

Fábio Faria da Mota

“Diversidade genética de estirpes de *Paenibacillus polymyxa*
isoladas da rizosfera de diferentes cultivares de milho plantados
em solo de Cerrado”



Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia *Prof. Paulo de Góes*,
visando a obtenção do grau de Bacharel
em Microbiologia e Imunologia

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
2002

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto Microbiologia *Prof. Paulo de Góes*, sob a orientação da Professora Lucy Seldin.

ABREVIATURAS:

ACP – Análise do Componente Principal

AP-PCR – “Arbitrarily Primed PCR” (PCR utilizando “primers” arbitrários)

ARDRA – “Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis” (Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado)

cm - centímetro

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídio

EDTA – Ácido etileno-diamino tetracético

GB – “Glucose Broth”

Kb – Quilo base (s) (1.000 pb)

Kg - Quilograma

MANOVA – “Multivariate analysis of variance” (Análise multivariada da variância)

min – Minuto (s)

PCR – “Polymerase Chain Reaction” (reação em cadeia da polimerase)

PGPR – “Plant Growth Promoting Rhizobacteria” (rizobactérias promotoras do crescimento de plantas)

pb – par (es) de bases

RAPD – “Random Amplified Polymorphic DNA” (polimorfismo do DNA amplificado randômicamente)

rep-PCR – “repetitive sequence-based oligonucleotide primer – PCR” (PCR utilizando “primers” baseado em sequências repetitivas como BOX, REP e ERIC)

RNA – Ácido ribonucléico

RNase A - Ribonuclease

rpm – Rotações por minuto

SDS – “Sodium Dodecyl Sulfate” (Dodecil sulfato de sódio)

Tris - tris (hidroxi-metil-amino-metano)

UPGMA – “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	3
RESUMO.....	8
SUMMARY.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Interação entre microrganismos e plantas.....	10
1.2. <i>Paenibacillus polymyxa</i> : Características gerais e aplicação na agricultura.....	11
1.3. Técnicas moleculares utilizadas em estudos de diversidade bacteriana (AP-PCR e rep-PCR).....	15
2. OBJETIVO DO TRABALHO.....	17
3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO.....	17
4. ETAPAS DESENVOLVIDAS.....	18
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
5.1. Meios de cultura.....	19
5.1.1. TBN.....	19
5.1.2. TBNR.....	19
5.1.3. GB.....	20
5.1.4. Meios para identificação de <i>Bacillus</i>	21
5.1.4.1. Meio Básico para fermentação de carboidratos.....	21
5.1.4.2. Meio para o teste de utilização de citrato ou succinato.....	21
5.1.4.3. Meio para o teste de produção de dihidroxiacetona.....	22
5.2. Tampões.....	22
5.2.1. Tampão TE.....	22
5.2.2. Tampão TEB.....	22

5.2.3. Tampão de lise.....	23
5.3. Soluções.....	23
5.3.1. Solução de micronutrientes.....	23
5.3.2. Solução de RNAase A.....	23
5.3.3. Solução de pronase.....	24
5.3.4. Soluções utilizadas no teste de produção de dihidroxiacetona.....	24
5.3.5. Corante para eletroforese de DNA.....	24
5.4. Cultivares de milho e condições experimentais.....	25
5.5. Isolamento das estirpes de <i>P. polymyxa</i>	26
5.6. Identificação das estirpes isoladas.....	26
5.6.1. Utilização de diferentes carboidratos.....	27
5.6.2. Utilização de citrato ou succinato.....	27
5.6.3. Teste de produção de dihidroxiacetona.....	27
5.7. Caracterização genotípica.....	28
5.7.1. Extração de DNA genômico.....	28
5.7.2. AP-PCR.....	29
5.7.3. rep-PCR.....	31
5.7.4. Eletroforese em gel de agarose.....	31
5.8. Análises computacionais.....	32
5.8.1. Análises de similaridade.....	32
5.8.2. Análise de grupo.....	32
5.8.3. Análise estatística.....	33
6. RESULTADOS.....	34
6.1. Isolamento das estirpes.....	34
6.2. Identificação das estirpes.....	34
6.3. Caracterização genotípica.....	38
6.3.1. AP-PCR.....	38

6.3.2. BOX-PCR.....	42
6.4. Análises Computacionais.....	42
6.4.1. Análise de similaridade.....	42
6.4.2. Análise de grupo.....	47
6.4.3. Análise estatística.....	49
7. DISCUSSÃO.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

RESUMO

Um solo tropical brasileiro (cerrado) foi plantado com quatro cultivares de milho (CMS04, CMS11, CMS22 e CMS36) e a diversidade das populações de *Paenibacillus polymyxa* presentes nessas rizosferas foi determinada 90 dias após o plantio. Para isso, 67 isolados identificados como *P. polymyxa* por testes bioquímicos clássicos foram analisados por métodos moleculares como “Arbitrarily Primed-PCR” (AP-PCR) e a amplificação de seqüências repetitivas do DNA (rep-PCR). Os padrões de amplificação obtidos usando três ”primers” arbitrários e o ”primer” BOXA1R foram usados em separado para a construção de dendrogramas baseados no método “unweight pair groups method with arithmetic means” (UPGMA). Cinquenta e quatro grupos genotípicos foram formados quando os dados das diferentes amplificações por AP-PCR e rep-PCR foram combinados, mostrando um alto nível de polimorfismo genético entre as estirpes de *P. polymyxa* isoladas. Além disso, quando os dados obtidos em todos os experimentos de PCR foram utilizados na construção de um dendrograma baseado no critério de variância-mínima (Ward) e na distância Euclidiana, foi demonstrado que as estirpes de *P. polymyxa* podiam ser divididas em dois grupos principais. Um grupo foi formado predominantemente por estirpes dos cultivares de milho CMS04 e CMS36 enquanto o outro grupo foi formado predominantemente por estirpes isoladas dos cultivares de milho CMS11 e CMS22. A análise da variância (MANOVA) permitiu estabelecer a correlação entre a estrutura genética das populações de *P. polymyxa* e os diferentes cultivares de milho estudados. Os resultados mostraram que as estirpes isoladas das rizosferas dos diferentes cultivares de milho foram significativamente diferentes.

