métodos fenotípicos (bioquímicos e fisiológicos) e moleculares (rep-PCR), os efeitos das plantas de linho e tomate sobre a diversidade de *Pseudomonas* do tipo fluorescente isolada de um solo não cultivado e da rizosfera, rizoplane e tecido radicular. Os resultados obtidos através dos testes fenotípicos indicaram que, de uma maneira geral, as populações isoladas do solo são diferentes daquelas isoladas das plantas. As diferenças entre as bactérias isoladas do solo não cultivado e as isoladas do tecido radicular de linho foram particularmente profundas. O efeito de seleção da planta foi mais intensamente expresso em plantas de linho do que de tomate, indicando que a seleção foi, ao menos parcialmente, específica. Lemanceau et al. (1995) observaram também uma boa correlação entre as caracterizações fenotípica e genotípica efetuadas. Por sua vez, a diversidade de *Pseudomonas* do tipo fluorescente, isolada de dois solos não cultivados e dos tecidos radiculares de linho e tomate cultivados nestes dois solos, foi fenotípica- (métodos bioquímicos e fisiológicos) e genotipicamente (ARDRA, rep-PCR e perfil de plasmídeos) analisada (Latour et al., 1996). A análise numérica das características fenotípicas

permitiu o agrupamento dos isolados que apresentaram um alto nível de similaridade, indicando que tanto o solo quanto a planta exercem uma influência na diversidade populacional de *Pseudomonas*. Entretanto, dentre os dois fatores estudados, o solo foi o que exerceu a maior influência. A diferença entre as populações isoladas das plantas cultivadas em um solo e outro poderia ser atribuída às diferenças entre as populações isoladas do interior de um e outro solo. A seleção exercida pela planta foi, ao menos parcialmente, específica, não sendo, entretanto, correlacionada com as espécies bacterianas e biovars ou a presença de DNA plasmidial (Latour et al., 1996). Os autores observaram também uma boa correlação entre as caracterizações fenotípica e a promovida pela análise dos perfis de amplificação rep

Nos últimos 10 anos, a análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição da região intergênica 16s-23s DNAr surgiu como mais uma metodologia alternativa para a caracterização das populações de microrganismos (Navarro et al., 1992; Hamsawa et al., 1993; Laguerre et al., 1996; Paffetti et al., 1996). A região intergênica é conhecida por apresentar variações significativas no comprimento e na estrutura sequencial, tanto no nível genérico como no específico (Hamsawa et al., 1993). Laguerre et al. (1996), por exemplo, promovem a caracterização de 43 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovars viciae, trifolii e phaseoli através de duas abordagens: análise dos perfis de amplificação de regiões interrepetidas (REP-PCR e RAPD) e análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição das regiões cromossomais (região intergênica 16s-23s DNAr) e simbióticas (nifDK e nodD) amplificadas. Os

agrupamentos gerados tanto pelos perfis de amplificação REP quanto pelos randômicos apresentaram uma boa correlação, com níveis de resolução equivalentes. A análise dos padrões de restrição da região intergênica 16S-23S DNAr amplificada permitiu a diferenciação das estirpes no nível intraespecífico. O agrupamento das estirpes foi congruente com os agrupamentos gerados pelos perfis de amplificação, não obedecendo, entretanto, os agrupamentos definidos pelos biovares. Laguerre et al. (1996) afirmam que, através dos padrões de bandejamento facilmente analisáveis e reproduzíveis gerados pela restrição da região intergênica, foi possível discriminar as estirpes até o limite determinado pela elevada similaridade existente. Por sua vez, as análises dos perfis de amplificação REP e RAPD apresentaram o maior poder discriminatório e a maior rapidez de execução. Os padrões de bandejamento, entretanto, foram um tanto quanto complexos e não apresentaram a reprodutibilidade desejada.

A correta interpretação dos resultados fornecidos pelas análises genotípicas é de fundamental importância para a formulação de novas hipóteses e o entendimento dos padrões de diversidade populacional de microrganismos. Pouca atenção tem sido dada à correta avaliação das correlações entre os padrões de diversidade e os parâmetros ecológicos, ambientais e geográficos existentes. Os padrões de agrupamento de microrganismos gerados pelos algoritmos de agrupamento convencionais podem não expressar claramente as eventuais correlações existentes. Excoffier et al. (1992) desenvolveram uma abordagem analítica, adequada para análise da variação molecular dentro de uma mesma espécie. Informações sobre a divergência dos perfis de restrição (haplótipos) do

DNA mitocondrial humano foram incorporadas em uma análise hierárquica (nested), cujo formato se assemelhou à análise da variância convencional e foi definida por uma matriz dos quadrados das distâncias entre todos os pares de haplótipos. Esta análise da variância molecular (AMOVA) produziu estimativas dos componentes da variância que refletiram as correlações da diversidade haplotípica em diferentes níveis hierárquicos. A significância dos componentes da variância foi testada através de procedimentos permutacionais não paramétricos. Excoffier et al. (1992) consideram a AMOVA uma abordagem flexível e coerente para análise estatística de dados moleculares. Por exemplo, a variação dos perfis de amplificação RAPD dentro e entre as populações naturais heterogêneas da espécie vegetal *Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm. (Huff et al., 1993) e a discriminação das estirpes de *Verticillium album-atrum* isoladas de alfafa e batata por marcadores RAPD (Barasubiye et al., 1995) foram determinadas, em última análise, pela AMOVA. A determinação da diversidade gênica de populações de *R. meliloti* isoladas de diferentes variedades de *Medicago sativa* (Paffetti et al., 1996) e a caracterização das estirpes de *Saccharomyces* spp., determinando as correlações entre distância genética e origem ecológico ou geográfica (Guillamón et al., 1996), são dois outros exemplos, onde as potencialidades desta ferramenta estatística foram intensamente exploradas.

2.6- A Estrutura do Trabalho da Tese

Pouco se sabe a respeito dos padrões de colonização, sobrevivência e diversidade populacional da bactéria diazotrófica endofítica facultativa *A. amazonense*. A grande maioria dos estudos realizados anteriormente concentrou suas investigações em algumas poucas estirpes das espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum*.

Investigações fenotípicas realizadas anteriormente revelaram que *A. amazonense* ocorre indiscriminadamente associada às raízes de três cereais com vias fotossintéticas distintas, arroz (**C₃**), sorgo e milho (**C₄**) (Baldani et al., 1984). A determinação da estrutura populacional destes microrganismos, através de técnicas mais refinadas, poderia ser extremamente útil para a obtenção de novas informações sobre os padrões de sobrevivência da bactéria na região radicular e a ocorrência de especificidade hospedeira. Em nosso estudo, procuramos caracterizar a diversidade gênica de 72 isolados de *A. amazonense* associados às raízes de arroz, milho e sorgo, cultivados em dois solos distintos, através de experimentos de hibridização com sondas oligonucleotídicas 23s DNAr grupo-, gênero- e espécie-específicas e de análises de restrição da região intergênica 16s-23s DNAr. Através de metodologias estatísticas adequadas, procuramos paralelamente encontrar evidências da existência de um eventual efeito discriminatório exercido pelo solo e/ou planta.

3- OBJETIVO

Caracterizar a diversidade gênica de isolados de *A. amazonense* associadas às raízes dos cereais arroz, sorgo e milho, cultivados em dois solos distintos, Itaguaí e Ecologia, procurando encontrar paralelamente evidências da existência de um eventual efeito discriminatório exercido pelo solo e/ou planta.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Isolados Bacterianos

Da coleção de culturas da Embrapa: *Agrobiologia* foram utilizados 72 isolados de *A. amazonense*. Estes isolados, selecionados em função de sua representatividade e estado de conservação, foram coletados do solo da rizosfera, das raízes lavadas e das raízes esterilizadas de três cereais com vias fotossintéticas distintas, arroz (*Oryza sativa*; C3,; variedade IAC-25, milho (*Zea mays*; C4; variedade IPEACS Sintético) e sorgo granífero (*Sorghum bico/oc* C4; variedade Pioneer B-815) por sua vez, cultivados simultaneamente em um solo Podzólico Vermelho-Amarelo (série Itaguaí) e um solo Hidromórfico Cinzento (série Ecologia), na área do campo experimental da Embrapa-*Agrobiologia* (Baldani, 1984) (tabela 1). Os isolados de milho foram coletados no início da floração, no início da formação da inflorescência feminina e da fase de enchimento

Tabela 1: Origem dos 72 isolados e das estirpes de referência e tipo de *A. amazonense*.

Isolado/Estirpe	Solo	Planta	Amostra	Referência
Ya 64,76,80	Itaguaí ^a	Arroz	Solo da Rizosfera	Baldani (1984)
Ya 9, 39, 95	Itaguaí	Arroz	Raízes Lavadas	"
Ya 20,47, 92	Itaguaí	Arroz	Raízes Esterilizadas ^c	"
Ya 14, 56, 74	Itaguaí	Arroz	Raízes Esterilizadas +d	"
Ym 610,148	Itaguaí	Milho	Solo da Rizosfera	"
Ym 4, 11, 54, 69	Itaguaí	Milho	Raízes Lavadas	"
Ym 5, 56, 120	Itaguaí	Milho	Raízes Esterilizadas	"
Ym 9,49,127	Itaguaí	Milho	Raízes Esterilizadas +d	"
Ys 6,45, 58	Itaguaí	Sorgo	Solo da Rizosfera	"
Ys 5,41,65	Itaguaí	Sorgo	Raízes Lavadas	"
Ys 14,38,32,60	Itaguaí	Sorgo	Raízes Esterilizadas ^c	"
Ys 17, 34, 61	Itaguaí	Sorgo	Raízes Esterilizadas +d	"
EYa 37	Ecologia ^b	Arroz	Sdo da Rizosfera	"
EYa 13,68,90	Ecologia	Arroz	Raízes Lavadas	"
EYa 22,44,75	Ecologia	Arroz	Raízes Esterilizadas c	"
EYa 18,73,88	Ecologia	Arroz	Raízes Esterilizadas +d	"
EYm 67, 92, 97	Ecologia	Milho	Solo da Rizosfera	"
EYm 42, 72, 131	Ecologia	Milho	Raízes Lavadas	"
EYm 61,133,145	Ecologia	Milho	Raízes Esterilizadas ^c	"
EYm 15, 68, 95	Ecologia	Milho	Raízes Esterilizadas +d	"
EYs S-14, 37, 89	Ecologia	Sorgo	Solo da Rizosfera	"
EYs S-2,43,81	Ecologia	Sorgo	Raízes Lavadas	"
EYs 12, 66, 90	Ecologia	Sorgo	Raízes Esterilizadas ^c	"
EYs 70, 85, 87	Ecologia	Sorgo	Raízes Esterilizadas +d	"
Y1	Ecologia	<i>Digitaria decumbens</i>	Raiz Esterilizada	Magalhães et al. (1983)
Y2	Ecologia	<i>Hyperthemia rufa</i>	Raiz Esterilizada	"
Y3	Ecologia	<i>Digitaria decumbens</i>	Raiz	"
Y6	Ecologia	<i>Pennisetum purpureum</i>	Raiz Esterilizada	"

a: Solo Podzólico Vermelho-Amarelo (Série Itaguaí). b: Solo Hidromórfico Cinzento (Série Ecologia). c: Raízes esterilizadas em clomanina-T 1%, segundo metodologia descrita por Baldani (1984). Os tempos de esterilização foram de 5 min. para milho e sorgo e 1 min. para arroz. d: Raízes esterilizadas. Os tempos de esterilização foram de 60 min. para milho, 30 min. para sorgo e 15 min. para arroz.

de grãos. Os isolados de arroz e sorgo o foram no início da fase de enchimento de grãos, início da maturação e maturação completa (Baldani, 1964). A estirpe tipo, Y1, e as de referência, Y2, Y3 e Y6, foram também incluídas.

Para todos os efeitos, considerou-se os isolados das raízes lavadas e esterilizadas como sendo isolados do rizoplane e do interior radicular, respectivamente.

Neste estudo, salvo uma observação em contrário, referiremo-nos aos isolados coletados do solo Itaguaí ou Ecologia, independentemente da planta ou região radicular de origem, como isolados do solo Itaguaí e isolados do solo Ecologia. O mesmo sentido deverá ser atribuído aos isolados de arroz, milho e sorgo, desconsiderando-se o solo ou região radicular de origem.

4.2- Característica dos Solos.

Série Itaguaí Classificado como um solo Podzólico Vermelho-Amarelo, argila de atividade baixa, A moderado e textura argilosa segundo critérios adotados pela DPFS (Camargo, 1966, citado por Ramos et al., 1973). A análise química dos 20 cm superficiais do solo apresentou a seguinte composição em meqs/ 100g de solo: 2,80 de $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$, 0,12 de K^{+} , 0,02 de Na^{+} e 0,00 de Al^{3+} . Os teores de N, P e o valor do $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ foram de 0,13%, 7 ppm e 5,3 respectivamente. A área experimental foi adubada com 160 kg de P_2O_5 /ha na

forma de superfosfato simples, 160 kg/ha de K_2O como KCl e o pH foi elevado a 6,5 pela aplicação de 1 ton/ha de calcário.

Série Ecologia: Classificado como um solo Hidromórfico Cinzento, distrófico, A moderado e textura média segundo critérios adotados pela DPFS (Camargo, 1966, citado por Ramos et al., 1973). A análise química dos 20cm superficiais do solo apresentou a seguinte composição em meqs/100g de solo: 1,40 de $Ca^{2+}+Mg^{2+}$, 0,18 de K^+ , 0,03 de Na^+ e 0,00 de Al^{3+} . Os teores de N, P e o valor do pH_{H_2O} foram de 0,04%, 17 ppm e 5,4, respectivamente. A área experimental foi adubada com 160 kg de P_2O_5/ha na forma de superfosfato simples, 160 kg/ha de K_2O como KCl e o pH foi elevado a 6,6 pela aplicação de 1 ton/ha de calcário.

4.3- Hibridização com Sondas 23S DNAr.

Extração do DNA - Método de Extração Alcalina: O DNA genômico bacteriano utilizado como molde para as amplificações da região 23S DNAr foi obtido através de um método rápido de extração alcalina adaptado de Audy et al. (1996) e Wang et al. (1993). Um ml de uma suspensão de células bacterianas crescidas por 48 hs. em meio LGI + KNO_3 (1g/l) líquido (Baldani, 1984) foi centrifugado por 2 minutos a 10000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pelete

ressuspenso em 1 ml de água Milli-Q estéril. Repetiu-se novamente a lavagem e 500 μ l da suspensão foram coletados e centrifugados. O pelete foi ressuspenso em 500 μ l de NaOH 0,5N, deixando-se a suspensão repousar por 5 a 10 minutos. Em seguida, 5 μ l do lisado foram coletados e dissolvidos em 495 μ l de Tris-HCl 20mM (pH 8,0). Doze e meio μ l da amostra foram adicionados à mistura reacional de 25 μ l.

Amplificação da Região 23S DNAr: A reação de amplificação ocorreu em 25 μ l de uma mistura reacional de Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, 100 μ M de cada dNTP e 0,2 pM dos primers 939 V (5'- AGT AGY GGC GAG CAA- 3') e 317 R (5'- GTG WCG GTT TGG GGT A- 3') (Ludwig et al., 1994), contendo 1 U de *Tag* DNA Polimerase (GibcoBRL, Gaithersburg, E.U.A.) e 12,5 μ l de amostra de DNA molde. As condições de termociclagem foram de: 1 ciclo inicial de desnaturação (95°C por 3 min.) seguido por 35 ciclos intermediarios (94°C por 30 seg., 48°C por 1 min. e 72°C por 1:30 seg.) e 1 ciclo terminal de extensão e resfriamento (72°C por 10 min. e 15°C por 10 min.). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,2% em TAE lx, 72V, 60 min.), visualizados após coloração com brometo de etídio e fotografados sob iluminação ultravioleta com filme Polaroid tipo 667.

Hibridizações Dot-Blot com Sondas Oligonucleotídicas 23S DNAr Grupo-, Gênero- e Espécie-Específicas: Os fragmentos 23S rDNA amplificados previamente foram imobilizados em membranas de nylon positivamente carregadas e submetidos a experimentos de hibridização com 4 sondas oligonucleotídicas, EUB 1440, AZO 23S, AA 23S e AI 23S, marcadas com Digoxigenina e ^{32}P , segundo metodologia descrita por Kirchhof & Hartmann (1992). As características e especificidades das sondas são descritas na tabela 2.

Tabela 2: Características e especificidades das sondas oligonucleotídicas utilizadas nos experimentos de hibridização.

Sonda ^a	Sequência	Especificidade	T _D (°C) ^b	Referência
EUB 1440	5'-GTTGGCTTAGAAGCAGCC-3'	<i>a-Proteobacteria</i>	54	Kirchhof et al. (1998)
AZO 23S	5'-GGGGCT(A/G)TTTCC(C/T)GG-3'	<i>Azospirillum spp.</i>	53	Kirchhof & Hartmann (1992)
AA23S	5'-ACACCTCCATGGCACAC-3'	<i>Azospirillum amazonense</i>	54	Kirchhof & Hartmann (1992)
AI 23S	5'-GCATACTGGTTTTTCAG-3'	<i>Azospirillum irakense</i>	46	Hartmann et al. (1995)

a: Sondas EUB 1440, AZO 23S e AA 23S foram marcadas com Digoxigenina. Sonda AI 23S foi marcada com ^{32}P . b: T_D (°C): Temperatura de dissociação.

4.4- Amplificação e Restrição dos Fragmentos Intergênicos 16S-23S DNAr.

Extração do DNA Genômico Bacteriano - Método Fervura: Este procedimento, uma adaptação do método desenvolvido por Leonardo Cruz

(comunicação pessoal), foi empregado para obtenção do DNA utilizado como molde para as amplificações da região intergênica 16S-23S DNAr. Cinquenta μl de uma suspensão de células bacterianas crescidas por 46 hs. em meio LGI + KNO_3 (1g/l) líquido (Baldani, 1984) foram transferidos para microtubos de 0,5 ml e dissolvidos em 450 μl de água Milli-Q estéril. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada, aquecida a 100% por 10 minutos e resfriada em gelo por um período mínimo de 5 minutos. Quatro μl da amostra foram adicionados à mistura reacional de amplificação.

Amplificação da Região Intergênica 16S-23S DNAr: A reação em cadeia da polimerase (PCR) ocorreu em 100 μl de uma mistura reacional de Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl_2 1,5 mM, 50 μM de cada dNTP e 0,2 pM de cada primer, contendo 2 U de Ta9 DNA Polimerase (GibcoBRL, Gaithersburg, E.U.A.), 4 μl de amostra de DNA molde e água sem DNase. Os primers universais utilizados, PHR (5'-TGC GGC TGG ATG ACC TCC TT- 3') e P23 (5'- GGT TCT TTT CAC CTT TCC CTC- 3') foram sintetizados com base em seqüências conservadas dos genes 16S e 23S ribossomais flanqueando a região intergênica (Arturo et al. 1995). As condições de termociclagem foram de: 1 ciclo inicial de desnaturação (95°C por 3 min.) seguido por 30 ciclos intermediários (94°C por 1 min., 60°C por 1 min. e 72°C por 3 min.) e 1 ciclo terminal de extensão e resfriamento (72°C por 5 min. e 15°C por 15 min.). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,2% em TAE 1x, 72V, 60 min.), visualizados

após coloração com brometo de etídio e fotografados sob iluminação ultravioleta com o filme Polaroid 667.

Restrição dos Fragmentos Intergênicos Amplificados: Os fragmentos intergênicos amplificados previamente foram purificados com o kit de purificação de produtos de PCR altamente purificado (Boehringer Mannheim, Alemanha, segundo protocolo fornecido pelo fabricante) para a remoção de substâncias e compostos que pudessem eventualmente interferir nas reações de restrição. Os produtos da amplificação foram incubados por três horas com as endonucleases de restrição tetraméricas HaeIII, AluI, MspI, RsaI e CfoI a 37°C, com a hexamérica EcoRI a 37°C e com a tetramérica TaqI a 65°C (Boehringer Mannheim, Alemanha). Para um volume final de 25 μ l, cada sistema de restrição conteve 5 U de enzima, 2,5 μ l de tampão de reação 10x e 10 μ l de amplificado. Após a clivagem, cada solução de restrição foi concentrada para 4 μ l e misturada com 2 μ l de tampão de corrida. Cinco μ l foram adicionados ao gel horizontal de poliacrilamida na concentração de 6% e os fragmentos gerados foram separados por eletroforese (MOPS 1x, 20°C, 200 V, 6 hs.) e visualizados após coloração com AgNO_3 (detalhes descritos a seguir).

Gel de Poliacrilamida (6%): As placas de sustentação de vidro (SDS & Native Page, IEF Kit, Pharmacia BioTech - Uppsala, Suécia) foram inicialmente limpas com água destilada, sabão/água e etanol 70%. Uma folha de acetato do kit

com o lado hidrofóbico foi colocada sobre uma placa de sustentação umedecida com água, as eventuais bolhas de ar foram eliminadas e a parte superior da folha deixada para fora. Uma segunda placa de vidro foi presa firmemente à primeira por grampos. Para completar o volume final de 45 ml, água Milli-Q foi adicionada a 11,25 ml de Glicerina 40%, 9 ml de Poliacrilamida (30:0,5) e 0,9 ml de tampão MOPS 50x. Em seguida, 50 μ l de APS e 75 μ l de TEMED foram adicionados e a solução resultante foi rapidamente vertida entre as placas de sustentação, evitando-se a formação de bolhas. Após uma hora, as placas foram cuidadosamente separadas e o gel retirado.

Corrida Horizontal do Gel: Os reservatórios de eletrólito do aparato de corrida horizontal (MultiPhor II Unit, Pharmacia BioTech - Uppsala, Suécia) foram preenchidos com uma tampão MOPS 1x. O gel foi colocado horizontalmente sobre a placa de cerâmica, evitando-se a formação de bolhas, e duas pontes com tiras de papel de filtro, entre a solução tampão dos reservatórios e as partes anterior e posterior do gel, foram feitas. O gel foi carregado com 5 μ l de amostras e em seguida coberto com a placa de vidro apropriada. A temperatura de resfriamento e a voltagem foram ajustados para 20°C e 200V e a eletroforese foi iniciada. O tempo de corrida foi de 6 a 8 hs.

Coloração com AgNO_3 : Na etapa inicial de fixação, o gel foi lavado numa solução de etanol 10%, ácido acético glacial 0,5% por 3 min., duas vezes. Na

etapa seguinte de coloração, foi imerso numa solução de AgNO_3 0,1% por 10 min. e em seguida, lavado em água destilada por aproximadamente 10 seg., duas vezes (OBS.: A solução de AgNO_3 0,1% pode ser utilizada novamente por até 10 vezes, devendo ser, então, descartada em depósito especial apropriado). Para a revelação, o gel foi lavado por vinte min. em 250ml de solução de NaOH 1,5%, NaBH_4 0,01% e Formamida 0,015% recém preparada (OBS.: A solução foi descartada em depósito especial adequado). Para interrupção das reações, o gel foi imerso numa solução de Na_2CO_3 0,75% por 5 a 10 min. e posteriormente armazenado em saco plástico selado.

Soluções Estoque: Tampão MOPS 50x: Foram dissolvidos 209,3 g de MOPS e 93,0 g de Na-EDTA em 900 ml de água Milli-Q, o pH foi corrigido para 8,0 pela adição de aproximadamente 32g de NaOH em contas e o volume foi ajustado a 1,01 com água Milli-Q (OBS.: O pH não pode ser corrigido com HCl). A solução foi esterilizada por ultrafiltração (Sartorius V-500 com a membrana SM- 18045-E) e armazenada em geladeira. Poliacrifamida (30:0,5) : Para um volume final de 1,01 foram dissolvidos em água Milli-Q 300,0 g de Acrilamida e 5,0 g de Metilenobisacrilamida. A solução foi armazenada em geladeira.

4.5- Análises de Agrupamentos:

Uma matriz binária dos dados originais foi construída, compreendendo o universo total das bandas de todos os perfis gerados pelas 7 enzimas. Para cada posição de migração foram atribuídos os valores 1 ou 0, indicando a presença ou ausência de uma banda. Os padrões de migração gerados foram comparados e suas semelhanças, estimadas pelo coeficiente de Sorensen (Bridge, 1993), computadas em uma matriz de similaridade. O coeficiente de Sorensen (**S_{xy}**) para características binárias define as semelhanças entre dois indivíduos como sendo **$S_{xy}=2a / 2a+b+c$** , onde **S_{xy}** é a semelhança entre os indivíduos x e y, a é o número de fragmentos compartilhados por ambos indivíduos, b e c são os números de fragmentos pertencentes exclusivamente aos indivíduos x e y, respectivamente. Os isolados foram agrupados pelo método das médias das distâncias (Bussab et al., 1990) e representados graficamente por um dendrograma (NTSYS-pc, versão 1.8, Exeter Software, Setauket, N. Y.). Três análises foram realizadas: (i) análise dos perfis dos isolados do solo da rizosfera, raízes lavadas e raízes esterilizadas, (ii) dos perfis dos isolados do solo da rizosfera e das raízes lavadas somente e (iii) análise exclusiva dos perfis dos isolados das raízes esterilizadas. Para se estimar a capacidade do dendrograma em reproduzir satisfatoriamente a matriz de similaridade, uma matriz cofenética foi calculada e comparada com a matriz de similaridade original. A correlação observada foi expressa pelo coeficiente de correlação cofenético (r), que nada mais é do que estatística Z do teste de Mantel

normalizada. Testes de significância foram realizados através da comparação dos valores observados de Z com a sua distribuição, determinada por 5000 permutações aleatórias realizadas, e a determinação da probabilidade de que estes valores sejam superiores ou iguais aqueles observados. A reprodutibilidade do agrupamento dos 71 isolados foi verificada através de comparações com outras classificações por diferentes métodos e matrizes, calculadas por diferentes coeficientes. As diferentes combinações de procedimentos de agrupamento e coeficientes compreenderam os métodos das médias das distâncias, de ligação simples e ligação completa (Bussab et al. , 1990) e os coeficientes de Sorensen, Jaccard, Ochiai e distância Euclideana (Digby & Kempton, 1987) (figura 7).

4.6- Análise da Variância Molecular (AMOVA)

Uma matriz de distância entre os isolados foi calculada a partir da matriz binária de dados originais. A medida de distância adotada foi a métrica Euclideana ($([\delta_{xy}]^2)$) de Excoffier et al. (1992) definida aqui como o quadrado da distância Euclideana para características binárias (δ_{xy}), onde $[\delta_{xy}]^2 = n - n_{xy}$, $[\delta_{xy}]^2$ sendo a distância entre os indivíduos x e y, n o número total de sítios de restrição e n_{xy} o número de fragmentos compartilhados por ambos os indivíduos. A abordagem hierárquica implícita na Análise Molecular da Variância (AMOVA) (tabela 3) (Excoffier et al., 1992) foi utilizada para (a) decompor a variação genética total em

três níveis (entre indivíduos dentro de populações, entre populações dentro de determinado grupo e entre grupos), e (b) para estimar os componentes da variância de interesse. Em nosso estudo a variação genética total foi decomposta (i) entre isolados dentro de cada espécie vegetal, entre espécies vegetais dentro de cada tipo de solo e entre tipos de solo (análise 1), (ii) entre isolados do solo da rizosfera e raízes lavadas dentro de cada espécie vegetal, entre espécies vegetais dentro de cada tipo de solo e entre tipos de solo (análise 2) (iii) entre isolados do solo da rizosfera e raízes lavadas dentro de cada espécie vegetal e entre espécies vegetais dentro de cada tipo de solo (análises 3 e 4), (iv) entre isolados das raízes esterilizadas dentro de cada espécie, entre as espécies e entre tipos de solo (análise 5), (v) entre isolados das raízes esterilizadas dentro de cada espécie vegetal, entre espécies vegetais dentro de cada tipo de solo e entre solos (análises 6 e 7) e (vi) entre isolados dentro dos grupos, evidenciados pelas análises de agrupamentos, e entre estes grupos (análise 8) (tabela 6). Os níveis de significância das estimativas dos componentes da variância foram computados por procedimentos permutacionais não paramétricos. Todas as análises foram realizadas pelo programa AMOVA versão 1.55 fornecido por Laurent Excoffier (excoffie@sc2a.unige.ch - Laboratório de Genética e Biometria, Universidade de Genebra, Suíça).

Tabela 3: Estrutura geral da análise hierárquica da variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992).

Fonte de Variação	GL	QMD	Esperança do QMD
Entre grupos	$G - 1$	QMD (eg)	$\sigma_c^2 + n' \sigma_b^2 + n'' \sigma_a^2$
Entre populações dentro de grupos	$\sum_{g=1}^G l_g - G$	QMD (ep/dg)	$\sigma_c^2 + n \sigma_b^2$
Entre indivíduos dentro de populações	$N - \sum_{g=1}^G l_g$	QMD (dp)	σ_c^2
Total	$N - 1$		

GL: graus de liberdade. QMD: quadrado médio dos desvios. G: número de grupos. g: g-ésimo grupo. l_g : número de populações. N: número total de indivíduos. n, n', n'': coeficientes que representam o tamanho médio das amostras de um determinado nível hierárquico (vide Excoffier et al. (1992). eg: entre grupos ep/dg: entre populações dentro de grupos dp: entre indivíduos dentro de populações σ_a^2 , σ_b^2 e σ_c^2 : componentes da variância (esperança do quadrado dos desvios) associados aos efeitos de grupos (a), populações (b) e indivíduos (c).

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, procuramos caracterizar a diversidade gênica de isolados de *A. amazonense* coletados do solo da rizosfera, das raízes lavadas e esterilizadas dos três cereais, arroz (C3 milho e sorgo (C4), cultivados em dois solos, Itaguaí e Ecologia, procurando identificar um eventual efeito discriminatório exercido pelo solo e/ou planta. A estratégia de investigação baseou-se (i) nos experimentos de hibridização dot-blot com sondas oligonucleotídicas 23S DNAr grupo-, gênero e espécie-específicas e (ii) nas análises de restrição dos fragmentos intergênicos 16S-23S DNAr (IGS) amplificados. Os resultados gerados pelas restrições foram posteriormente analisados através das metodologias de agrupamento e de análise da variância molecular (AMOVA).

Dos setenta e dois isolados de *A. amazonense* listados anteriormente, sessenta e cinco foram utilizados nos experimentos de hibridização e tiveram suas identidades parcialmente confirmadas. Em princípio, todos os isolados pertencem

à subdivisão a das Proteobacteria e ao gênero *Azopirillum* pois seus fragmentos 23S DNAr apresentaram sinais de hibridização com as sondas EUB 1440 e AZO 23S (embora a intensidade dos sinais de hibridização de diversos isolados tenham sido variáveis) (figuras 1A e 1B). Os controles negativos das amplificações, por sua vez, hibridizaram com a sonda EUB 1440; não apresentaram, entretanto, sinais de hibridização com a sonda gênero-específica, AZO 23S (figuras 1A e 1B). Foi surpreendente o fato de somente 19 dos isolados terem sido identificados como *A. amazonense* (figura 2), pois anteriormnte tinham sido caracterizados fenotipicamente como membros desta espécie (Baldani, 1984). O padrão de distribuição destes 19 isolados foi também bastante peculiar. Nada menos do que 17 fragmentos pertenceram aos isolados do solo Ecologia 8, em sua maioria, aos isolados de sorgo (figura 2 e tabela 4). Estes resultados, aliados ao fato da sonda espécie-específica ter se originado da seqüência da estirpe de referência Y2, por sua vez isolada do solo Ecologia (Baldani, comunicação pessoal), sugerem que o padrão de hibridização existente poderia estar aparente- e parcialmente associado ao tipo de solo. Entretanto, uma questão ainda permanece: os isolados não identificados por hibridização pertenceriam à espécie *A. amazonense*? Kirchhof (comunicação pessoal) observou anteriormente um comportamento semelhante com a estirpe de referência de *A. amazonense*, Y6. Em experimentos de hibridização, o DNA desta estirpe, comprovadamente pertencente à espécie, não apresentou um sinal positivo com a sonda AA 23S, desenhada para a identificação específica de estirpes de *A. amazonense*. Em estudos complementares, quatro

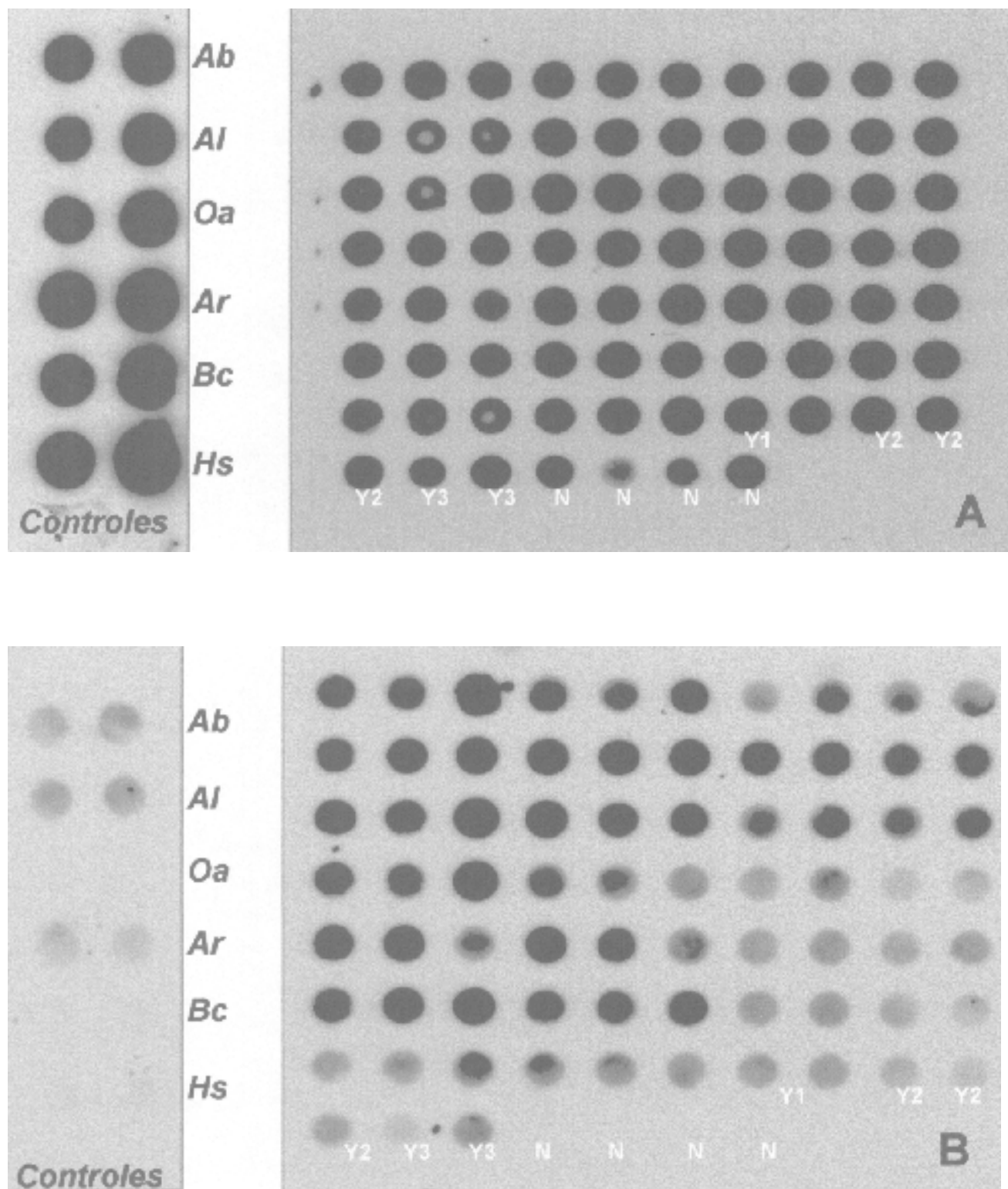


Figura 1: Hibridizações *dot-blot* da região 23S DNAr amplificada dos isolados de *A. amazonense* com as sondas EUB 1440 e AZO 23S. **A:** Sinais de hibridização com a sonda EUB 1440, específica para a divisão α das Proteobacteria. **B:** Sinais de hibridização com a sonda AZO 23S, específica para o gênero *Azospirillum*. Y1, Y2 e Y3: estirpes tipo e de referência. N: controles negativos das amplificações. Controles: *Ab*: *A. brasilense*; *Al*: *A. lipoferum*; *Oa*: *Ochrobactrum anthropi*; *Ar*: *Agrobacterium rubi*; *Bc*: *Burkholderia cepacia*; *Hs*: *Herbaspirillum seropedicae*.