SUMMARY

A tropical Brazilian soil (cerrado) was planted with four cultivars of maize (CMS04, CMS11, CMS22 and CMS36) and the genetic diversity of the *Paenibacillus polymyxa* populations present in their rhizospheres was determined after 90 days of sowing. For that, a total of 67 isolates were identified as *P. polymyxa* by classical biochemical tests and were analyzed for DNA polymorphism with the Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) and amplification of repetitive DNA sequences (rep-PCR) methods. The amplification patterns obtained using three arbitrary primers and the primer BOXA1R were used in separate to construct dendrograms based on the unweighted pair groups method with arithmetic means (UPGMA). Fifty-four genotypic groups were formed when data from different amplifications by AP-PCR and rep-PCR were combined, showing a high level of genetic polymorphism among *P. polymyxa* strains. A dendrogram based also on combined PCR data, treated by cluster analysis with minimum-variance criteria and Euclidean distance, showed that *P. polymyxa* strains could be divided into two main clusters. One cluster was formed predominantly of strains from maize cultivars CMS04 and CMS 36 while the other cluster was formed predominantly by strains of maize cultivars CMS11 and CMS22. Multivariate analysis of variance (MANOVA) allowed the correlation between the genetic structure of *P. polymyxa* populations and the different cultivars of maize studied. The results showed that the strains isolated from the rhizospheres of the different maize cultivars were significantly different.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Interação entre microrganismos e plantas

Nos últimos anos, as interações específicas entre espécies de plantas e microrganismos presentes na rizosfera (região ao redor da raiz) têm sido descritas por alguns autores (Holl, 1983; Lynch, 1990). Estas associações podem ser benéficas ou não para as plantas. As associações benéficas podem ser divididas em dois tipos, simbióticas e não-simbióticas, dependendo da natureza da interação. As associações simbióticas são caracterizadas pela presença de bactérias como as do gênero *Rhizobium*, capazes de induzir a formação de nódulos, por actinomicetos do gênero *Frankia* ou por uma série de fungos endomicorrízicos (Lynch, 1990). Já as associações não simbióticas entre plantas e microrganismos são representadas pelas rizobactérias, que são bactérias de vida livre presentes na rizosfera das mais diferentes espécies de plantas (Glick, 1995).

Muitas vezes, as rizobactérias podem promover interações positivas com as raízes das plantas, desempenhando um papel importante no ambiente e um uso possível na agricultura sustentável (Défago, Duffy & Keel, 1994). Para descrever estas estirpes bacterianas, Kloepper & Schroth (1978) introduziram o termo “rizobactérias promotoras do crescimento de plantas” (“Plant Growth Promoting Rhizobacteria”- PGPR), sendo esta atividade de promoção do crescimento de plantas descrita em estirpes de vários gêneros presentes no solo como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Pseudomonas* (Kloepper, Lifshitz & Zablutowicz, 1989; Bashan & Levanony, 1990; Holl & Chanway, 1992; O’Neil *et al.*, 1992; Shishido, Loeb & Chanway, 1995).

As bactérias designadas como PGPR podem afetar o crescimento da planta de diferentes formas, direta e ou indiretamente. A via indireta de promover o crescimento

da planta é dada pela prevenção do efeito deletério de um ou mais microrganismos fitopatogênicos (mecanismo de antibiose), enquanto que a promoção direta do crescimento da planta pode ocorrer através da síntese ou da disponibilização de nutrientes e outras substâncias para a planta (Glick, 1995).

As PGPR podem atuar no desenvolvimento da planta através de um ou mais desses mecanismos, como a fixação de nitrogênio atmosférico, síntese de sideróforos e fitormônios, na solubilização de minerais, como o fósforo (Davison, 1988; Kloepper, Lifshitz & Zablutowicz, 1989; Lambert & Joos, 1989) e na produção de substâncias antimicrobianas (Rosado & Seldin, 1993; Mavingui & Heulin, 1994; Walker, Powell & Seddon, 1998).

1.2. *Paenibacillus polymyxa*: características gerais e aplicação na agricultura

A espécie *P. polymyxa* compreende estirpes Gram-positivas, anaeróbias facultativas, capazes de crescer sem dificuldades na ausência de oxigênio. Além disso, esta espécie é capaz de utilizar vários açúcares com produção de metabólitos ácidos. A espécie é bastante homogênea quanto às suas características fenotípicas e apresenta taxas relativamente altas de crescimento, podendo ser cultivada em laboratório utilizando-se substratos simples (Priest, 1993). Estirpes pertencentes a esta espécie se diferenciam em endosporos elipsoidais deformantes, que podem estar presentes no esporângio nas posições terminal ou sub-terminal. Estes endosporos possuem um importante papel na resistência das células a uma série de condições adversas do meio ambiente (Priest, 1993). A espécie *P. polymyxa* já foi isolada das rizosferas de trigo (Mavingui *et al.*, 1992), de milho (von der Weid *et al.*, 2000) e nas raízes das mais diferentes plantas e em vários ambientes no Brasil (Rennie *et al.*, 1982), Canadá (Holl *et al.*, 1988), Ilha Devon no Ártico (Jordan, McNicol & Marshall, 1978) e Egito (Abdel-Wahab, 1975). Além disso, estirpes de *P. polymyxa* vêm sendo usadas como