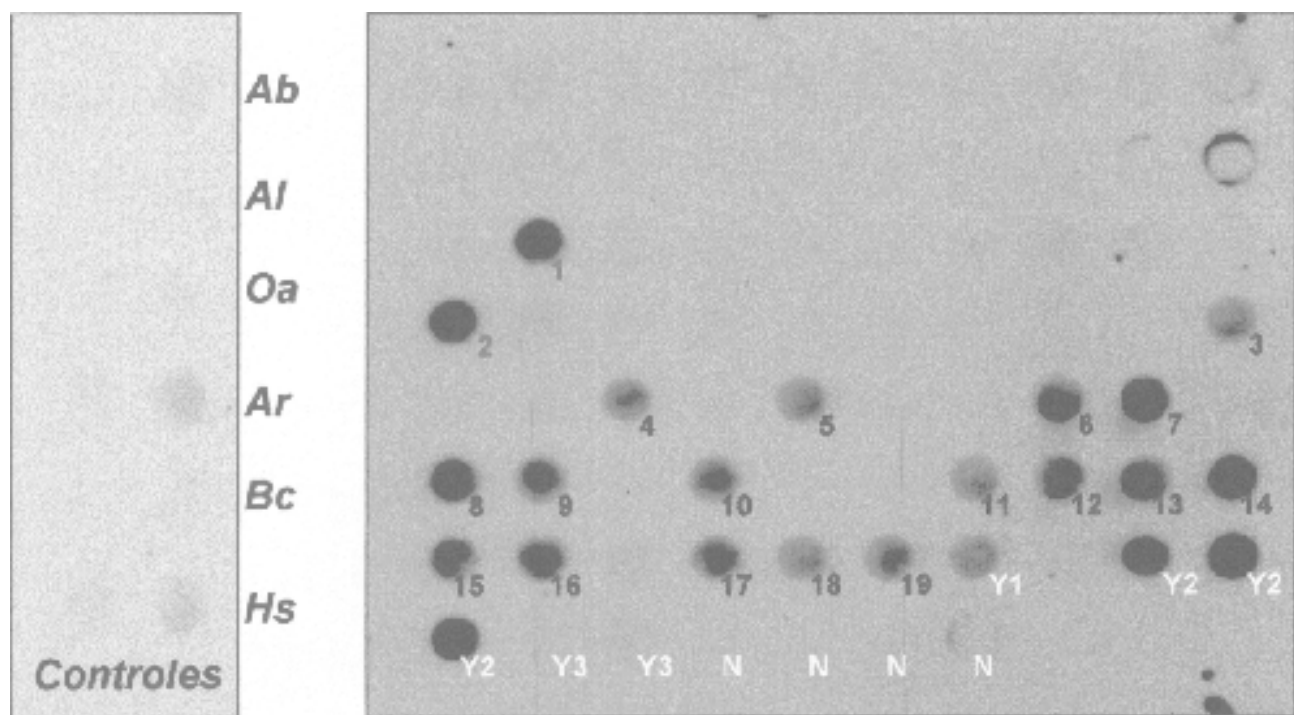


Figura 2: Hibridização *dot-blot* da região 23S DNAr amplificada dos isolados de *A. amazonense* com a sonda AA 23S, específica para a espécie. Os isolados foram coletados do solo da rizosfera, raízes lavadas e esterilizadas de arroz, sorgo e milho, cultivados em dois solos distintos, Itaguaí (números em vermelho) e Ecologia (números em preto). 1: Ya47; 2: Ys41; 3: EYm97; 4: EYm61; 5: EYm15; 6: EYa37; 7: EYa13; 8: EYa90; 9: EYa44; 10: EYa18; 11: Eys37; 12: EysS-14; 13: Eys89; 14: EysS-2; 15: Eys43; 16: Eys12; 17: Eys66; 18: Eys87; 19: Eys85. Y1, Y2 e Y3: estirpes tipo e de referência. N: controles negativos das amplificações. Controles: Ab: *A. brasilense*; Al: *A. lipoferum*; Oa: *Ochrobactrum antropi*; Ar: *Agrobacterium rubi*; Bc: *Burkholderia cepacia*; Hs: *Herbaspirillum seropedicae*.

Tabela 4: Origem dos isolados de *A. amazonense* utilizados nos experimentos de hibridização com a sonda AA 23S, específica para a espécie. Os isolados, cujos fragmentos intergênicos apresentaram sinais de hibridização, estão marcados em vermelho.

Tabela 4: Origem dos isolados de *A. amazonense* utilizados nos experimentos de hibridização com a sonda AA 23S, específica para a espécie. Os isolados, cujos fragmentos intergênicos apresentaram sinais de hibridização, estão marcados em vermelho.

Tipo de Solo	Amostras											
	Arroz (C_3)				Milho (C_4)				Sorgo (C_4)			
	Rizo	Lav	Est	Est [†]	Rizo	Lav	Est	Est [†]	Rizo	Lav	Est	Est [†]
Itaguaí	Ya64	Ya9	Ya20	Ya14	Ym6	Ym4	Ym5	Ym9	Ys6	Ys5	Ys14	Ys17
	Ya76	Ya39	Ya47	Ya56	Ym10	Ym11	Ym12a	Ym49	Ys45	Ys47	Ys38	Ys34
	Ya80	Ya95	Ya92	Ya74	Ym14a	Ym54	Ym56	Ym12r	Ys58	Ys65	Ys32	—
Ecologia	—	—	—	—	—	Ym69	—	—	—	—	Ys69	—
	EYa37	EYa13	—	EYa18	—	EYm42	EYm61	EYm15	EYs37	EysS-2	EYs12	—
	—	EYa68	EYa44	EYa73	EYm92	EYm72	EYm13	EYm88	EysS1	EYs43	EYa66	EYs85
	—	EYa90	Eya75	EYa88	EYm97	—	—	EYm95	EYs89	—	EYs90	EYs87

Rizo: solo da rizosfera. Lav: raízes lavadas. Est: Raízes esterilizadas em cloramina-T 1%, segundo metodologia descrita por Baldani (1984). Os tempos de esterilização foram de 5 min. para milho e sorgo e 1 min. para arroz. Est[†]: Raízes esterilizadas. Os tempos de esterilização foram de 60 min. para milho, 30 min. para sorgo e 15 min. para arroz.

dos isolados que não hibridizaram com a sonda, três do solo Itaguaí (Ym 5, Ya 56 e Ys 69) e um do solo Ecologia (EYa 22), foram analisados fenotípica- (padrões de utilização de substratos de carbono) e genotipicamente (% de G+C e determinação das seqüências da região variável dos genes 23S ribossomais). Os resultados não evidenciaram qualquer diferença significativa em relação às estirpes tipo e de referência, Y1 e Y6 (Kirchhof, dados não apresentados). Através de procedimentos estatísticos adequados, baseados nas análises de utilização de substratos de carbono, estes 4 isolados foram agrupados juntamente com a estirpe Y1 em um único grupo discreto e similar. As porcentagens de G+C destes 4 isolados foram também, assim como a estirpe tipo Y 1, muito similares, oscilando entre 65,5 e 69,5%. As seqüências das regiões hipervariáveis, por sua vez, não apresentaram aparentemente diferenças significativas entre si e em relação às estirpes de referência e tipo (Kirchhof, dados não apresentados). Um último experimento de hibridização, desta vez com a sonda específica para *A. irakense*, Al 23S, foi realizado (resultados não apresentados). Por apresentarem similaridades consideráveis (Dekhil et al., 1997, com base nas análises das seqüências 16S rDNA), os isolados poderiam ter sido, quando coletados (em 1962 - Baldani, 1984) erroneamente identificados como *A. amazonense*. Entretanto, nenhum fragmento dos isolados apresentou um sinal positivo de hibridização com a sonda específica para *A. irakense*, o que descarta definitivamente aquela possibilidade. Baseado nos resultados, poderíamos levantar a hipótese de que todos os isolados pertencem à espécie *A. amazonense*. Permanece ainda uma outra questão: porque então os fragmentos dos 48 isolados aparentemente

pertencentes à espécie *A. amazonense* não hibridizaram com a sonda espécie-específica? Seriam as seqüências dos genes ribossomais destes isolados suficientemente distintas para poder justificar a existência de fragmentos que hibridizam e outros que não? Os resultados obtidos através das análises comparativas das seqüências hipervariáveis 23S DNAr dos 4 isolados, cujos fragmentos não hibridizaram, desta vez, não nos trouxeram esclarecimentos adicionais. Três destes isolados (Ym 5, EYa 22 e Ys 69) apresentaram a seqüência reconhecida pela sonda específica (5'-GTGTGCCATGGAGGTGT-3'), o que não era esperado. O quarto (Ya 56) apresentou uma estrutura primária levemente distinta, idêntica, por sua vez, àquela observada na estirpe Y6 (5'-GTGTGCCATAGAGGCGT-3') (Kirchhof, dados não apresentados). Nós não possuímos uma explicação plausível para a não hibridização desses 3 isolados que possuem a seqüência reconhecida pela sonda espécie-específica. A possibilidade de existência de um outro fator determinante para a ocorrência de hibridização (que não exclusivamente a presença, na bactéria, de uma seqüência reconhecida pela sonda) não deve ser descartada e deverá ser objeto de investigações futuras. Os resultados obtidos evidenciam também as limitações e inconveniências do método utilizado: a sonda AA 23S, desenvolvida por Kirchhof & Hartmann (1992) e específica para a espécie, não foi capaz de identificar todas as variantes da espécie *A. amazonense* existentes. A possibilidade de que este grupo de isolados represente uma subespécie de *A. amazonense* também não deve ser descartada. Experimentos de hibridização DNA-DNA e o seqüenciamento completo dos genes 16S DNAr deverão fornecer subsídios

adicionais para o esclarecimento das diferenças observadas.

A amplificação da região intergênica dos 71 isolados utilizados nas análises de restrição deu origem a 3 fragmentos característicos de aproximadamente 1000 a 1300 pares de base (pb) (figura 3A). Dois destes fragmentos de aproximadamente 1000 pb foram intensamente amplificados e observados prontamente quando separados por eletroforese em gel de agarose. Por sua vez, as 7 enzimas utilizadas, seis de cortes freqüentes (HaeIII, AluI, MspI, RsaI, CfoI e TaqI) e uma de corte raro (EcoRI), geraram 110 bandas polimórficas, em um total de 120 bandas, e 52 perfis de restrição distintos. CfoI produziu o maior número de bandas polimórficas (23) (figura 3B), seguida pelas enzimas RsaI (18) (figura 4A), MspI (18) (figura 4B), HaeIII (16) (figura 5A), AluI (16) (figura 5B), TaqI (10) (figura 6A) e EcoRI (9) (figura 6B). CfoI apresentou também o maior poder discriminatório, gerando 28 perfis de restrição distintos, seguida pelas enzimas MspI(19), RsaI(18), AluI (18), HaeIII(13), TaqI (12) e EcoRI (11).

Através de metodologias de agrupamento, procuramos evidenciar a existência de grupos associados aos sítios de origem dos isolados. De início, procuramos checar a robustez dos agrupamentos através de duas abordagens. A primeira, procurando exprimir a capacidade de reprodução da estrutura original da matriz, definiu os valores de F 0,93, 0,92 e 0,92 para as 3 matrizes cofenéticas analisadas (dados não apresentados). Estes resultados evidenciam um ótimo ajuste dos dendrogramas às matrizes de similaridade originais. A segunda abordagem procurou avaliar a reprodutibilidade do dendrograma (análise dos 71 isolados do solo da rizosfera, raízes lavadas e esterilizadas) gerado pelo método

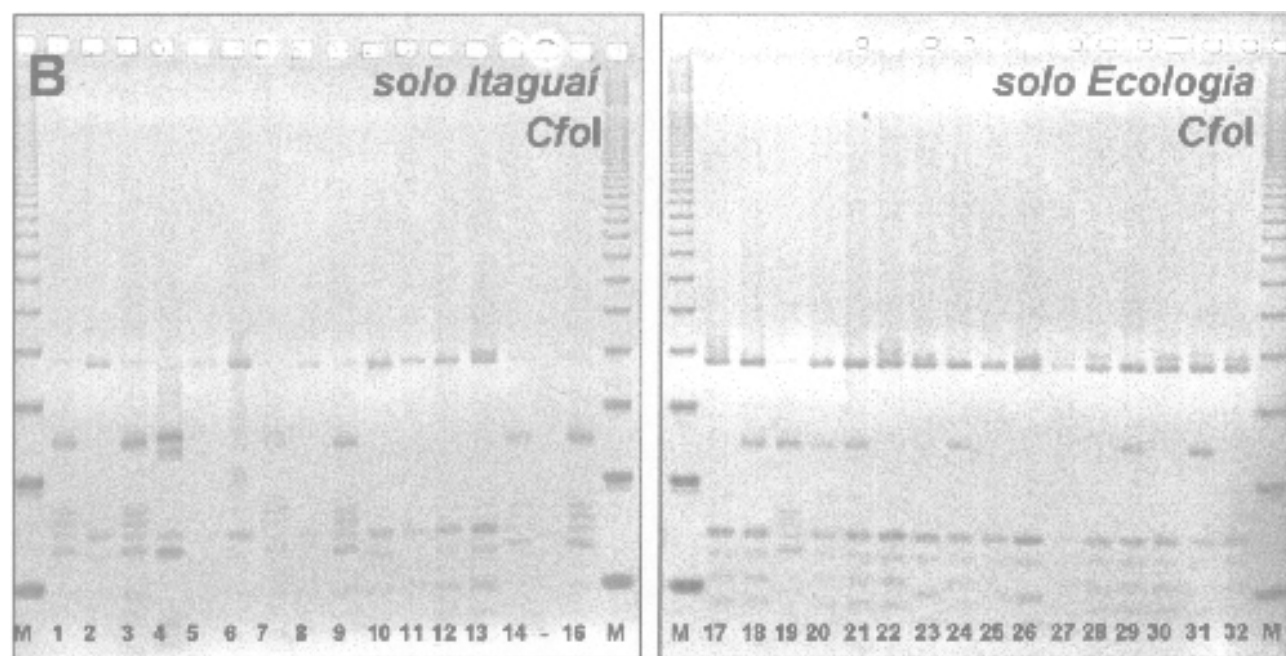
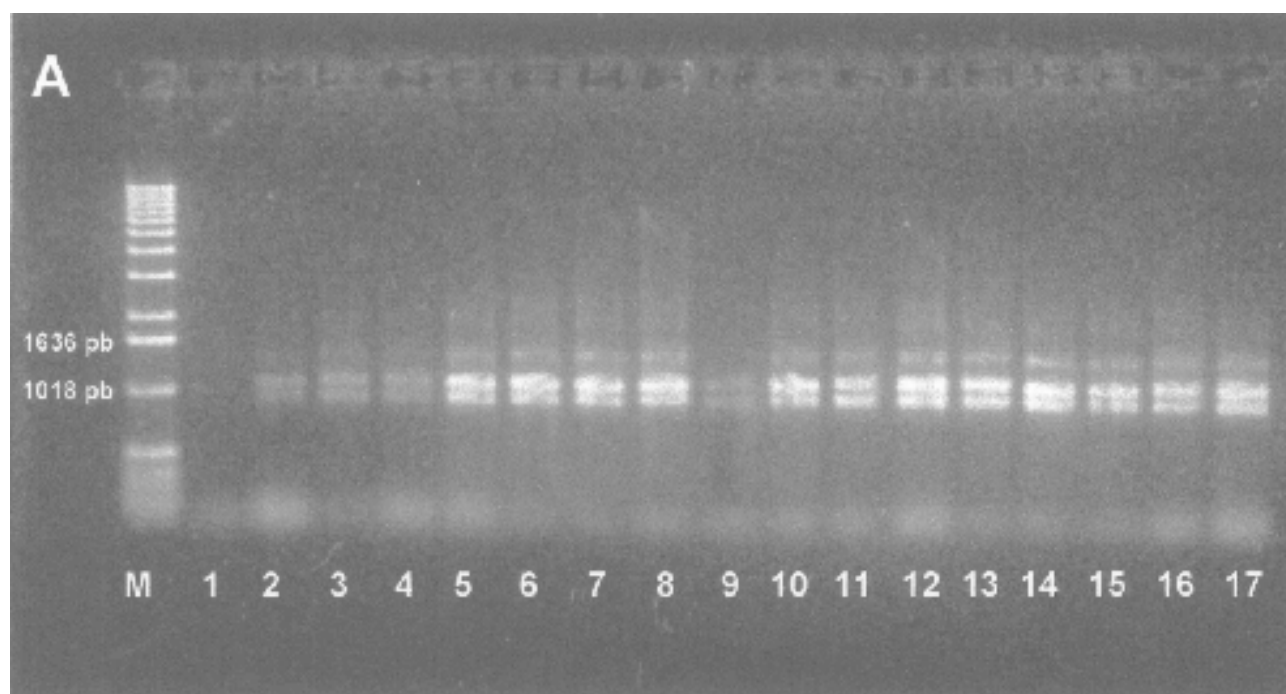


Figura 3: Perfis de amplificação e restrição (gerados pela enzima *Cfol*) dos fragmentos intergênicos 16S-23S DNAr dos isolados de *A. amazonense*. **A:** Padrões de amplificação. Linha 1: controle negativo; linha 2: controle positivo; linhas 3 a 10: isolados do solo Itaguaí; linhas 11 a 17: isolados do solo Ecologia. **B:** Perfis gerados pela enzima *Cfol*. Linhas 1 a 13: isolados de milho/solo Itaguaí; linhas 14 a 16: isolados de arroz/solo Itaguaí; linhas 17 a 27: isolados de arroz/solo Ecologia; isolados 28 a 32: isolados de sorgo/solo Ecologia. M: marcadores moleculares 1 kb e 123 bp ladder nas figuras 3A e 3B, respectivamente.

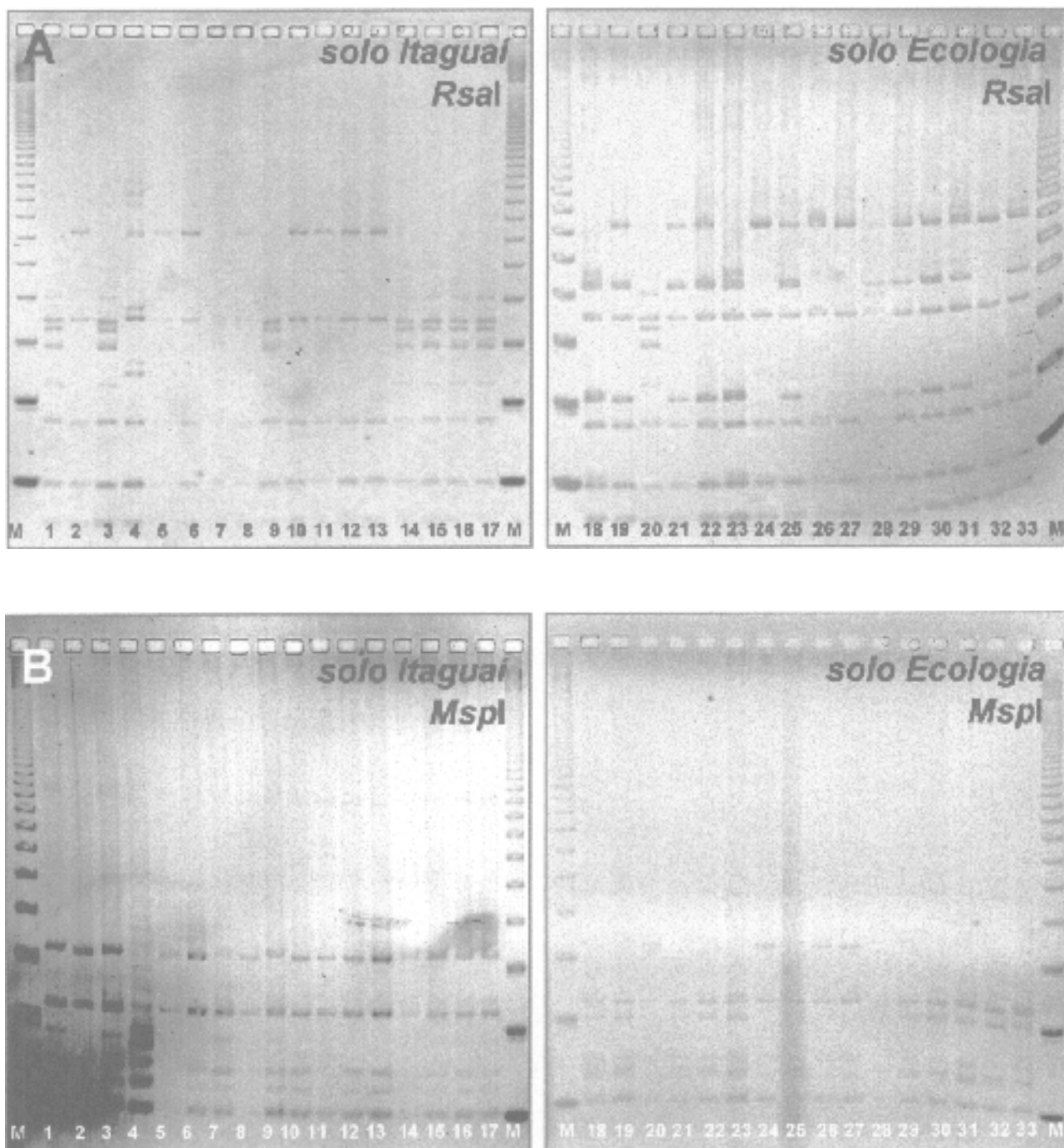


Figura 4: Perfis de restrição dos fragmentos intergênicos 16S-23S DNAr dos isolados de *A. amazonense* gerados pelas enzimas *RsaI* e *MspI*. **A:** Perfis gerados pela enzima *RsaI*. **B:** Perfis gerados pela enzima *MspI*. Linhas 1 a 13: isolados de milho/solo Itaguaí; linhas 14 a 17: isolados de arroz/solo Itaguaí; linhas 18 a 28: isolados de arroz/solo Ecologia; isolados 29 a 33: isolados de sorgo/solo Ecologia. M: marcador molecular 123 bp ladder.