rizobactérias promotoras do crescimento de diferentes plantas como *Pennisetum* spp (Kundu & Gaur, 1980), gramíneas de regiões secas (Chanway, Holl & Turkington, 1988; Holl *et al.*, 1988), plantas forrageiras (Chanway, Holl & Turkington, 1988), entre outras (Holl & Chanway, 1992; Shishido, Loeb & Chanway, 1995). Foi observado que diferenças qualitativas nos exudatos da raiz influenciam no crescimento de estirpes de *P. polymyxa* (Mavingui *et al.*, 1992). Outras características também sugerem a importância desta espécie na agricultura, como a atividade antibacteriana e antifúngica frente à população do solo, região ao redor da raiz (rizosfera) e a superfície da raiz (rizoplano) (Rosado & Seldin, 1993; Mavingui & Heulin, 1994; Piuri, Sanchez-Rivas & Ruzal, 1998; Walker, Powell & Seddon, 1998; Seldin *et al.*, 1999).

Outros trabalhos mostram também a interação de *P. polymyxa* com outros microrganismos, participando de processos importantes como a decomposição de pectina e fixação de nitrogênio (Khammas & Kaiser, 1992), ou mesmo favorecendo o crescimento de outras espécies (como *Rhizobium etli*), levando a um aumento da nodulação e, conseqüentemente, a uma melhoria no desenvolvimento da planta (Petersen, Srinivasan & Chanway, 1996).

No entanto, é importante considerar que a promoção do crescimento ocorre provavelmente através de uma co-adaptação a nível de espécie, entre o cultivar das plantas e as estirpes analisadas, como sugerido por Chanway, Holl & Turkington (1988). Assim, se pensarmos no desenvolvimento de inoculantes que efetivamente promovam o crescimento destas plantas é necessário que se estude fenotipicamente e geneticamente as estirpes melhor adaptadas a cada planta e região específica.

Entretanto, não são muitos os dados disponíveis sobre a estrutura da população e a diversidade intraespecífica de *P. polymyxa*. Em um solo cultivado francês, Mavingui e colaboradores (1992) mostraram que a diversidade desta espécie foi significativamente menor no rizoplano de trigo, quando comparada com a população

encontrada no solo “bulk”. Este fato poderia indicar que as raízes de trigo exercem uma pressão seletiva na população do solo, levando à seleção de um pequeno número de estirpes de *P. polymyxa* na superfície da raiz.

Guemouri-Athmoni e colaboradores (2000) estudaram a diversidade da população de *P. polymyxa* na rizosfera de trigo (*Triticum durum*) em cinco solos da Argélia com diferentes históricos de cultivo de trigo (5, 26, 70 anos e dois solos com mais de 2000 anos de cultivo). As estirpes isoladas nos solos com 5, 26 e 70 anos de cultivo mostraram ser uma população de *P. polymyxa* geneticamente homogênea, enquanto as subpopulações isoladas nos solos com mais de 2000 anos de cultivo mostraram-se significativamente diferentes entre si e das demais subpopulações isoladas. O longo tempo de cultivo (mais de 2000 anos) do *Triticum durum* em solos da Argélia poderia, então, estar afetando a população de *P. polymyxa*. Entretanto, as diferenças que foram observadas na estrutura da população de *P. polymyxa* não podem ser atribuídas com certeza ao simples efeito do tempo de cultivo do trigo, porque os tipos de solo, o clima, os cultivares de trigo, assim como o manejo do plantio poderiam estar afetando também esta estrutura populacional.

von der Weid e colaboradores (2000) determinaram também a diversidade de estirpes de *P. polymyxa* associadas com o milho (*Zea may* L BR-201) plantado em solo de Cerrado, durante as diferentes fases de crescimento da planta. As estirpes isoladas puderam ser agrupadas e relacionadas ao tempo da amostragem (10, 30, 60 e 90 dias após o plantio). Uma possível explicação para as variações encontradas nas diferentes populações de *P. polymyxa* observadas neste estudo seria a mudança da produção e do nível de difusão dos exudatos das raízes, durante o ciclo de vida da planta. Como esses exudatos representam uma fonte nutricional para os microrganismos da rizosfera, eles poderiam influenciar diretamente a população microbiana como sugerido por Hamlen, Lukezic & Bloom (1972).

Em relação a diversidade genética de outras populações bacterianas associadas à rizosfera de plantas, Di Cello e colaboradores (1997) estudaram a diversidade genética da população de *Burkholderia cepacia* isolada da rizosfera de milho (*Zea mays*) em diferentes estágios de crescimento da planta e constataram que a diversidade genética observada entre as estirpes isoladas 125 dias após o plantio do milho (fase de maturação fisiológica deste milho) e as estirpes de cada uma das outras quatro amostragens, 20 dias (germinação), 37 dias (alongação), 57 dias (aparecimento da franja) e 78 dias (fim da floração) era estatisticamente significativa.

Seldin e colaboradores (1998) estudando a diversidade genética de estirpes de *Paenibacillus azotofixans* isoladas da rizosfera de milho, plantado em solo de Cerrado, em diferentes estágios de crescimento da planta (10, 30, 60 e 90 dias após o plantio das semente), observaram que as estirpes isoladas 60 e 90 dias após o plantio, contribuíram mais para a heterogeneidade da população total estudada do que as estirpes isoladas 10 e 30 dias após o plantio.

Finalmente, vários outros estudos mostram que o tipo de solo, a espécie de planta e a sua variedade influenciam na composição e na diversidade das populações bacterianas (Latour *et al.*, 1996, Paffeti *et al.*, 1996). Entretanto, este conhecimento é restrito quando se trata de bactérias pertencentes ao gênero *Paenibacillus*. Os trabalhos já realizados sobre a diversidade deste gênero chamam a atenção para a necessidade de estudar estirpes de *Paenibacillus*, isoladas de diferentes cultivares de plantas adaptadas ao clima tropical do Brasil (Seldin *et al.*, 1998, von der Weid *et al.*, 2000).

1.3. Técnicas moleculares utilizadas em estudos da diversidade bacteriana: (AP-PCR e rep-PCR)

Os estudos de diversidade microbiana tem se beneficiado com o desenvolvimento de muitas técnicas de tipagem que permitem a distinção entre estirpes de uma mesma espécie. Estas técnicas podem ser divididas em duas categorias, as baseadas em características fenotípicas e as baseadas em características genotípicas. As técnicas de tipagem baseadas no fenótipo incluem a eletroforese de isoenzimas (ou enzimas multilocus), perfil de proteínas totais, perfil de metabolismo de açúcares, resistência a antibióticos, perfil de ácidos graxos totais, tipagem de fagos, e várias técnicas de “immunoblotting”. As técnicas de tipagem baseadas no genótipo incluem a hibridização DNA-DNA, análise de restrição genômica, incluindo a separação em gel de campo-pulsado de grandes fragmentos de DNA, ARDRA, perfil de plasmídios e “fingerprinting” de DNA por rep-PCR (Versalovic, Koeuth & Lupski, 1991), Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) (Welsh & McClelland, 1990) ou Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Williams *et al.*, 1990).

A seqüência genômica de cada estirpe é única. Duas estirpes são exatamente iguais se as seqüências dos cromossomas e elementos extracromossômicos são as mesmas. Dessa forma, a caracterização genotípica pode ser o critério mais importante para diferenciar microrganismos e é provavelmente mais sensível do que a caracterização fenotípica (Wang *et al.* 1993) .

As técnicas de “fingerprinting” de DNA denominadas AP-PCR por Welsh & McClelland (1990 e 1993) ou RAPD por Williams *et al.* (1990 e 1993), constituem um dos melhores métodos atuais para discriminação de estirpes de uma espécie. Quando comparados com outros métodos, estes se equiparam ou possuem uma resolução e eficiência superiores às técnicas tradicionais de tipagem que utilizam

características fenotípicas e também genotípicas (Berg, Akopyants & Kersulyte, 1994).

No método AP-PCR, um pequeno oligonucleotídeo (8-12 mers) com seqüência escolhida arbitrariamente é usado como “primer” em uma reação de amplificação por PCR em baixa estringência, a qual permite a síntese de DNA iniciada em sítios onde o “primer” esteja eventualmente ligado. Geralmente, nesta reação, são gerados cerca de quatro a vinte fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. Estes fragmentos gerados são estirpe-específicos e reprodutíveis. Os fragmentos gerados são espelhados no genoma alvo, cada um refletindo a presença de dois sítios de ligação do “primer” em fitas complementares, próximos um ao outro (geralmente menos de 3 Kb de distância). O polimorfismo existente entre duas estirpes permite a formação de padrões de amplificação específicos para cada estirpe estudada (Berg, Akopyants & Kersulyte, 1994).

A aplicação de RAPD ou AP-PCR requer a seleção de múltiplos “primers” enquanto que os rep-PCR são baseados em seqüências definidas, conhecidamente repetitivas e dispersas no genoma de vários gêneros bacterianos, e que são amplificadas com “primers” oligonucleotídicos de maior tamanho do que os usados em AP-PCR ou RAPD (18-24 mers).

Três famílias de elementos repetitivos têm sido usadas para o desenho de “primers”, incluindo a seqüência “Repetitive Extragenic Palindromic” (REP) de 35-40 pb, a seqüência “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus” (ERIC) de 124-127pb e o elemento BOX de 154pb. Estes elementos apresentam em locais distintos, em posições intergênicas ao longo do genoma. Os elementos repetitivos podem estar presentes em ambas as orientações do genoma. Diferentes “primers” oligonucleotídicos têm sido desenhados para iniciar a síntese de DNA para fora dos elementos repetitivos REP, ERIC e BOX (Versalovic *et al.*, 1994). O uso desses “primers” no PCR levam à amplificação seletiva de regiões distintas de diferentes

tamanhos, localizadas entre os elementos REP, ERIC ou BOX (Rademaker, Louws & de Bruijn, 1998).

Nos últimos anos, centenas de trabalhos vêm aplicando as técnicas de AP-PCR ou rep-PCR com sucesso na diferenciação de estirpes de uma mesma espécie. Alguns deles no estudo da diversidade e na dinâmica populacional de muitas espécies microbianas (Carelli *et al.*, 2000; Di Cello *et al.*, 1997; Guemouri-Athmoni *et al.*, 2000; Paffetti *et al.*, 1996; Seldin *et al.*, 1998; von der Weid *et al.*, 2000).