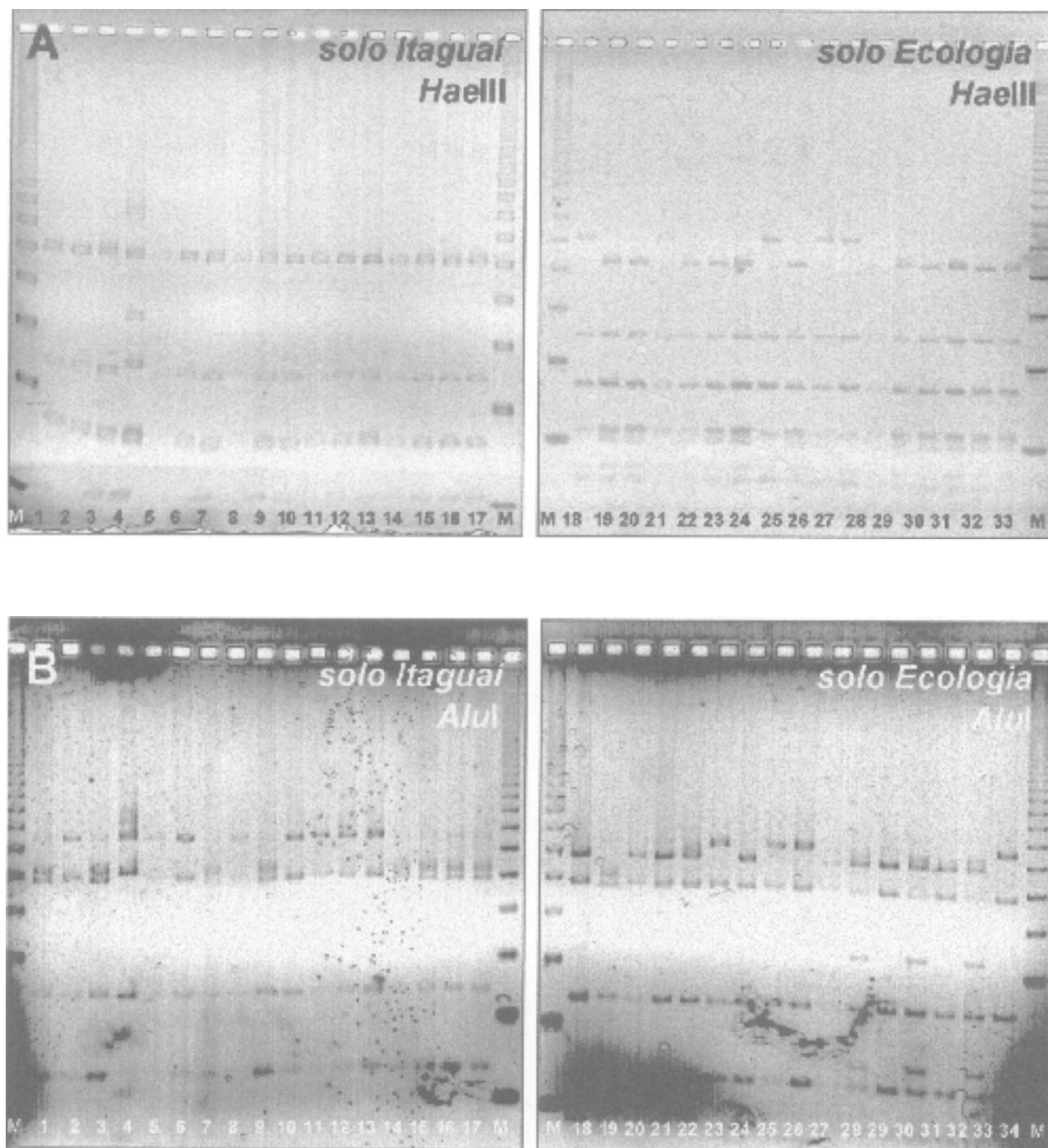


Figura 5: Perfis de restrição dos fragmentos intergênicos 16S-23S DNAr dos isolados de *A. amazonense* gerados pelas enzimas *HaeIII* e *AluI*. **A:** Perfis gerados pela enzima *HaeIII*. **B:** Perfis gerados pela enzima *AluI*. Linhas 1 a 13: isolados de milho/solo Itaguaí; linhas 14 a 17: isolados de arroz/solo Itaguaí; linhas 18 a 28: isolados de arroz/solo Ecologia; isolados 29 a 34: isolados de sorgo/solo Ecologia. M: marcador molecular 123 bp ladder.

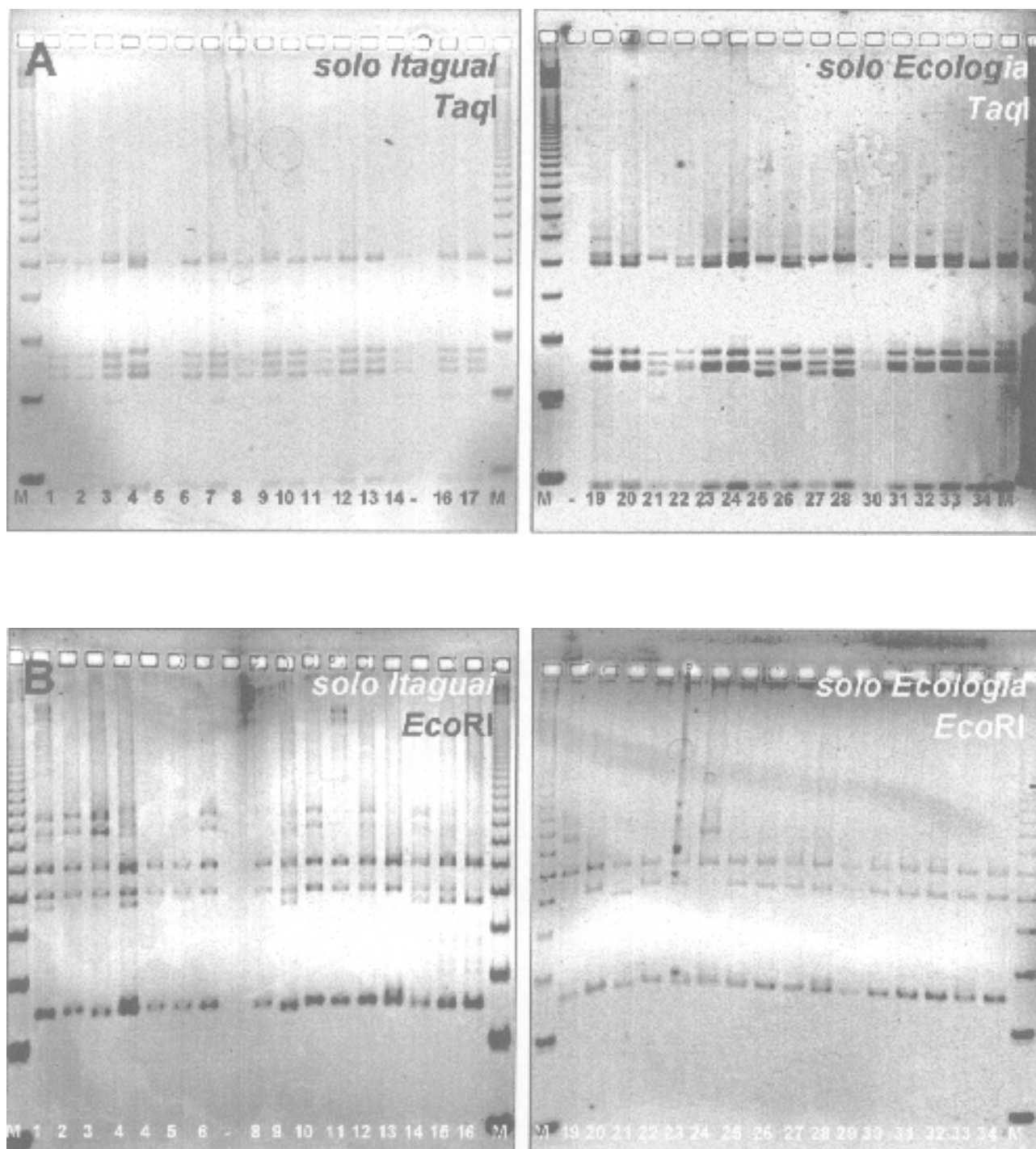


Figura 6: Perfis de restrição dos fragmentos intergênicos 16S-23S DNAr dos isolados de *A. amazonense* gerados pelas enzimas *TaqI* e *EcoRI*. **A:** Perfis gerados pela enzima *TaqI*. **B:** Perfis gerados pela enzima *EcoRI*. Linhas 1 a 13: isolados de milho/solo Itaguaí; linhas 14 a 17: isolados de arroz/solo Itaguaí; linhas 19 a 29: isolados de arroz/solo Ecologia; isolados 30 a 34: isolados de sorgo/solo Ecologia. M: marcador molecular 123 bp ladder.

das médias das distâncias/coeficiente de Sorensen, comparando-o com distintas classificações produzidas por diferentes métodos e coeficientes. Na figura 7, nota-se que a classificação gerada pelo método das médias das distâncias/coeficiente de Sorensen e representada pelo dendrograma (Figura 7A1) é topologicamente muito semelhante aos outros agrupamentos produzidos (figura 7A2 a D3). Se observarmos a estrutura do dendrograma (figura 7A1), notamos de imediato a existência de quatro ramificações (grupos) formados no nível de 0,78 de similaridade. Tais ramificações e seus respectivos isolados são observados quase que inalteradamente nos demais dendrogramas (figura 7A2 a D3), o que evidencia a robustez e reprodutibilidade da classificação observada.

A análise dos isolados coletados tanto do solo da rizosfera + raízes lavadas quanto das raízes esterilizadas, por sua vez, revelou a existência de 5 grupos (4 grupos bem distintos, I, II, III e IV, e um quinto, V, formado por um único isolado) predominantes e evidentes, formados a 78% de similaridade (figuras 8 e 9). Cada grupo apresentou uma grande diversidade de perfis de restrição (grupo I, com 14 isolados apresentou 12 perfis diferentes; grupo II, com 27, apresentou 17; grupo III, com 23, apresentou 19 e grupo IV, com 6 isolados, apresentou 4 perfis distintos). Aparentemente a estrutura populacional de *A. amazonense* é composta por 4 grupos predominantes, geneticamente distintos e discretos, embora razoavelmente heterogêneos. Este comportamento evidencia, no nível intraespecífico, uma grande diversidade genética entre os isolados - o que reforça as observações de Lopez-Reyes et al. (1998) e Rosado et al. (1998), que, de maneira similar, foram capazes de observar uma grande heterogeneidade

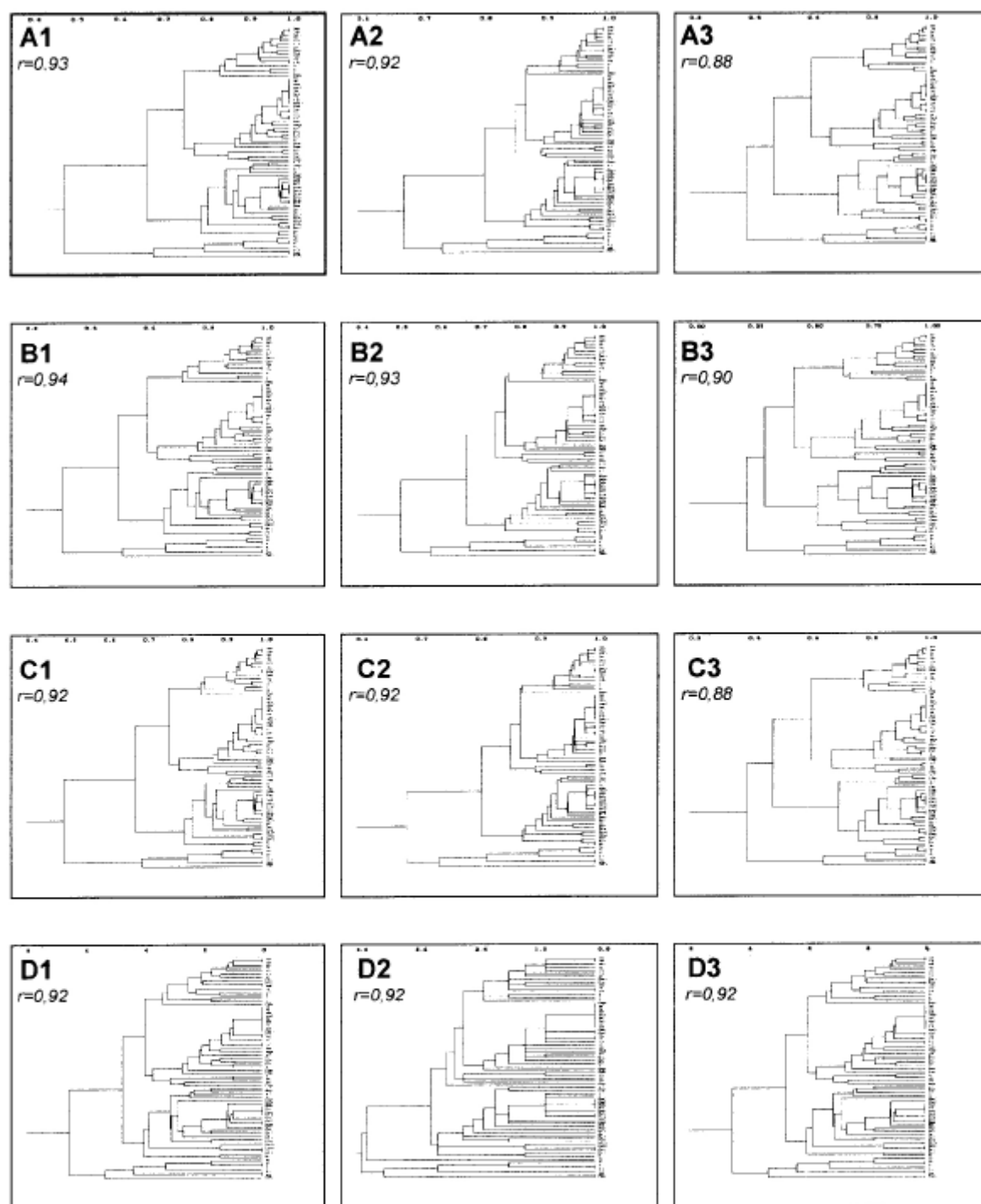


Figura 7: Reprodutibilidade dos agrupamentos dos isolados de *A. amazonense* gerados pelas diferentes combinações de coeficientes e métodos de agrupamento. A: coeficiente de Sorensen; B: coeficiente de Jaccard; C: coeficiente de Occhial; D: distância Euclideana. 1: método das médias das distâncias; 2: método da ligação simples; 3: método da ligação completa. r : coeficiente de correlação cofenética. O nível de significância de r em todos os agrupamentos foi de 0,0004.

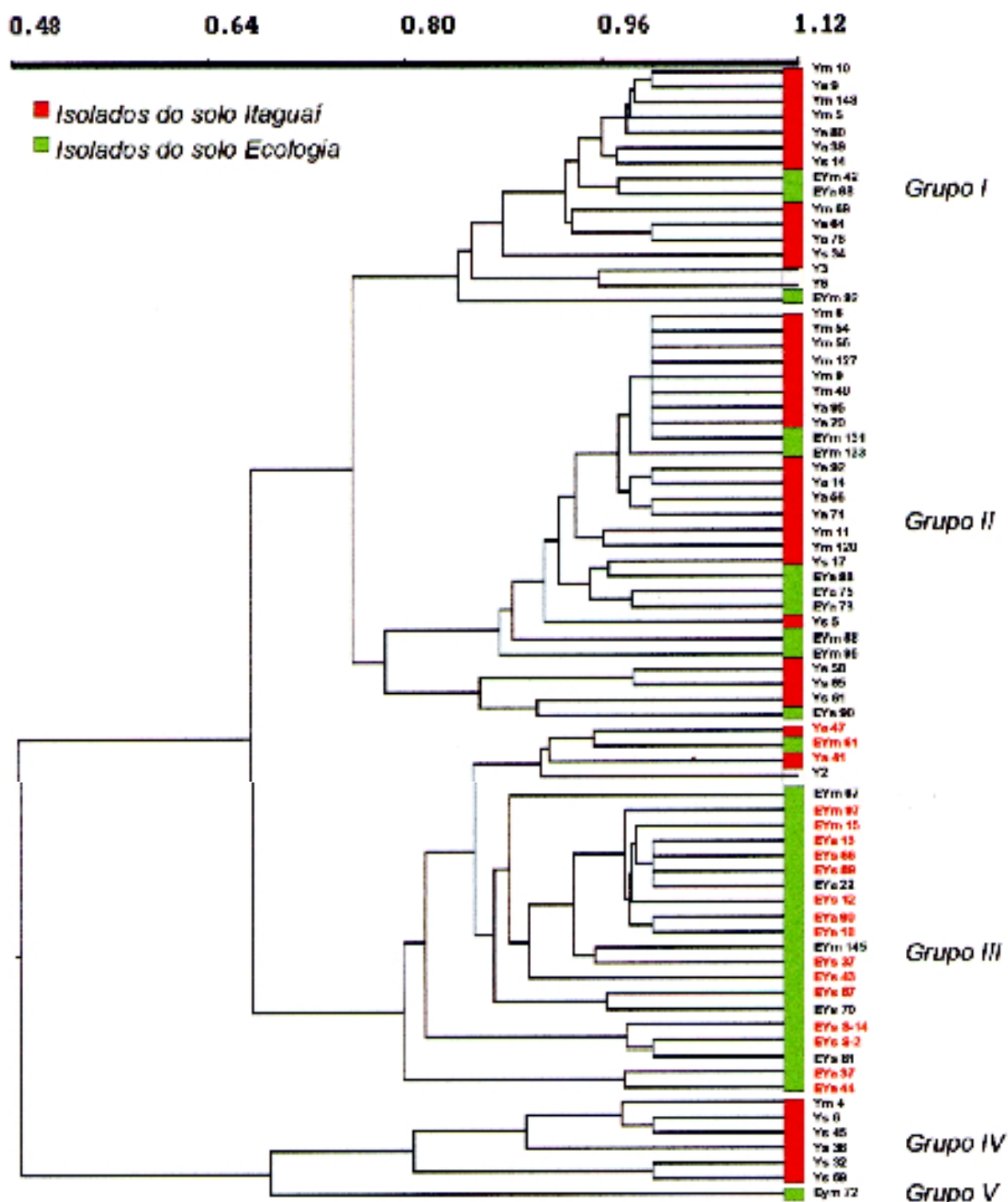


Figura 8: Dendrograma de similaridade dos 71 isolados de *A. amazonense* coletados do solo da rizosfera, raízes lavadas e esterilizadas, evidenciando os solos de origem e os grupos formados no nível de similaridade aproximado de 78% (0,78) (I a V). O dendrograma foi gerado pelo método das médias das distâncias/coeficiente de Sorensen ($r= 0,93$; $p=0,0004$). Algarismos em vermelho: isolados, cujos fragmentos 23S DNAr apresentaram sinal de hibridização com a sonda AA 23S. Escala: similaridade em decimal. Y2, Y3 e Y6: estirpes de referência.