2. OBJETIVO DO TRABALHO

Com base nas informações apresentadas sobre a importância da espécie *P. polymyxa* como uma possível PGPR, pretendemos avaliar a diversidade genética desta espécie na rizosfera de diferentes cultivares de milho (CMS04, CMS11, CMS22 e CMS36) plantados em solo de Cerrado, através das técnicas moleculares: “Arbitrarily Primed – PCR” (AP-PCR) e “repetitive sequence-based oligonucleotide primer – PCR” (rep-PCR).

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO PROPOSTO:

Este trabalho pretende avaliar a diversidade de estirpes de *P. polymyxa* entre quatro cultivares de milho, 90 dias após o plantio, na tentativa de determinar o grau de diversidade genética dessa espécie bacteriana em cada um dos cultivares e entre os quatro cultivares ou mesmo uma possível seleção de um grupo de estirpes por algum dos cultivares da planta. Este estudo é de grande relevância se pensarmos na aplicação de estirpes de *P. polymyxa* sobre sementes de milho para melhorar o crescimento das mudas. É importante que essas estirpes estejam adaptadas ao cultivar de milho que

está sendo plantado, permitindo a sobrevivência destas estirpes introduzidas no ambiente frente à população bacteriana indígena presente na rizosfera.

A cultura do milho e o solo de Cerrado foram escolhidos pela sua importância econômica para o País; o milho por ter papel significativo na dieta de homens e animais e o solo de Cerrado por constituir grande parte do solo brasileiro.

Para o estudo da diversidade genética das populações de *P. polymyxa* presentes na rizosfera dos diferentes cultivares de milho estudados, foram escolhidas as técnicas moleculares (AP-PCR e rep-PCR) pela sua capacidade em distinguir estirpes de uma mesma espécie e pelo fato de ambas as técnicas já terem sido amplamente aplicadas com sucesso no estudo da diversidade e dinâmica populacional de muitas espécies de rizobactérias (Carelli *et al.*, 2000; Di Cello *et al.*, 1997; Guemouri-Athmoni *et al.*, 2000; Paffetti *et al.*, 1996; Seldin *et al.*, 1998; von der Weid *et al.*, 2000; entre outros).

4. ETAPAS DESENVOLVIDAS:

- Isolamento de estirpes com características coloniais semelhantes à espécie *P. polymyxa*, a partir da rizosfera de quatro cultivares de milho;
- Identificação das estirpes isoladas como pertencentes à espécie *P. polymyxa* através de testes fenotípicos (Gordon, Haynes & Pang, 1973);
- Extração de DNA genômico das estirpes isoladas;
- Amplificação do DNA das estirpes isoladas por AP-PCR e rep-PCR (“primer” BOXA1R)
- Análise genotípica com base nos padrões de amplificação por AP-PCR e rep-PCR de cada uma das estirpes isoladas, construção de dendrogramas, análise estatística e comparação dos resultados obtidos nos quatro cultivares de milho estudados.

5. MATERIAIS E MÉTODOS.

5.1. MEIOS DE CULTURA

5.1.1. TBN (Seldin & Penido, 1986)

Glucose	10 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
Extrato de levedura	1 g
Tiamina. HCl	0,001 g
Biotina	0,001 g
Solução de micronutrientes (item 5.3.1)	1 ml
NaOH 2N	2 ml
Azul de bromotimol	0,005 g
Água destilada	1000 ml
pH 7,4	

Obs: Após a autoclavação a 121°C por 15 min, foi adicionado ao meio a solução K₂HPO₄ a 8% na proporção de 10 ml/l (1% do volume do meio).

5.1.2. TBNR (Seldin, van Elsas & Penido, 1984)

Glucose	10 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
Extrato de levedura	1 g
Tiamina. HCl	0,001 g
Biotina	0,001 g
Solução de micronutrientes (item 5.3.1)	1 ml

FeCl ₃ . 6 H ₂ O	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,005 g
NaOH 2N	2 ml
Azul de bromotimol	0,005 g
Ágar	12 g
Água destilada	1000 ml

pH 7,4

Obs: Após a autoclavação a 121°C por 15 min foi adicionado ao meio a solução K₂HPO₄ 8%, na proporção de 10 ml/l (1% do volume do meio).

5.1.3. GLUCOSE BROTH (GB) (Seldin, van Elsas & Penido, 1983)

Glucose	10 g
Peptona de carne	10 g
Extrato de carne	2 g
Extrato de levedura	1 g
NaCl	5 g
Água destilada	1000 ml

pH 7,2

Sempre que necessário, os meios de cultura foram solidificados pela adição de ágar na concentração de 1,2%.

5.1.4. MEIOS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Bacillus* (Gordon, Haynes, & Pang, 1973)

5.1.4.1. MEIO BÁSICO PARA FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS

(NH ₄) ₂ HPO ₄	1 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
Extrato de levedura	0,2 g
Púrpura de bromocresol (0,04% em água destilada)	15 ml
Água destilada	1000 ml

OBS: As soluções dos carboidratos L-arabinose, D-xilose, glicerol e trealose foram preparadas a 10% em água, filtradas (em filtro Millipore 0,45 µm) e mantidas a 4°C. Os carboidratos foram então adicionados assepticamente ao meio básico na concentração final de 0,5%, após a autoclavação do meio a 121°C por 15 min.

5.1.4.2. MEIO PARA O TESTE DE UTILIZAÇÃO DO CITRATO OU SUCCINATO

Citrato ou succinato de sódio	2 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,5 g
Ágar	12 g
Vermelho de fenol (0,04% em água destilada)	20 ml
Água destilada	1000 ml

pH 6,8

5.1.4.3. MEIO PARA O TESTE DE PRODUÇÃO DE DIHIDROXIACETONA

Peptona	5 g
Extrato de carne	3 g
Extrato de levedura	10 g
Glicerol P.A.	20 ml
NaOH (2N)	2 ml
Agar	12 g
Água destilada	1000 ml

5.2. TAMPÕES (Preparados em água destilada)

5.2.1. TAMPÃO TE (Tris e EDTA)

Tris “tris (hidroximetil) aminometano”	10 mM
EDTA “Ácido etilenodiaminotetracético”	1 mM

pH 7,8

5.2.2. TAMPÃO TEB (Tris, EDTA e Borato)

Tris	89 mM
EDTA	2,5 mM
H ₃ BO ₃	89 mM

5.2.3. TAMPÃO DE LISE

Sacarose	25%
Tris-HCl pH 8,0	50 mM
EDTA	1 mM

5.3. SOLUÇÕES

5.3.1. SOLUÇÃO DE MICRONUTRIENTES (Jurgensen & Davey, 1971)

H ₃ BO ₃	2,86 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,22 g
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,81 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,08 g
Água destilada	1000 ml

5.3.2. SOLUÇÃO DE RNase A (pancreática bovina)

A solução foi preparada em acetato de sódio 0,1 M pH 5,0 na concentração final de 10 mg/ml. Após a preparação, a solução foi tratada a 80°C por 10 min e mantida a -20°C.

5.3.3. SOLUÇÃO DE PRONASE

A solução estoque foi preparada na concentração de 10 mg/ ml em água bidestilada estéril e tratada a 37°C por 30 min. Após a preparação, a solução foi mantida a -20°C.

5.3.4. SOLUÇÕES UTILIZADAS NO TESTE DE PRODUÇÃO DE DIHIDROXIACETONA

A solução A foi preparada com 34,66 g de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em 500 ml de água destilada.

A solução B foi preparada com 173 g de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 50 g de NaOH em 500 ml de água destilada.

OBS: As soluções A e B foram estocadas a 4°C e somente antes de usar foram misturadas 1:1 (v/v) resultando na solução de Fehling.

5.3.5. CORANTE PARA ELETROFORESE DE DNA

Glicerol	50%
EDTA	20 mM, pH 7,5
Azul de bromofenol	0,05%
Xileno cianol	0,05%

5.4. CULTIVARES DE MILHO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

O solo de cerrado (EMBRAPA-CNPMS, Sete Lagoas, MG) foi plantado com quatro cultivares de milho (CMS04, CMS11, CMS22, CMS36) escolhidos por sua importância na agricultura. Resumidamente, eles podem ser descritos como: CMS04 – milho tropical, derivado de germoplasmas caribenho, mexicano e brasileiro, com ciclo tardio e grãos dentados amarelos; CMS11 – milho tropical, derivado de germoplasmas caribenho, tuxpeño e mexicano, com grãos amarelos semi-duros e ciclo de vida intermediário; CMS22 – milho subtropical, derivado de germoplasmas mexicano, caribenho e americano, com grãos dentados amarelos e ciclo de vida intermediário; CMS36 – milho tropical, criado a partir de linhagens de diferentes origens (catete, tuxpeño, Eto amarillo, etc), possui ciclo de vida tardio, é muito tolerante ao solo ácido e é muito mais alto do que os demais. O campo experimental onde as sementes de milho sem tratamento foram diretamente plantadas era constituído por duas fileiras de 5 metros de comprimento com espaçamento de 90 cm entre as fileiras e 20 cm entre as plantas de um mesmo cultivar.

O solo foi fertilizado com 400 gramas de uma mistura de N, P e K (4:14:8) e 80 Kg de nitrogênio por hectare, 45 dias após o plantio das sementes. Após 90 dias do plantio, três plantas de cada cultivar foram arrancadas, suas raízes foram retiradas e sacudidas, de forma a se retirar o solo frouxamente aderido. O solo aderido às raízes foi então mantido a -20°C e utilizado para o isolamento das estirpes.

5.5. ISOLAMENTO DAS ESTIRPES DE *P. polymyxa*

As estirpes de *P. polymyxa* foram isoladas das diferentes rizosferas conforme como descrito por Seldin *et al.* (1998). Amostras contendo 1g do solo aderido à raiz, considerado a região da rizosfera, foram misturadas a 9ml de água destilada estéril. As suspensões foram pasteurizadas (10 min, 80°C) e estocadas a 4°C. Estas amostras foram então diluídas sucessivamente (até 10^{-3}) e uma alíquota de 0,1ml de cada diluição foi plaqueada separadamente e em triplicata, com o auxílio de alças de Drigalsky estéreis, em placas contendo 25 ml do meio TBNR. Estas placas foram mantidas em jarras de anaerobiose (10% CO₂; 10% H₂; 80% N₂) a 32°C por 3 dias. Passado este período, as jarras foram abertas e as colônias com morfologia e aspecto semelhante a de *P. polymyxa* (colônias amarelas brilhantes, convexas e mucosas) foram então isoladas e transferidas repetidas vezes para novas placas de meio TBN para purificação. As estirpes isoladas foram numeradas conforme o seu isolamento e foram estocadas em tubos de penicilina lacrados, com meio GB contendo 1% de CaCO₃, conforme descrito por Seldin, van Elsas & Penido (1983).