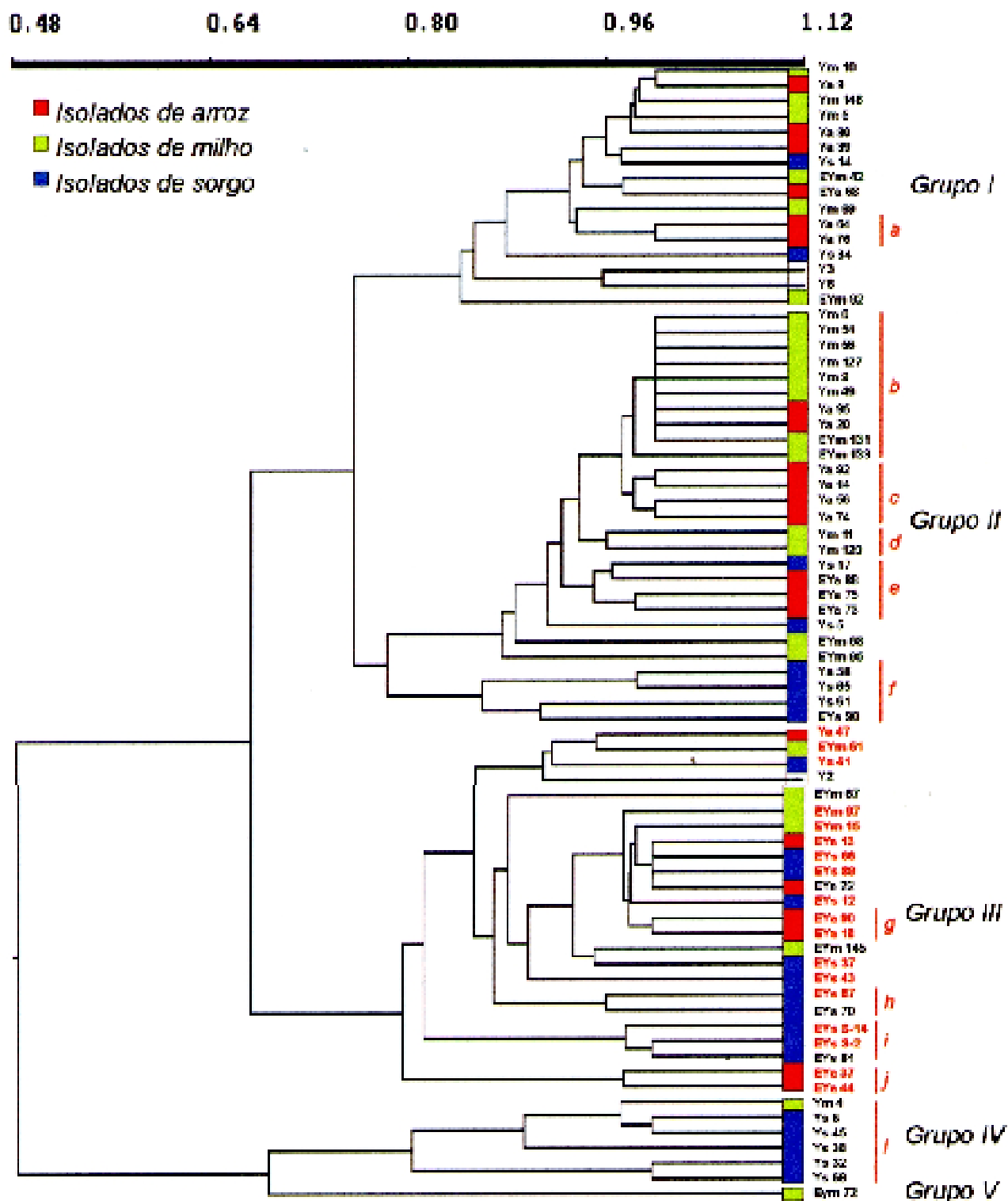


Figura 9: Dendrograma de similaridade dos 71 isolados de *A. amazonense* coletados do solo da rizosfera, raízes lavadas e esterilizadas, evidenciando as plantas de origem e os grupos formados no nível de similaridade aproximado de 78% (0,78) (I a V). Onze grupos contendo exclusiva- (grupos a, c, d, g, h, i e j) e predominantemente (grupos b, e, f e l) isolados de mesma origem (mesmo solo e mesma planta) e que foram formados em diferentes níveis de similaridade também estão em destaque. O dendrograma foi gerado pelo método das médias das distâncias/coeficiente de Sorensen ($r=0,93$; $p=0,0004$). Algarismos em vermelho: isolados, cujos fragmentos 23S DNAr apresentaram sinal de hibridização com a sonda AA 23S. Escala: similaridade em decimal. Y2, Y3 e Y6: estirpes de referência.

genética entre isolados de *A. brasilense* (coletadas da rizosfera, rizoplane e interior radicular de cana-de-açúcar) e isolados de *Paenibacillus azotofixans* (coletadas da rizosfera e rizoplane de diversas gramíneas), respectivamente. Não obstante, Lopez-Reyes et al. (1998) sugerem, com base nas semelhanças entre os perfis eletroforéticos de alguns isolados utilizados naquele e em outros estudos, que a estrutura genética de *A. brasilense* seja de natureza clonal. A grande diversidade observada em nosso trabalho e a inexistência de informações adicionais sobre os padrões da diversidade populacional de *A. amazonense* não nos permitem, entretanto, considerar a hipótese de clonalidade, ao menos para esta espécie. É possível que os padrões genotípicos extremamente diversos dos isolados de *A. amazonense* pudessem ser um reflexo da elevada capacidade de sobrevivência e de colonização da espécie (encontrada em diversos ambientes e em diversos hospedeiros). Mais além as alterações no genoma bacteriano, a recombinação e os processos naturais seletivos e evolutivos poderiam também ser responsáveis pela grande diversidade observada.

O que nos chamou a atenção, entretanto, foi a distribuição dos isolados, cujos fragmentos 23S DNAr hibridizaram com a sonda específica de *A. amazonense*. Todos, sem exceção (salvo o isolado EYs 85, que não foi utilizado nas análises de restrição), foram agrupados em um único grupo (III) (figuras 8 e 9). Cinco isolados contidos neste grupo não foram, por sua vez, utilizados nos experimentos de hibridização (EYm 87, EYa 22, EYm 145, EYs 70 e EYs 81). Estes resultados reforçam aqueles obtidos anteriormente nos experimentos de hibridização e confirmam, ao menos parcialmente, a tese dos 4 grupos

geneticamente distintos. É possível que esta estrutura de diversidade característica seja o reflexo de adaptações funcionais e evolutivas dos isolados a diferentes condições ambientais adversas. De fato, Kirchhof (comunicação pessoal) atribui a existência dos 4 grupos distintos à ocorrência de processos ecológicos seletivos.

Algumas associações entre os 4 grupos predominantes e o solo e a planta de origem dos isolados foram estabelecidas (figuras 8, 9 e tabela 5) e nos permitiram observar alguns indícios da influência discriminatória exercida pelo solo e, em menor escala, pela planta. Três grupos continham predominante- e exclusivamente isolados do solo Itaguaí (I, II e IV, com respectivamente 79, 70 e 100%) e o quarto (III), reproduzindo o comportamento observado nos experimentos de hibridização, continha quase que exclusivamente isolados do solo Ecologia (91% de 23 isolados) (figura 8 e tabela 5). A população de isolados do solo Itaguaí é composta em sua maioria por representantes dos grupos I, II e IV e a do solo Ecologia quase que integralmente por isolados do grupo III e, em menor intensidade, por representantes dos dois primeiros grupos. Estes resultados evidenciam uma nítida influência exercida pelo tipo de solo sobre a diversidade gênica dos isolados e que poderia ser atribuída às diferentes características ambientais (químicas, físicas e biológicas) de ambos os solos. De fato, Latour et al. (1996) foram capazes de demonstrar uma intensa influência exercida pelo tipo de solo sobre a estrutura populacional de isolados de *Pseudomonas* do tipo fluorescente coletados da região radicular de linho e tomate, sugerindo que as diferentes características ambientais existentes poderiam ser as

Tabela 5: Frequência dos isolados contidos em cada grupo de similaridade. Os algarismos representam o número de isolados por grupo e sua frequência relativa (em parênteses). Os grupos foram formados no nível de similaridade de 78% (Análise dos isolados *Rizo+Lav+Est+Est**) e 80% (Análise dos isolados *Rizo+Lav* e *Est+Est**).

Origem dos Isolados	Grupos				
<i>Isolados Rizo+Lav+Est+Est*</i>					
	I	II	III	IV	V
<i>Solo Itaguaí</i>	11 (79)	19 (70)	2 (9)	6 (100)	0 (0)
<i>Solo Ecologia</i>	3 (21)	8 (30)	21 (91)	0 (0)	1 (100)
<i>Total</i>	14* (100)	27 (100)	23* (100)	6 (100)	1 (100)
<i>Arroz</i>	6 (43)	9 (33)	7 (30)	0 (0)	0 (0)
<i>Milho</i>	6 (43)	12 (45)	5 (22)	1 (17)	1 (100)
<i>Sorgo</i>	2 (14)	6 (22)	11 (48)	5 (83)	0 (0)
<i>Total</i>	14* (100)	27 (100)	23* (100)	6 (100)	1 (100)
<i>Isolados Rizo+Lav</i>					
	I	II	III	IV	V
<i>Solo Itaguaí</i>	8 (73)	7 (88)	1 (8)	3 (100)	0 (0)
<i>Solo Ecologia</i>	3 (27)	1 (12)	11 (92)	0 (0)	1 (100)
<i>Total</i>	11* (100)	8 (100)	12* (100)	3 (100)	1 (100)
<i>Arroz</i>	6 (55)	1 (12)	3 (25)	0 (0)	0 (0)
<i>Milho</i>	5 (45)	4 (50)	2 (17)	1 (33)	1 (100)
<i>Sorgo</i>	0 (0)	3 (38)	7 (58)	2 (67)	0 (0)
<i>Total</i>	11* (100)	8 (100)	12* (100)	3 (100)	1 (100)
<i>Isolados Est+Est*</i>					
	I	IIa	IIb	III	IV
<i>Solo Itaguaí</i>	3 (100)	11 (65)	1 (50)	1 (9)	3 (100)
<i>Solo Ecologia</i>	0 (0)	6 (35)	1 (50)	10 (91)	0 (0)
<i>Total</i>	3* (100)	17 (100)	2 (100)	11* (100)	3 (100)
<i>Arroz</i>	0 (0)	8 (47)	0 (0)	4 (36)	0 (0)
<i>Milho</i>	1 (33)	8 (47)	0 (0)	3 (28)	0 (0)
<i>Sorgo</i>	2 (67)	1 (6)	2 (100)	4 (36)	3 (100)
<i>Total</i>	3* (100)	17 (100)	2 (100)	11* (100)	3 (100)

*: não incluídas as estirpes tipo e de referência. *Rizo*: isolados do solo da rizosfera, *Lav*: isolados de raízes lavadas. *Est* e *Est**: isolados de raízes esterilizadas.

responsáveis pelo efeito discriminatório observado.

A determinação de associações entre os grupos e as plantas de origem dos isolados, por sua vez, não foi prontamente possível. De fato, a composição dos grupos formados a 78% de similaridade não evidenciou um padrão de distribuição dos isolados/planta característico, que nos permitisse detectar de imediato uma eventual influência exercida pelo tipo de planta (figura 9 e tabela 5). Entretanto, a existência de nada menos do que 11 grupos formados predominante- ou exclusivamente por isolados de mesma origem (mesma planta e solo) (grupos a a l) em diferentes níveis de similaridade nos leva a considerar a possibilidade de existência de um efeito exercido pela planta ou talvez por determinada planta cultivada em determinado solo.

Lopez-Reyes et al. (1998), analisando os padrões enzimáticos de migração eletroforética e os perfis de plasmídeos de estirpes de *A. brasilense* e *Klebsiella pneumoniae*, observaram diferenças nos níveis da diversidade e nos padrões genotípicos das estirpes isoladas do solo + rizoplane e do interior radicular. James & Olivares (1997), citando Bashan & Levanony (1990), Bashan & Holguin (1995), Baldani et al. (1997) e demais autores, por sua vez, sugerem que a colonização do interior radicular por *A. brasilense* é que poderia se dar de maneira estirpe-específica. Em função destas observações, procuramos caracterizar mais precisamente a diversidade e evidenciar mais daramente os eventuais efeitos atribuídos ao tipo de planta, e também ao tipo de solo, analisando separadamente os isolados do solo rizosférico + raízes lavadas (isolados do exterior radicular) e, mais especificamente, os das raízes esterilizadas (isolados do interior radicular). A

análise dos isolados da rizosfera e raízes lavadas, desta vez identificando o solo de origem, reproduziu os resultados observados anteriormente na análise integral (figura 10 e tabela 5). Novamente o solo parece exercer uma influência sobre a diversidade gênica dos isolados, pois, em 3 grupos (I, II e IV), o predomínio de isolados do solo Itaguaí era evidente e, em um quarto (III), os de Ecologia compunham nada menos do que 92% da totalidade (figura 10 e tabela 5). Nenhuma associação entre os grupos predominantes e as plantas de origem pode ser estabelecido (tabela 5). Entretanto, alguns indícios de uma associação entre os agrupamentos e as plantas cultivadas em determinado solo puderam ser observados (figura 11). Os quatro grupos exclusivos, formados em níveis distintos de similaridade e contendo de 2 a 3 isolados (A a D), e os característicos padrões de agrupamento (similaridade superior a 88%) em especial os padrões dos isolados de arroz/Itaguaí e sorgo/Ecologia, sugerem que outros fatores além do simples acaso poderiam estar envolvidos na determinação da estrutura populacional (figura 11). Aparentemente os isolados de mesma origem (especialmente os de arroz/Itaguaí e sorgo/Ecologia) se assemelham muita mais do que seria de se esperar, o que poderia ser um indício da existência de um efeito discriminatório exercido, ao menos parcialmente, por determinadas plantas cultivadas em determinado solo. Lemanceau et al. (1995) e Latour et al. (1996) observaram efeitos semelhantes exercidos pelas plantas de linho e tomate sobre a população de isolados de *Pseudomonas* do tipo fluorescente. A análise dos isolados das raízes esterilizadas não revelou qualquer surpresa ou evidência adicional. De maneira geral, o comportamento observando nas análises anteriores

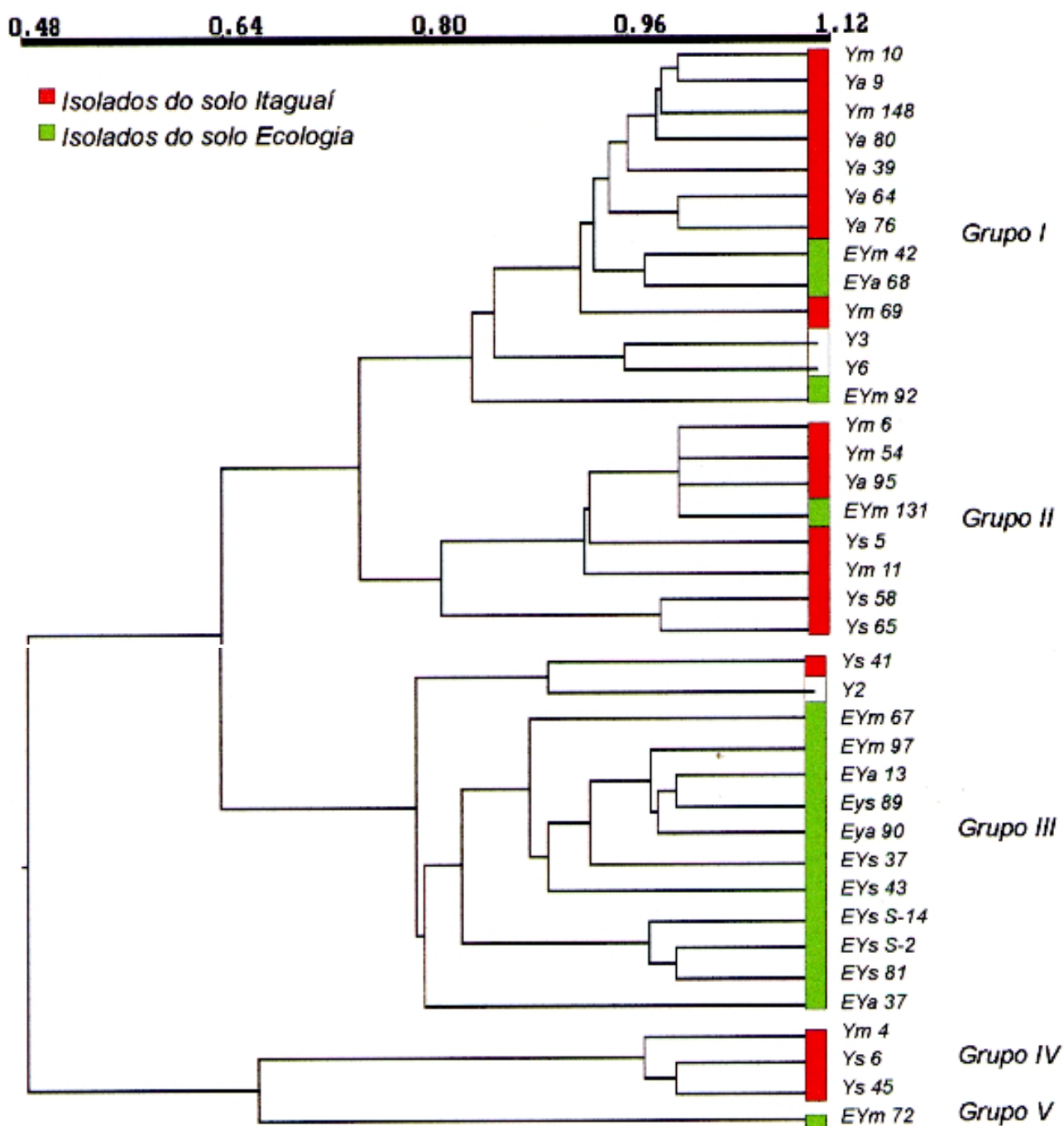


Figura 10: Dendrograma de similaridade dos 35 isolados de *A. amazonense* coletados do solo da rizosfera e das raízes lavadas, evidenciando os solos de origem e os grupos formados no nível de similaridade aproximado de 80% (0,80) (I a V). O dendrograma foi gerado pelo método das médias das distâncias/coeficiente de Sorensen ($r=0,92$; $p=0,0004$). Escala: similaridade em decimal. Y2, Y3 e Y6: estirpes de referência.