5.6. IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES ISOLADAS

A identificação de todas as estirpes isoladas foi realizada conforme descrito por Gordon, Haynes & Pang, (1973). A determinação do padrão de fermentação dos carboidratos L-arabinose, D-xilose, glicerol e trealose, da utilização do citrato e do succinato e da produção da dihidroxiacetona foi realizada com todas as estirpes isoladas. Para a confirmação da identificação de algumas estirpes, foram utilizados Kits API (Apparéis et Procédés d'Identification, bioMérieux as, Lyon, France) 50 CHB (#50 430), conforme descrito por Seldin & Penido (1986). As galerias de testes

API foram preparadas de acordo com o manual API 50CH e incubadas a 32°C por 2 dias.

5.6.1. UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES CARBOIDRATOS.

Para este teste foi utilizado o meio básico (item 5.1.4.1). Cada estirpe foi testada frente a carboidratos diferentes, utilizando-se 3 ml do meio básico acrescido de 0,15 ml da solução do carboidrato a 10%. Para o inóculo, foram utilizados 0,1 ml da cultura bacteriana crescida por 24h a 32°C em meio GB líquido. A leitura foi feita em até 5 dias, através da mudança de cor do indicador de pH do meio de roxo para amarelo. Foram utilizados os seguintes carboidratos: L-arabinose, D-xilose, glicerol e trealose.

5.6.2. UTILIZAÇÃO DE CITRATO OU SUCCINATO

As culturas bacterianas crescidas por 24h a 32°C em meio GB líquido foram inoculadas em tubos contendo 5 ml do meio de citrato ou succinato (item 5.1.4.2) e incubadas a 32°C por até 7 dias. A utilização do ácido orgânico foi observada pela viragem do indicador de pH presente no meio da cor amarela para a cor rosa.

5.6.3. TESTE DE PRODUÇÃO DE DIHIDROXIACETONA

As diferentes estirpes foram crescidas por 24h a 32°C em meio GB líquido e 5 µl deste crescimento foram depositados (na forma de “spots”) em placas de Petri contendo o meio apropriado (item 5.1.4.3.). Após 5 dias de incubação a 32°C, as placas contendo as estirpes testadas foram cobertas com a solução de Fehling

(solução A+B). O aparecimento de um halo rosa em torno do crescimento bacteriano indicará a produção de dihidroxiacetona.

5.7. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

5.7.1. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

As estirpes foram crescidas em 30 ml do meio GB a 32°C por 24h para a extração de DNA genômico, conforme descrito por Seldin & Dubnau (1985). As culturas foram centrifugadas (centrífuga Sorvall RC5B com rotor SS-34) a temperatura ambiente, a 8.000 rpm durante 15 min, o precipitado foi lavado com 10 ml de TE e re-centrifugado nas mesmas condições. Ao precipitado foram acrescentados 2 ml de tampão de lise e 2 mg de lisozima, deixando a preparação por 30 min a 37°C. Foi adicionado então, a cada preparação, 200 µl de SDS a 10% e estas foram incubadas por mais 10 min a 37°C. Após esse período, foram adicionados 10 µl de RNase A (10 mg /ml) e as preparações incubadas por mais 10 min a 37°C, quando então foram adicionados 220 µl de pronase (10 mg /ml) e as preparações incubadas a 37°C por mais 2 horas. Posteriormente, foram adicionados 250 µl de acetato de sódio (3M, pH 7,0) e 6 ml de etanol absoluto e as preparações mantidas por uma noite a – 20°C.

Estas preparações foram então centrifugadas a 4°C por 15 min a 10.000 rpm e o DNA precipitado foi ressuspensão em 1,5 ml de TE. Esta suspensão foi deixada a 4°C por uma noite e então tratada com 500 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugada (centrífuga Eppendorf 5410) a temperatura ambiente, 10.000 rpm por 5 min. A fase aquosa foi tratada duas vezes com o mesmo volume de clorofórmio-

álcool isoamílico (24:1) e centrifugada nas mesmas condições. O DNA foi então precipitado com 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 7,0 e 2 volumes de etanol absoluto gelado, sendo deixado por uma noite a -20°C . As preparações foram centrifugadas a 4°C por 15 min a 10.000 rpm e o precipitado, lavado com etanol a 70% e ressuspensão em 300 μl de TE, sendo a suspensão mantida a 4°C .

O produto da extração de DNA foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose a 0,8%, a 90 Volts por 2 horas e corado nas mesmas condições descritas no item 5.7.4., para verificar a integridade do DNA e a possível contaminação com RNA.

5.7.2. AP-PCR

Para os experimentos de AP-PCR foram testados 22 “primers” (oligonucleotídios arbitrários, listados na Tabela 1) com algumas das estirpes isoladas, a fim de observar a reprodutibilidade dos padrões de amplificação e o número de marcadores (bandas de diferentes tamanhos geradas com cada “primer”). Os “primers” que apresentaram uma maior reprodutibilidade e um número razoável de marcadores (entre 4 a 20) nos padrões de amplificação com cada uma das estirpes testadas, foram utilizados para a amplificação de todas as estirpes de *P. polymyxa* isoladas no trabalho.

Tabela 1: Oligonucleotídios da Operon Technologies[®] testados com algumas estirpes isoladas.