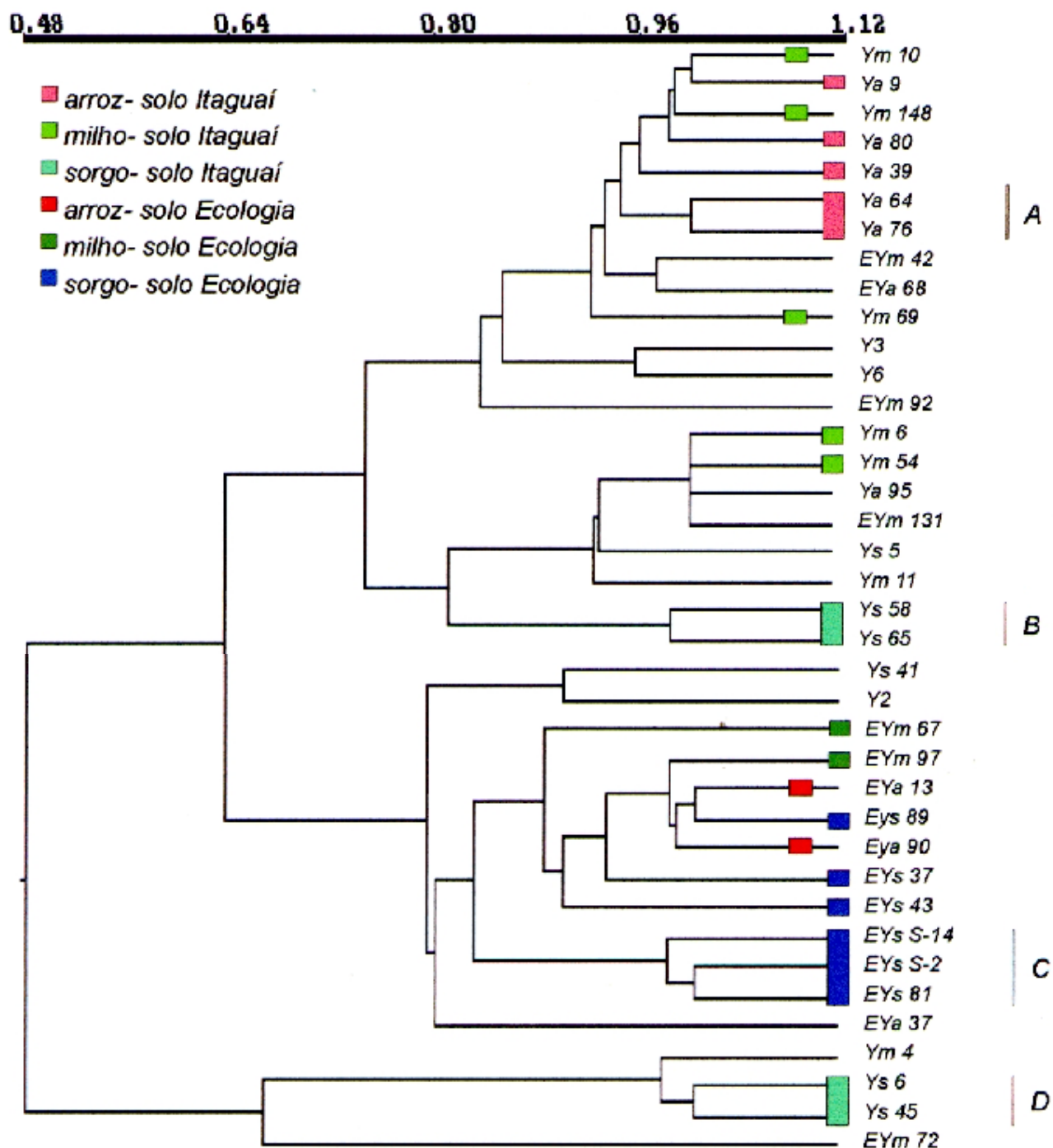


Figura 11: Dendrograma de similaridade dos 35 isolados de *A. amazonense* coletados do solo da rizosfera e das raízes lavadas, evidenciando os isolados de mesma origem que apresentam um grau de similaridade superior a 88% (0,88) e os grupos exclusivos (A a D). Os grupos formados a aproximadamente 80% não estão indicados. O dendrograma foi gerado pelo método das médias das distâncias/coeficiente de Sorensen ($r = 0,92$; $p = 0,0004$). Escala: similaridade em decimal. Y2, Y3 e Y6: estirpes de referência.

se repetiu. Em comparação aos isolados do solo + rizoplano, nenhuma diferença significativa na estrutura (figuras 10 e 12), nos tipos de perfis genotípicos (dados não apresentados) e na diversidade populacional (dados não apresentados) foi detectado. De fato, na análise conjunta dos isolados do interior e exterior radicular (figura 8) nenhum grupo formado exclusivamente (acima de 78% de similaridade) por isolados do interior ou do exterior radicular foi observado. Tampouco, diferenças nos níveis de diversidade foram detectadas, pois tanto os isolados do interior quanto os do exterior radicular apresentaram um número de perfis distintos equivalentes (26 e 27, respectivamente). Lopez-Reyes et al. (1998) entretanto, analisaram algumas *estirpes* de *A. brasilense* e observaram claras diferenças entre os níveis de diversidade e os tipos de perfis genotípicos dos isolados do interior radicular e os do rizoplano e rizosfera. De maneira similar, Lemanceau et al. (1996) e Latour et al. (1996) observaram diferenças significativas entre as características fenotípicas dos isolados de *Pseudomonas* do tipo fluorescente coletados do solo e da região radicular de linho e tomate. Nossos resultados se contrapõem aos de Lopez-Reyes et al. (1998) Lemanceau et al. (1995) e Latour et al. (1996) tomando evidente o efeito não discriminador exercido pelo planta sobre os isolados do interior radicular e da rizosfera + rizoplano. Talvez os mecanismos de penetração radicular, em especial os de penetração através de ferimentos mecânicos e das junções laterais das raízes (Bashan & Levanony, 1990 e James & Olivares, 1997, citando diversos autores) pudessem justificar em parte a inexistência de diferenças significativas entre os isolados do interior e do exterior radicular (Lopez-Reyes et al., 1998). É possível que uma fração considerável dos

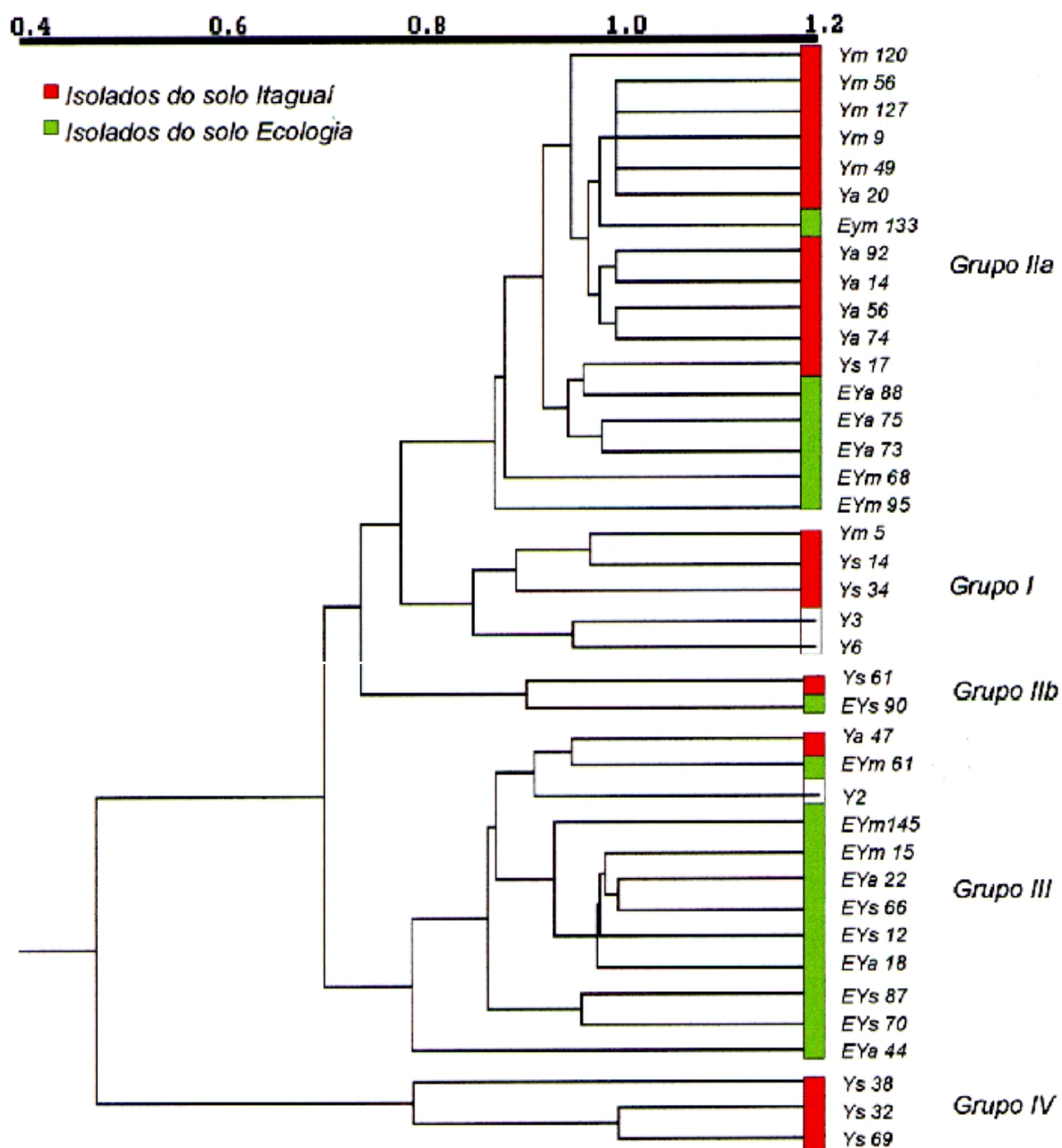


Figura 12: Dendrograma de similaridade dos 36 isolados de *A. amazonense* coletados das raízes esterilizadas evidenciando os solos de origem e os grupos formados no nível de similaridade aproximado de 80% (0,80) (I a IV). O dendrograma foi gerado pelo método das médias das distâncias/coeficiente de Sorensen ($r = 0,92$; $p = 0,0004$). Escala: similaridade em decimal. Y2, Y3 e Y6: estirpes de referência.

isolados pudesse ter atingido o interior radicular através destas aberturas naturais, onde os efeitos discriminatórios exercidos pelas plantas (em interação com as células bacterianas) seriam menos intensamente exercidos. Reinhold-Hurek & Hurek (1998), citando diversos autores, afirmam que a colonização interna dos tecidos radiculares de plantas saudáveis é aparentemente um fenômeno comum. Por exemplo, várias bactérias não diazotróficas foram isoladas de tecidos de algodão, abóbora e batata esterilizados superficialmente (Barraquio et al., 1997, citados por Reinhold-Hurek & Hurek, 1998). Por sua vez, supostos microrganismos endofíticos obrigatórios têm sido identificados no solo. *Acetobacter diazotrophicus* (um endofítico obrigatório associado a monocotiledôneas) foi identificado em associação com plantas de café não somente nas raízes e no caule, mas também no solo da rizosfera (Jimenez-Salgado et al., 1997, citados por Reinhold-Hurek & Hurek, 1998). Comparações das populações associadas interna- e externamente a plantas de milho-doce e algodão demonstraram que a maioria dos taxa bacterianos do interior radicular podiam também ser encontrados na rizosfera, sugerindo que muitas bactérias ditas do solo possuiriam propriedades invasivas (McInroy & Kloepper, 1994, Mahaffee & Kloepper, 1997, citados por Reinhold-Hurek & Hurek, 1998). Aparentemente a presença indiscriminada de determinados microrganismos da rizosfera no interior radicular e de alguns endófitos na rizosfera é mais comum do que se imagina. Reinhold-Hurek & Hurek (1998) propõem o termo endófitos oportunistas para caracterizar os microrganismos invasivos capazes de sobreviver também no solo. Em função dos resultados obtidos em nosso trabalho e admitindo a validade das nossas observações – isolados do

interior e do exterior radicular não diferiram intensa- e significativamente -, nos parece apropriado descrever *A. amazonense* como um endofito oportunista ou, em sinonímia, facultativo.

Tampouco um efeito estirpe-específico mais intenso exercido no interior radicular foi observado. Novamente o solo aparenta exercer um efeito discriminatório sobre a população de isolados de *A. amazonense*, pois grupos contendo predominante- e exclusivamente isolados de um e outro solo foram observados (figura 12 e tabela 5). Tampouco um efeito associado ao tipo de planta pode ser detectado, pois nenhum grupo continha de maneira expressiva isolados de uma mesma planta de origem (tabela 5). Desta vez, entretanto, as associações entre grupos exclusivos e isolados de mesma origem foram mais evidentes. Nada menos do que 4 grupos exclusivos, contendo 2, 3 e mesmo 4 isolados da mesma plantas/solo foram observados. Além disso, determinados padrões de agrupamento (similaridade superior a 88%) puderam ser, dentro de certos limites, associados a determinadas plantas cultivadas em determinados solos. De maneira particularmente evidente, os padrões de agrupamento da maior parte dos isolados de milho/Itaguaí e arroz/Itaguaí puderam ser prontamente associados a seus sítios de origem (Figura 13) e de maneira menos intensa, determinados isolados de sorgo/Itaguaí, sorgo/Ecologia e arroz/Ecologia. Novamente os resultados nos sugerem a possibilidade de existência de uma associação, ao menos parcial, entre os agrupamentos e os sítios de origem (determinadas plantas cultivadas em determinado solo) dos isolados.

Em função dos resultados e observações apresentados acima, podemos a

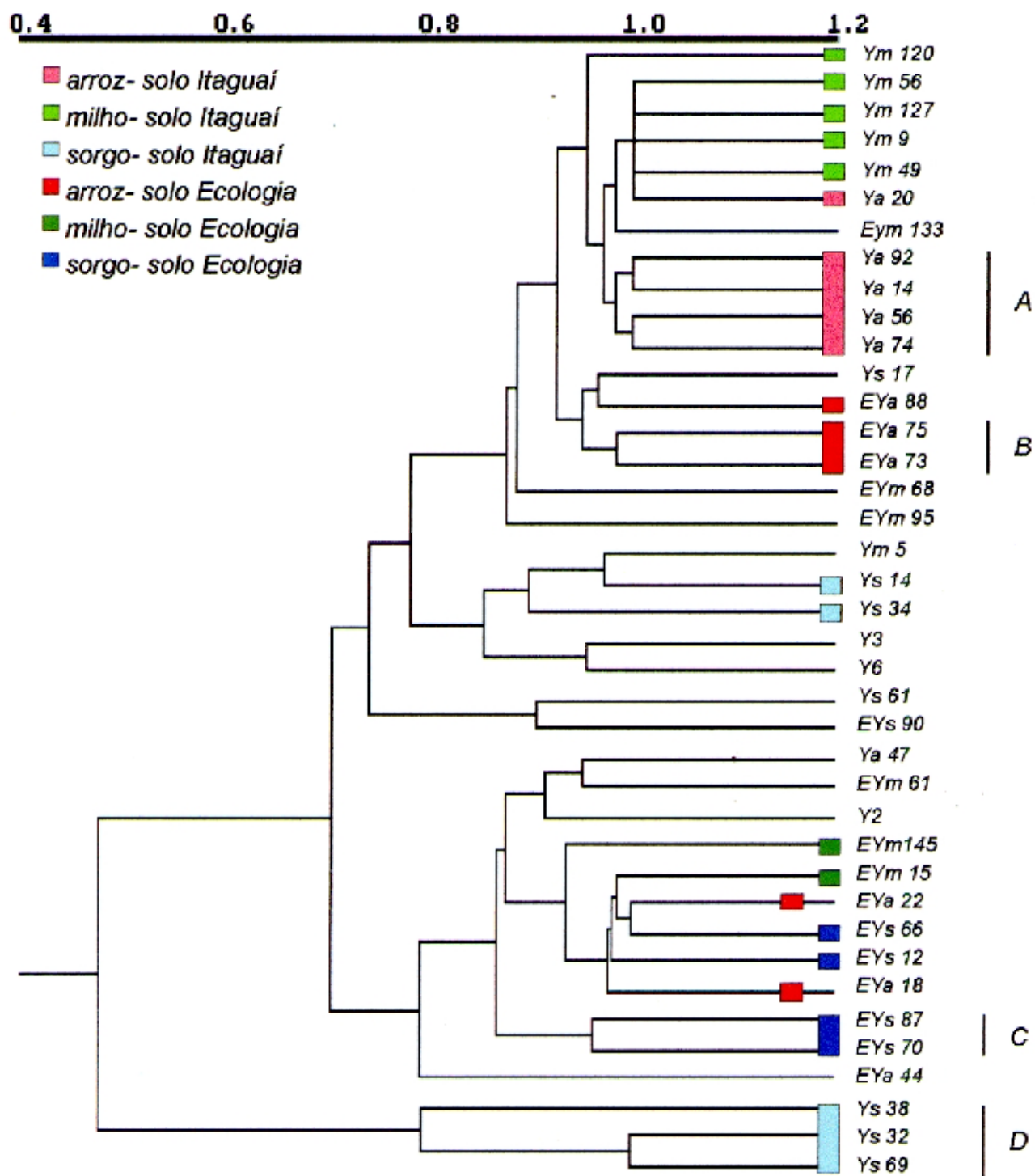


Figura 13: Dendrograma de similaridade dos 36 isolados de *A. amazonense* coletados das raízes esterilizadas, evidenciando os isolados de mesma origem que apresentam um grau de similaridade superior a 88% (0,88) e os grupos exclusivos (A a D). Os grupos formados a aproximadamente 80% não estão indicados. O dendrograma foi gerado pelo método das médias das distâncias/coeficiente de Sorensen ($\tau = 0,92$; $p=0,0004$). Escala: similaridade em decimal. Y2, Y3 e Y6: estirpes de referência.

partir de agora definir a natureza dos trabalhos realizados. O que buscamos, em última análise, são indícios da existência de correlações entre determinadas classes de indivíduos, definidas a priori, e suas distâncias genéticas. Analisando os agrupamentos produzidos anteriormente, procuramos associar as classes de indivíduos (classe dos isolados de arroz/Itaguaí, milho/Itaguaí, etc.) a suas distâncias genéticas, representadas pelos dendrogramas. Apesar de fornecerem informações absolutamente valiosas para a caracterização da diversidade de uma população, estas metodologias não nos permitem estabelecer correlações verdadeiras, mas, sim, associações. Estas, em última análise são sempre determinadas pelos critérios subjetivos do pesquisador. Os padrões de agrupamento dos isolados identificados em função do solo de origem foram de tal forma definidos que nos permitiram de pronto associar os grupos aos sítios de origem. Entretanto, os isolados identificados tanto em função da planta quanto do solo se apresentaram de tal maneira dispersos nos dendrogramas que somente algumas associações, não tão evidentes e fruto do nosso juízo pessoal, puderam ser estabelecidas. É óbvio que estas Observações deverão ser validadas através de uma segunda abordagem.

A abordagem hierárquica definida pela análise da variância molecular (AMOVA) é capaz de determinar as correlações existentes entre as diferentes classes, definidas a priori, e suas distâncias genéticas e testar as suas significâncias. Seis análises envolvendo os sítios de origem dos isolados (análises 1 a 6) revelaram nitidamente a existência de variações genéticas atribuíveis aos efeitos do solo e da planta, confirmando de uma maneira geral os resultados e

conclusões apresentados acima (tabela 6). Em todas as análises, a variação entre os isolados contidos nas diferentes plantas foi intensa (tabela 6) refletindo a grande heterogeneidade existente observada anteriormente. Por sua vez, o solo, mais intensamente, e a planta, em menor proporção, exercem também uma indiscutível influência sobre a variação total. Quando analisamos separadamente os isolados do solo rizosférico + raízes lavadas (análise 2) notamos um sensível incremento na variação genética atribuível ao solo (de 19,45 para 24,06%) e a planta (de 6,97 para 13,14%). A análise dos isolados do interior radicular (análise 5), por sua vez, revelou uma diminuição dos efeitos atribuídos ao solo (de 19,45 para 16,01%) e um incremento nos efeitos da planta (de 6,97 para 12,20%). Estes resultados nos indicam que os efeitos atribuíveis ao solo são mais intensamente expressos nos isolados do solo da rizosfera e do rizoplane do que nos do interior radicular. Assim como nas análises de agrupamento, os efeitos atribuídos ao tipo de planta são mais facilmente notados quando os isolados são investigados separadamente.

Os efeitos atribuídos ao tipo de planta só puderam ser mais intensamente notados, quando se eliminou as variações correlacionadas ao tipo de solo. A análise dos isolados da rizosfera + raízes lavadas tanto do solo Itaguaí (análise 3) quanto do Ecologia (análise 4) revelaram efeitos significativos ($P=0,0572$ e $P=0,0272$), na ordem de 17%, atribuídos a diferenças de pelo menos duas plantas. Estes valores são sensivelmente maiores do que aqueles obtidos anteriormente e ressaltam o aumento da sensibilidade destas análises mais específicas. A semelhança dos efeitos atribuídos ao tipo de planta, tanto na

Tabela 6: Análises da variância molecular dos estudos realizados.

Fonte de Variação	GL	SQD	QMD	Componente da Variância	% do Total	Valor de P
Análise 1 (isolados <i>Rizo+Lav+Est+Est'</i>)						
Entre solos	1	102,85	102,85	2,31	19,45	< 0,0002
Entre plantas/ solos	4	84,45	21,12	1,07	8,97	< 0,0022
Entre isolados/plantas	65	553,50	8,52	8,52	71,58	< 0,0002
Análise 2 (isolados <i>Rizo+Lav</i>)						
Entre solos	1	78,09	78,09	3,30	24,08	< 0,0002
Entre plantas/solos	4	77,24	19,31	1,80	13,14	0,0052
Entre isolados /plantas	30	257,99	8,60	8,60	62,78	< 0,0002
Análise 3 (isolados <i>Rizo+Lav</i> Itaguaí)						
Entre plantas	2	41,53	20,76	1,83	17,48	0,0572
Entre isolados /plantas	17	146,57	8,62	8,62	82,52	0,0572
Análise 4 (isolados <i>Rizo+Lav</i> Ecologia)						
Entre plantas	2	35,71	17,85	1,77	17,10	0,0272
Entre isolados/plantas	13	111,42	8,57	8,57	82,90	0,0272
Análise 5 (isolados <i>Est+Est'</i>)						
Entre solos	1	42,66	42,66	1,58	16,01	0,0380
Entre plantas/solos	4	57,12	14,28	1,20	12,20	0,0186
Entre isolados /plantas	30	212,49	7,08	7,08	71,79	< 0,0002
Análise 6 (isolados <i>Est+Est'</i> Itaguaí)						
Entre plantas	2	38,77	19,38	1,92	20,94	0,0242
Entre isolados /plantas	16	116,02	7,25	7,25	79,06	0,0242
Análise 7 (isolados <i>Est+Est'</i> Ecologia)						
Entre plantas	2	18,36	9,18	0,41	5,55	0,1804
Entre isolados /plantas	14	96,47	6,89	6,89	94,45	0,1804
Análise 8 (grupos^a)						
Entre grupos	4	481,80	120,45	9,32	70,37	< 0,0002
Entre isolados /grupos	66	259,04	3,93	3,92	29,63	< 0,0002

GL: graus de liberdade. SQD: soma dos quadrados dos desvios. QMD: quadrado médio dos desvios. P: probabilidade de se obter uma estimativa do componente da variância maior do que a observada, determinada por procedimentos permutacionais não paramétricos (n° de permutações = 5000). *Rizo*: isolados do solo da rizosfera; *Lav*: isolados de raízes lavadas. *Est* e *Est'*: isolados de raízes esterilizadas. *a*: 5 grupos definidos pelo método das médias das distâncias/coeficiente de Sorensen e formados a aproximadamente 78% de similaridade (vide figuras 8 e 9).

análise dos isolados do solo Itaguaí quanto na dos Ecologia ($\cong 17\%$), refletem, em linhas gerais, os padrões de agrupamento dos isolados rizosféricos e das raízes lavadas de mesma origem formados a 88% (figura 11).

Na análise dos isolados das raízes esterilizadas do solo Itaguaí (análise 6) os efeitos atribuídos ao tipo de planta foram sobremaneira intensos (20,94%). Entretanto, os efeitos da planta sobre os isolados do solo Ecologia (análise 7) não foram significativos. Estes resultados reforçam a conveniência das análises específicas e confirmam as observações efetuadas anteriormente, onde os agrupamentos dos isolados das raízes esterilizadas de mesma origem (formados a 88% de similaridade) foram mais evidentes, em especial os agrupamentos dos isolados de arroz, milho e sorgo do solo Itaguaí (figura 13).

A última análise efetuada, desta vez analisando os 5 grupos genéticos formados a 78%, confirmou os resultados gerados pelos agrupamentos. Embora esta análise possa parecer até redundante e óbvia, teve ela o mérito de reforçar as proposições efetuadas anteriormente: aparentemente a população dos isolados é composta por 4 grupos genéticos preponderantes.

Os efeitos atribuídos ao tipo de solo (aqui entendido em seu sentido mais extenso, ou seja, o ambiente original de cultivo) foram Clara- e inequivocamente demonstrados através das análises de agrupamento, das análises da variância molecular e, em menor intensidade, através dos experimentos de hibridização. As diferenças existentes entre os dois ambientes de origem poderiam justificar parcialmente este comportamento. Sabe-se que os teores de argila, nitrogênio e a capacidade de retenção de água, assim como os teores de areia grossa, podem

estar correlacionados com a viabilidade bacteriana de *Azospirillum* (Bashan et al., 1995a e b). Os solos Itaguaí e Ecologia apresentaram características texturais, de retenção de água e teores de nitrogênio significativamente distintos, o que poderia explicar em parte as diferenças genéticas observadas. Tampouco, as interações com a microflora nativa podem ser desconsideradas. Por exemplo, *in vitro*, os efeitos antagonistas de alguns microrganismos do solo sobre a população de *Azospirillum* foram demonstrados - algumas bacteriocinas foram capazes de inibir o crescimento celular de *Azospirillum* (Oliveira & Drozdowicz, 1981, 1987, Skorupska et al., 1985, citados por Bashan et al. 1999). Latour et al. (1996) por sua vez, observaram diferenças nos níveis de diversidade de populações de *Pseudomonas* do tipo fluorescente isoladas de 2 solos distintos. Estes autores atribuíram estas diferenças à maior competição por ferro e carbono observada, em um dos solos, associada por sua vez a uma maior atividade e reatividade microbiana. É provável que parte das diferenças estruturais entre as duas subpopulações de isolados de *A. amazonense* (do solo Itaguaí e do Ecologia) se deva aos distintos modos de interação com as diferentes comunidades nativas de microrganismos encontradas em ambos os solos. Através de uma análise molecular da variância mais específica e detalhada, foram observadas diferenças na expressão dos efeitos atribuídos ao tipo de solo entre os isolados do exterior e os do interior radicular. De maneira evidente, os efeitos atribuíveis ao solo foram mais intensamente observados nos isolados do solo da rizosfera e do rizoplaneo do que nos do interior mdicular.

Fedi et al. (1992) citados por Del Gallo & Fendrik (1994) afirmaram que a

especificidade da interação *Azospirillum* - planta poderia se dar de uma maneira mais geral e menos estrita. De fato, algumas *estirpes* de *Azospirillum* isoladas de plantas C₃ e C₄ apresentaram padrões de resposta quimiotática e de associação específicos. Reinhold e colaboradores (1985) e Fedi et al. (1992), citados por Del Gallo & Fendrik (1994) por exemplo, investigaram o comportamento quimiotático estirpe-específico de *Azospirillum* e descobriram diferenças nos padrões de respostas entre as estirpes isoladas de plantas C₃ e C₄. De Polli et al. (1980) citados por Baldani (1984), por sua vez fazendo uso de ferramentas imunológicas, observaram diferenças nos padrões de infecção entre estirpes n^o de *A. brasilense* isoladas de plantas C₃ e C₄. Em condições de campo e casa de vegetação evidências de uma especificidade mais geral e menos estrita foram observadas. No cômputo geral, plantas C₃ e C₄ seriam predominante- e respectivamente colonizadas por *A. brasilense* e *A. lipoferum* (Baldani, 1980; Baldani & Döbereiner, 1980, 1981) e indiscriminadamente por *A. amazonense* (Baldani, 1984). Em função destas evidências, seria razoável crer que os padrões de especificidade da interação *A. amazonense* - planta pudessem ocorrer não no nível das espécies, mas sim no das estirpes. As análises dos isolados de *A. amazonense* realizadas em nosso estudo, entretanto, não evidenciaram quaisquer efeitos discriminórios exercidos pelos cereais com metabolismos fotossintéticos distintos, sejam eles C₃ (arroz) ou C₄ (milho e sorgo). É possível que a inespecificidade da interação pudesse ter sido provocada por fatores relacionados à bactéria e ao solo/ambiente.

Recentemente, Bashan & Holguin (1997) (com base em estudos de

infecção e relatos atualizados da ocorrência de *Azospirillum* em diversas espécies vegetais) sugeriram que as estirpes de *Azospirillum* não apresentam preferência por qualquer tipo de planta. Nossos resultados, entretanto, evidenciam de maneira clara a existência de efeitos parciais atribuíveis a determinados tipos de plantas cultivadas em determinados solos. Os resultados gerados pelas análises de agrupamento, confirmados posteriormente pela AMOVA, tomaram evidentes os efeitos discriminatórios parciais exercidos pelas plantas de arroz cultivadas no solo Itaguaí e, em menor escala, pelas plantas de sorgo cultivadas no solo Ecologia sobre os isolados do solo da rizosfera e das raízes lavadas. As análises evidenciaram também os efeitos discriminatórios altamente significativos, embora parciais, exercidos pelas plantas de arroz, milho e, em menor intensidade, sorgo, cultivadas no solo Itaguaí, sobre os isolados do interior radicular. Sabe-se que a quantidade e a composição dos exudatos liberados pelas raízes podem determinar a natureza e a especificidade de uma interação (Reinhold et al., 1985; Parke, 1991, citado por Lemanceau et al., 1995). Além disso, características texturais, determinando características de impedância, podem afetar grandemente o processo de exudação radicular (Boeuf-Tremblay et al., 1995, citados por Latour et al., 1996). Talvez os efeitos parciais atribuídos a somente algumas das plantas cultivadas, por sua vez, em determinados solos pudessem ser explicados à luz destes argumentos: os efeitos exercidos poderiam ser o reflexo direto de uma interação entre a planta e o tipo de solo. Acreditamos, entretanto, que os padrões de associação parcialmente específicos entre os isolados e seus sítios de origem sejam o resultado da interação integral dos

fatores ambientais determinados pelo tipo de solo/ambiente (características físicas, químicas e biológicas), os fatores associados ao tipo de planta, especialmente aqueles relacionados à composição dos exudatos e a estrutura superficial radicular e os fatores intrínsecos à bactéria, notadamente os padrões de resposta quimiotática, os padrões de utilização de substratos orgânicos e a rizocompetência.

Neste estudo, utilizamos de maneira intensa duas abordagens estatísticas distintas, embora complementares: as análises de agrupamento e da variância molecular. Através dos agrupamentos gerados, fomos capazes de detectar grupos de isolados específicos e desta maneira associá-los a seus sítios de origem. Entretanto, por limitações inerentes à metodologia, nenhuma conclusão estatística mais robusta, capaz de quantificar (e testar) as intensidades das associações entre os isolados e seus sítios de origem, foi possível. Guillamón et al. (1996) entretanto, analisando os perfis de restrição do DNA mitocondrial de leveduras, demonstraram a conveniência de se utilizar AMOVA para a separação das diferenças genéticas regionais e populacionais de interesse inseridas em um universo polimórfico intrapopulacional extensivo, estabelecendo correlações entre as distâncias genéticas das estirpes e os fatores geográficos e ecológicos sob estudo. Pafetti et al. (1996) por sua vez, evidenciaram o poder da análise da variância molecular para os estudos da diversidade populacional de *R. melliloti*. As elevadas e significativas variações intrasubpopulacionais e os expressivos efeitos atribuídos ao tipo de solo foram equivalentes aos observados em nosso trabalho. A AMOVA foi capaz de quantificar as correlações entre os sítios de origem e as

distâncias genéticas entre os isolados de *A. amazonense*, determinando os efeitos atribuíveis ao solo e a planta. Os resultados e conclusões gerados neste estudo nos fornecem novas e inéditas informações sobre a estrutura populacional de *A. amazonense* - preenchendo uma lacuna há muito existente - e evidenciam de maneira clara a conveniência de se utilizar as duas abordagens de maneira complementar. As análises de agrupamento e da variância molecular nos forneceram evidências concretas da existência de efeitos discriminatórios exercidos pelo solo e menos especificamente pela planta.

6- CONCLUSÕES

Em função das observações e argumentos apresentados anteriormente podemos afirmar que:

1. Através do experimento de hibridização espécie-específico, dois grupos de isolados de *A. amazonense* distintos foram observados: o grupo dos isolados, cujos fragmentos apresentam sinais positivos de hibridização, e o grupo daqueles, cujos fragmentos não hibridizaram com a sonda AA 23S.
2. Os padrões de hibridização espécie-específicos estão parcialmente associados ao tipo de solo.
3. A população de *A. amazonense* é formada por 4 grupos geneticamente distintos, discretos e internamente heterogêneos. Os níveis de diversidade encontrados em cada grupo foram elevados.

4. Nenhuma diferença significativa na estrutura, nos padrões genotípicos e nos níveis de diversidade entre os isolados do solo da rizosfera e rizoplane e os do interior radicular foi observada.
5. O tipo de solo/ambiente é capaz de exercer um efeito discriminatório/seletivo sobre os isolados de *A. amazonense*.
6. Os efeitos atribuíveis ao solo foram mais intensamente observados nos isolados do solo da rizosfera e do rizoplane do que nos do interior radicular.
7. A interação dos fatores ambientais, fatores associados ao tipo de planta e fatores inerentes à bactéria aparentemente exerceram um efeito parcial discriminatório sobre os isolados de *A. amazonense*.
8. As análises de agrupamento e da variância molecular (AMOVA) são ferramentas metodológicas extremamente convenientes para a caracterização de populações de bactérias e a determinação dos efeitos seletivos exercidos pelo solo e a planta.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEN'KINA, S. A.; GOLOVKO, M. V.; NIKITINA, V. E. The influence of lectins from *Azospirillum brasilense* Sp7 and *Azospirillum lipoferum* 59B on the activity of plant **β -glucosidase**. In: BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION FOR THE **21ST** CENTURY, 1997, Paris. Proceedings of the **11th** International Congress on Nitrogen Fixation. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997, p. 392.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, Washington, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.
- ANTONYUK, L. P.; FOMINA, O.; KALININA, A.; SEMENOV, S.; NESMEYANOVA, M.; IGNATOV, V. Wheat lectin possibly serve as a signal molecule in the *Azospirillum*-wheat association. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. *Azospirillum* VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.319-324.
- ARTURO, A.; ODELSON, D. A.; HICHEY, R. F.; TIEDJE, J. M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: Akkermans, A. D. L.; Elsas, J. D. V.; Bruijn, F.J., ed. *Molecular Microbial Ecology Manual*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. Seção 3.3.2, p.1-8.

- AßMUS**, B.; HUTZLER, P.; KIRCHHOF, G.; AMANN, R.; LAWRENCE, J. R.; HARTMANN, A. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 61, p. 1013-1019, 1995.
- AUDY, P.; BRAAT, C. E.; SAINDON, G.; HUANG, H. C.; LAROCHE, A. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology*, Saint Paul, v. 86, p. 361-366, 1996.
- BALDANI, J. I.; PEREIRA, P. A. A.; ROCHA, R. E. M.; DÖBEREINER, J. Especificidade na infecção de raízes por *Azospirillum* spp. em plantas com via fotossintética C₃ e C₄. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 16, p. 325-323, 1981.
- BALDANI, J. I. Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1984. 110p. Tese de Mestrado.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, V. L. D. Especificidade na infecção de raízes de milho, trigo e arroz por *Azospirillum*. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1980. 116p. Tese de Mestrado.
- BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp.. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 12, p. 433-439, 1980.
- BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in infection of maize, wheat and rice with *Azospirillum* spp.. In: Vose, P. B.; Ruschel, A. P., ed. *Associative N₂-Fixation*. Boca Raton: CRC Press, v. 1, 1981. p.131-136.

- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 29, p. 924-929, 1983.
- BALDANI, V. L. D.; ALVAREZ, M. A. de B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Estabishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 90, p. 3546, 1986.
- BALDANI, V. L. D.; JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. Colonization of rice by the nitrogen-fixing bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Azospirillum brasilense* In: Palacios, R.; Moor, J.; Newton, W. E., ed. *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. p.705.
- BALLY, R.; HAURAT, J.; NORMAND, P. *Azospirillum* phylogeny based on (16S rRNA gene) sequences. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. *Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology*. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.129-135.
- BARASUBIYE, T.; PARENT, J.; HAMELIN, R. C.; LABERGE, S.; RICHARD, C.; DOSTALER, D. Discrimination between alfafa and tomato isdates of *Verticillium albo-atrum* using RAPD markers. *Mycological Research*, [Cambridge], v. 99, n. 12, p. 1507-1512, 1995.
- BASHAN, Y. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *The Journal of General Microbiology*, Reading, v. 132, p. 3407-3414, 1986.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. *The Journal of General Microbiology*, Reading, v. 133, p. 3473-3480, 1987.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 36, p. 591-680, 1990.

- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Root-to-root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 60, p. 2120-2131, 1994.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Inter-root movement of *Azospirillum brasilense* and subsequent root colonization of crop and weed seedlings growing in soil. *Microbia/ Ecology*, New York, v. 29, p. 269-281, 1995.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BASHAN, Y.; PUENTE, M. E.; RODRIGUEZ-MENDOZA, M. N.; HOLGUIN, G.; TOLEDO, G.; FERRERA-CERRATO, R.; PEDRIN, S. Soil parameters which affect the survival of *Azospirillum brasilense*. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. *Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology*. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.441-449.
- BASHAN, Y.; PUENTE, M. E.; RODRIGUEZ-MENDOZA, M. N.; TOLEDO, G.; HOLGUIN, G.; FERRERA-CERRATO, R.; PEDRIN, S. Survival of *Azospirillum brasilense* Cd and Sp-245 in the rhizosphere of 23 soil types. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 61, n. 5, p.1938-1945, 1995.
- BEIJERINCK, M. V. über ein *Spirillum*, welches freien Stickstoff binden kann ? *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Abt. 2, [S. I.]*, v. 63, p. 353-359, 1925.
- BELLONE, C. H.; DE BELLONE, S. C. Morphogenesis of strawberry roots infected by *Azospirillum brasilense* and V. A. mycorrhiza. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. *Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology*. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.251-255.

- BLOOMFIELD, S. F.; STEWART, G. S. A. B.; DODD, C. E. R., BOOTH, I. R.; POWER, E. G. M. The viable but non-culturable phenomenon explained? Microbiology, Comment, Cambridge, v. 144, p.1-2, 1998.
- BRIDGE, P. D. Classification. In: Fry, J. C., ed. Biological data analysis: a practical approach. Cambridge: Oxford University Press, 1993. p.219-242.
- BUSSAB, W. O.; MIAZAKI, É. S.; ANDRADE, D. F. Introdução à análise de agrupamentos, 9º Simposio Nacional de Probabilidade e Estatística. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística - ABE, 1990. 105 p.
- COLWELL, R. R. Microbial biodiversity – global aspects. In: Colwell, R. R.; Simidu, U.; Ohwada, K., ed. Microbial Diversity in Time and Space. New York: Plenum Press, 1998. p.1-11.
- CROES, C.; MOENS, S.; VAN BASTELAERE, E.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, K. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. The Journal of General Microbiology, Reading, v. 139, p.2281-2289, 1993.
- DEKHIL, S. B.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas pamoensis* sp. nov.. Systematic and Applied Microbiology, Stuttgart, v. 20, p. 72-77, 1997.
- DEL GALLO, M.; FENDRIK, I. The rhizosphere and *Azospirillum* In: Okon, Y., ed. *Azospirillum*/Plant Associations. Boca Raton, CRC Press, 1994. P. 57-75.
- DE LONG, E. F. Diversity of naturally occurring prokaryotes. In: Colwell, R. R.; Simidu, U.; Ohwada, K., ed. Microbial Diversity In Time and Space. New York: Plenum Press, 1998. p.125-133.
- DE TROCH, P.; PETERSEN, D.; VANDERLEYDEN, J. Polysaccharide synthesis in *Azospirillum bmsilense*. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. *Azospirillum* VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.97-103.

- DIGBY, P. G. N.; KEMPTON, R. A. Ecological data. In: Digby, P. G. N.; Kempton, R. A., ed. Multivariate analysis of ecological communities. London: Chapman and Hall, 1987. p.1-28.
- DQBEREINER, J.; MARRIEL, I. E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v. 22, p. 1464-1473, 1976.
- DÖBEREINER, J. Emerging technology based on biological nitrogen fixation by associative N₂-fixing organisms. In: Graham, P. H.; Harris, S. C., ed. Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture. Cali: CIAT, 1981. p. 469-483.
- DÖBEREINER, J. Ten years *Azospirillum*. In: Klingmüller, W., ed. *Azospirillum* II and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology. Basel: Birkhäuser Verlag, 1983. p.9.
- DOUGLAS, C.; HALPERIN, W.; NESTER, E. W. *Agrobacterium tumefaciens* affected in attachment to plant cells. Journal of Bacteriology, Washington, v. 152, p. 1265-1275, 1982.
- DUNG, N. N.; KRAUT, M.; KLINGMÜLLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* strains from soil and rice plants in north Vietnam. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. *Azospirillum* VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.559-566.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variante inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, Maryland, v. 131, p. 479-491, 1992.

- FABBRI, P.; DEL GALLO, M. Specific interaction between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and three chickpea-Rhizobium strains inoculated singularly and in combination with *Azospirillum brasilense* Cd. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. *Azospirillum* VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.257-267.
- FAGES, J. *Azospirillum* inoculants and field experiments. In: Okon, Y., ed. *Azospirillum/Plant Associations*. Boca Raton, CRC Press Inc., 1994. p.87-109.
- FANI, R.; BANDI, C.; BAZZICALUPO, M.; DAMIANI, G.; DI CELLO, F. P.; FANCELLI, S.; GALLORI, E.; GERACE, L.; GRIFONI, A. M.; LIO, P.; MORI, E. Phylogenetic studies of the genus *Azospirillum*. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. *Azospirillum* VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.59-75.
- FLOURI, F.; SINI, K.; BALIS, C. Interactions between *Azospirillum* and *Phialophora radicola*. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. *Azospirillum* VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.231-237.
- GILLIS, M.; REINHOLD-HUREK, B. Taxonomy of *Azospirillum*. In: Okon, Y., ed. *Azospirillum/Plant Associations*. Boca Raton: CRC Press Inc., 1994. p.1-14.
- GORI, A.; FAVILI, F. First results of individual and dual inoculation with *Azospirillum-Glomus* on wheat. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. *Azospirillum* VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.245-249.
- GRIFONI, A.; BAZZICALUPO, M.; DI SERIO, C.; FANCELLI, S.; FANI, R. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and of the histidine operon. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, v. 127, p. 85-91, 1995.

- GUILLAMÓN, J. M.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: relationships between genetic distance and geographic or ecological origin. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, v. 19, p.122-132, 1996.
- GÜNDISCH, C.; KIRCHHOF, G.; BAUR, M.; BODE, W.; HARTMANN, A. Identification of *Azospirillum* species by RFLP and pulsed-field gel electrophoresis. *Microbial Releases*, [S. l.], v. 2, p.41-45, 1993.
- HALVERSON, L. J.; STACEY, G. Signal exchange in plant-microbe interactions. *Microbiological Reviews*, Washington, v. 50, p. 193-225, 1986.
- HARASAWA, R.; MIZUSAWA, H.; NOZAWA, K.; NAKAGAWA, T.; ASADA, K.; KATO, I. Detection and tentative identification of dominant mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer region. *Research in Microbiology*, Paris, v. 144, p.489-493, 1993.
- HARTMANN, A.; ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: Okon, Y., ed. *Azospirillum/Plant Associations*. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.15.
- HARTMANN, A.; BALDANI, J. I.; KIRCHHOF, G.; **ABMUS**, B.; HUTZLER, P.; SPRINGER, N.; LUDWIG, W.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Taxonomic and ecologic studies of diazotrophic rhizosphere bacteria using phylogenetic probes. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. *Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology*. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.415-427.
- HARTMANN, A.; ABMUS, B.; KIRCHHOF, G.; SCHLOTER, M. Direct approaches for studying soil microbes. In: van Elsas, J. D.; Trevors, J. T.; Wellington, E. M. H., ed. *Modern Soil Microbiology*. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 279-309.
- HUFF, D. R.; PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, v. 86, p. 927-934, 1993.

- IGNATOV, V.; STADNIK, G.; IOSIPENKO, O.; SELIVANOV, N.; IOSIPENKO, A.; SERGEEVA, E. Interactions between partners in the association "wheat-*Azospirillum brasilense* Sp 245". In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. *Azospirillum* VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.271-278.
- ITZIGSOHN, R.; ABBASS, Z.; SARIG, S.; OKON, Y. Inoculation of *Azospirillum* on sunflowers (*Helianthus annuus*) under different fertilization and irrigation regimes. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. *Azospirillum* VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.503-513.
- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, v. 17, n. 1, p.77-119, 1997.
- KABIR, M.; FAURE, D. Identification of *Azospirillum* by oligonucleotide probes after isolation from soil and sorghum rhizoplane contaminated or not by the parasitic plant: *Striga*. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. *Azospirillum* VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.479-485.
- KABIR, M.; FAURE, D.; HEULIN, T.; ACHOUAWK, W.; BALLY, R. *Azospirillum* populations in soils infested by a parasitic weed (*Striga*) under sorghum cultivation in Mali, west Africa. *European Journal of Soil Biology* New Jersey, v. 32, n. 3, p.157-163, 1996.
- KAISER, P. Diazotrophic mixed cultures of *Azospirillum brasilense* and *Enterobacter cloacae*. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. *Azospirillum* VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.207-212.

- KARPATI, E.; KISS, P.; AFSHARIAN, M.; MARINI, F.; BUGLIONI, S.; FENDRIK, I.; DEL GALLO, M. Molecular study of the interaction of *Azospirillum lipoferum* with wheat germ agglutinin. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. ***Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology***. Berlin: Springer-Verlag, 1995. P. 213-221.
- KARPATI, E.; VÖROS, G.; FENDRIK, I.; OROSZ, L. 1997. Chitooligosaccharide-backboned residues on cell surface of *Azospirillum lipoferum* specifically communicate with lectin of wheat. In: BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION FOR THE 21ST CENTURY, 1997, Paris. ***Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation***. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997, p. 393.
- KIRCHHOF, G.; HARTMANN, A. Development of gene-probes for *Azospirillum* based on 23S-rRNA sequences. ***Symbiosis***, Rehovot, v. 13, p. 24-35, 1992.
- KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; AßMUS, B.; HARTMANN, A. 1997. Use of molecular methods for identification and *in situ* studies of diazotrophic plant colonizing bacteria. In: BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION FOR THE 21ST CENTURY, 1997, Paris. ***Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation***. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997, p. 379.
- KIRCHHOF, G.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; ECKERT, B.; DÖBEREINER, J.; HARTMANN, A. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. ***Plant and Soil***, Dordrecht, v. 194, p. 44-55, 1997.
- KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; AßMUSS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. ***Soil Biology and Biochemistry***, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 853-862, 1997.
- KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues. ***Canadian Journal of Microbiology***, Ottawa, v. 44, p. 12-19, 1998.

- LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M.; CHARNAY, M.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR - restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. ***Applied and Environmental Microbiology***, Washington, v. 62, n. 6, p. 2029-2036, 1996.
- LATOUR, X.; CORBERAND, T.; LAGUERRE, G.; ALLARD, F.; LEMANCEAU, P. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. ***Applied and Environmental Microbiology***, Washington, v. 62, n. 7, p. 2449-2456, 1996.
- LEMANCEAU, P.; CORBERAND, T.; GARDAN, L.; LATOUR, X.; LAGUERRE, G.; BOEUFGRAS, J.; ALABOUVETE, C. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. ***Applied and Environmental Microbiology***, Washington, v. 61, n. 3, p. 1004-1012, 1995.
- LEVANONY, H.; BASHAN, Y.; ROMANO, B.; KLEIN, E. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat roots by immuno-gold labelling. ***Plant and Soil***, Dordrecht, v. 117, p. 207-218, 1989.
- LOPEZ-REYES, L.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CARCAÑO-MONTIEL, M. G.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Genetic diversity and relationships in populations of *Klebsiella pneumoniae* and *Azospirillum brasilense* recovered from the rhizosphere and from inside stems of sugarcane, (submetido), 1998.
- LUDWIG, W.; DORN, S.; SPRINGER, N.; KIRCHHOF, G.; HARTMANN, A. PCR-based preparation of 23S rRNA-targeted group-specific polynucleotide probes. ***Applied and Environmental Microbiology***, Washington, v. 60, p. 3236-3244, 1994.

- MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 4, p. 417-430, 1983.
- MARINI, F.; SPERANZA, S.; DEL GALLO, M. Influence of the carbon substrate on the composition of the exocellular exopolysaccharides by *Azospirillum brasilense*. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. ***Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology***. Berlin: Springer-Verlag, 1995. P. 467-477.
- MATORA, L.; SOLOVOVA, G.; SEREBRENNIKOVA, O.; SELIVANOV, N.; SHCHYOGOLEV, S. Immunological properties of *Azospirillum* cell surface: the structure of carbohydrate antigens and evaluation of their involvement in bacteria-plant contact interactions. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. ***Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology***. Berlin: Springer-Verlag, 1995. P. 377-382.
- MATORA, L.; PETROVA, L.; SEREBRENNIKOVA, O.; SHMATENKO, N.; PANASENKO, V.; SHCHYOGOLEV, S. Influence of the plasmid content on the lipopolysaccharide antigens of *Azospirillum brasilense* Sp-245 eSp-7. In: BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION FOR THE 21ST CENTURY, 1997, Paris. ***Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation***. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997, p. 391.
- MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; VAN GOOL, A.; SIGNER, E. Isolation and characterization of *Azospirillum brasilense* loci that correct *Rhizobium meliloti* *exoB* and *exoC* mutants. ***Journal of Bacteriology***, Washington, v. 170, p. 5401-5404, 1988.
- MICHIELS, K.; DE TROCH, P.; ONYEOCHA, I.; VAN GOOL, A.; ELMERICH, C.; VANDERLEYDEN, J. Plasmid localization and mapping of *Azospirillum brasilense* loci that affect exopolysaccharide synthesis. ***Plasmid***, Duluth, v. 21, p. 142-146, 1989.

- MICHIELS, K.; VERRETH, C.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense* surface polysaccharide mutants that are affected in flocculation. ***Journal of Applied Bacteriology***, Oxford, v. 69, p. 705-711, 1990.
- MICHIELS, K.; CROES, C. L.; VANDERLEYDEN, J. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. ***The Journal of General Microbiology***, Reading, v. 137, p. 2241-2246, 1991.
- MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; ELMERICH, C. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. In: Okon, Y., ed. ***Azospirillum/Plant Associations***. Boca Raton: CRC Press, 1994. P. 41-56.
- MOENS, S.; VANDERLEYDEN, J. Induction of lateral flagella in *Azospirillum brasilense* Sp7. In: BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION FOR THE 21ST CENTURY, 1997, Paris. ***Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation***. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997, p. 388.
- NAVARRO, E.; SIMONET, P.; NORMAND, P.; BARDIN, R. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. ***Archives of Microbiology***, Berlin, v. 157, p. 107-115, 1992.
- OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. ***Trends in Biotechnology***, Amsterdam, v. 3, p. 223-228, 1985.
- OLIVEIRA, R. G. B.; DROZDOWICZ, A. Are *Azospirillum* bacteriocins produced and active in soil? In: Klingmüller, W., ed. ***Azospirillum IV and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology***. Berlin: Springer-Verlag, 1988. P. 101-108.
- PAFFETTI, D.; SCOTTI, C.; GNOCCHI, S.; FANCELLI, S.; BAZZICALUPO, M. Genetic diversity of an italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. ***Applied and Environmental Microbiology***, Washington, v. 62, n. 7, p. 2279-2285, 1996.

- PASTORELLI, R.; GORI, A.; FAVILLI, F. Adhesion of rhizosphere bacteria to roots of maize and wheat. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. ***Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology***. Berlin: Springer-Verlag, 1995. P. 543-547.
- PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. ***Canadian Journal of Microbiology***, Ottawa, v. 24, p. 734-742, 1978.
- PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. ***Canadian Journal of Microbiology***, Ottawa, v. 29, p. 900-915, 1983.
- PEREG-GERK, L.; ARSÈNE, F.; GOUNON, P.; PAQUELIN, A.; CARRENO-LOPEZ, R.; KENNEDY, I. R.; ELMERICH, C. Colonisation of wheat roots by *Azospirillum brasilense* wild type and by mutant strains impaired in flocculation and motility. In: BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION FOR THE 21ST CENTURY, 1997, Paris. ***Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation***. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997, p. 395.
- PEREIRA, J. A. R.; CAVALCANTE, V. A.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. ***Plant and Soil***, Dordrecht, v. 110, p. 269-274, 1988.
- RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUJIN, F. J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: Caetano- Anollés, G.; Gresshof, P. M., ed. ***DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews***. New York: John Willey & Sons, 1996. P. 1-23.
- RAMOS, D. P.; de CASTRO, A. F.; CAMARGO, M. N. Levantamento detalhado de solos da área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***, Série Agronomia, Brasília, v. 8, p. 1-27, 1973.

- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp.. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 162, p. 190-195, 1985.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 6, n. 4, p. 139-144, 1998.
- ROCHA, R. E. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Specificity of infection by *Azospirillum* spp. in plants with C₄ photosynthetic pathway. In: Vose, P. B.; Ruschel, A. P., ed. **Associative N₂-Fixation**, v. 2. Boca Raton: CRC Press, 1981. P. 67-69.
- ROMANTSCHUK, M. Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 225-243, 1992.
- ROSADO, A. S.; DE AZEVEDO, F. S.; DA CRUZ, D. W.; VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L. Phenotypic and genetic diversity of *Paenibacillus azotofixans* strains from the rhizoplane or rhizosphere soil of different grasses. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, p. 216-226, 1998.
- SCHLOTER, M.; KIRCHHOF, G.; HEINZMANN, U.; DÖBEREINER, J.; HARTMANN, A. Immunological studies of the wheat-root colonization by the *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245 using strain-specific monoclonal antibodies. In: Hegazi, N. A., Fayez, M. & Monib, M. (eds.): **Nitrogen Fixation with Non-Legumes**. Cairo: American University of Cairo Press, 1994. P. 291.
- SCHLOTER, M.; AßMUSS, B.; HARTMANN, A. The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. **Biotechnological Advances**, Oxford, v. 13, p. 75-90, 1995.
- SKVORTSOV, S.; KONNOVA, S. A.; MAKAROV, O.; PROKHOROVA, R.; IGNATOV, V. *Azospirillum brasilense* exopolysaccharide complexes, their possible involvement in bacteria-wheat roots interactions and the suggested nature of these interactions. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. **Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. P. 279-290.

- WIELAND, G.; FENDRIK, I. Colonization of wheat by *Azoarcus* sp. And interaction with other diazotrophs. In: BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION FOR THE 21ST CENTURY, 1997, Paris. ***Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation***. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997, p. 406.
- ZHULIN, I. B.; TAYLOR, B. L. Chemotaxis in plant-associated bacteria: the search for the ecological niche. In: Fendrik, I.; Del Gallo, M.; Vanderleyden, J.; Zamaroczy, M., ed. ***Azospirillum VI and Related Microorganisms: Genetics, Physiology, Ecology***. Berlin: Springer-Verlag, 1995. P. 451-459.