“PRIMER”	SEQÜÊNCIA	“PRIMER”	SEQÜÊNCIA
OPA-A03	5'TTAGCGCCCC ^{3'}	OPD-10	5'GGTCTACACC ^{3'}
OPA-C17	5'CCTGGAGCTT ^{3'}	OPD-11	5'AGCGCCATTG ^{3'}
OPD-1	5'ACCGCGAAGG ^{3'}	OPD-12	5'CACCGTATCC ^{3'}
OPD-2	5'GGACCCAACC ^{3'}	OPD-13	5'GGGGTGACGA ^{3'}
OPD-3	5'GTCGCCGTCA ^{3'}	OPD-14	5'CTCCCCAAG ^{3'}
OPD-4	5'TCTGGTGAGG ^{3'}	OPD-15	5'CATCCGTGCT ^{3'}
OPD-5	5'TGAGCGGACA ^{3'}	OPD-16	5'AGGGCGTAAG ^{3'}
OPD-6	5'ACCTGAACGG ^{3'}	OPD-17	5'TTCCCACGG ^{3'}
OPD-7	5'TTGGCACGGG ^{3'}	OPD-18	5'GAGAGCCAAC ^{3'}
OPD-8	5'GTGTGCCCA ^{3'}	OPD-19	5'CTGGGGACTT ^{3'}
OPD-9	5'CTCTGGAGAC ^{3'}	OPD-20	5'ACCCGGTCAC ^{3'}

Cada reação de amplificação por PCR utilizando “primer” aleatório foi realizada em um volume de 25 µl em tubo contendo 20 mM Tris-HCl (pH8,4), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 250 µM de cada dNTP, 0,001% de gelatina, 0,7 µM do “primer”, 50 ng de DNA, 20 µl de óleo mineral (Sigma) e 1,25 U da enzima *Taq* polimerase (Pharmacia). O ciclo aplicado foi: 45x (1min 94°C; 1 min 36°C; 2 min 72°C); 4°C.

5.7.3. rep-PCR

As reações de amplificação por rep-PCR foram realizadas como descrito por Versalovic *et al.*, (1994). Cada reação foi realizada em um volume de 25 µl em tubo contendo 20 mM Tris-HCl (pH8,4), 50 mM KCl, 3,75 mM MgCl₂, 600 µM de cada dNTP, 1 µM do “primer” BOXA1R: 5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG3', 50 ng de DNA, 20 µl de óleo mineral (Sigma) e 1,25 U da enzima *Taq* polimerase (Gibco-BRL). O ciclo aplicado foi: 1x (7 min 95°C); 30x (1 min 94°C; 1 min 53°C; 8 min 65°C); 1x 16 min 65°C; 4°C.

5.7.4. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os fragmentos gerados pelas diferentes reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,4% preparado em tampão TEB, por 3 horas e meia a 90 Volts. A amostra de DNA foi misturada com o corante para eletroforese na proporção do volume de 3 DNA : 1 corante, e em seguida aplicada no gel. Foi incluído nos géis um padrão de tamanho de DNA linear (1 Kb DNA Ladder, Gibco BRL). Os géis foram tratados por 15 min com brometo de etídio (EtBr) na concentração de 2 µg/ml, o DNA foi observado em transiluminador ultra-violeta, em um comprimento de onda de 300nm e fotografado com câmera Polaroid.

5.8. ANÁLISES COMPUTACIONAIS

5.8.1. ANÁLISES DE SIMILARIDADE

As análises de similaridade entre as estirpes foram baseadas na presença e ausência de bandas em cada um dos experimentos de PCR (com os 3 “primers” arbitrários e o “primer” BOXA1R). Em cada caso, uma matriz simples foi obtida e as estirpes comparadas par a par usando o coeficiente “*simple matching*” (SM) e o dendrograma foi construído usando-se o método UPGMA (“unweighted pair group method with arithmetic mean”), como sugerido por Versalovic *et al.* (1994) para bactérias relacionadas, da mesma espécie ou gênero. Para essas análises foi empregado o “software” NTSYS-pc (versão 2.02, Exeter Software, Setauket, New York).

5.8.2. ANÁLISE DE GRUPO

Esta análise foi feita utilizando-se todos os dados obtidos com os 3 “primers” arbitrários e o BOXA1R. O dendrograma foi construído utilizando-se o critério de variância-mínima (Ward) e distância Euclidiana (Rencher, 1995). Os cálculos computacionais foram realizados empregando-se o “software” MATHEMATICA (Wolfram Research Inc., Champaign, III) contendo adaptações feitas por Alberto Nóbrega.

5.8.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos nas análises de AP-PCR e rep-PCR foram submetidos à análise do componente principal (ACP) utilizando-se o “software” MATHEMATICA (Wolfram Research Inc., Champaign, III). Os fatores de maior importância obtidos na análise do componente principal foram utilizados para comparar estatisticamente as estirpes isoladas dos diferentes cultivares de milho através da análise de variância (MANOVA = “Multivariate analysis of variance”). A análise de variância foi realizada com o pacote estatístico do “software” NTSYS-pc.

6. RESULTADOS

6.1. ISOLAMENTO DAS ESTIRPES

As amostras pasteurizadas das rizosferas dos quatro cultivares de milho plaqueadas em meio TBNR deram origem a colônias com diferentes morfologias em meio TBNR, após 3 dias de incubação em condições de anaerobiose. Dentre estas colônias, 70 colônias com aspecto semelhante a de *P. polymyxa* (amarelas brilhantes, convexas e mucosas) foram selecionadas para purificação e posterior identificação bioquímica (16 isolados do cultivar CMS04, 20 isolados do CMS11, 12 isolados do CMS22 e 22 isolados do CMS36). As estirpes foram denominadas de PM seguidas pelo número do cultivar de milho (04, 11, 22 ou 36) e por números progressivos correspondentes aos isolados.

6.2. IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES

Das 70 estirpes previamente selecionadas para o identificação, 67 estirpes apresentaram testes positivos para utilização da L-arabinose, D-xilose, glicerol e trealose; testes negativos para utilização de citrato e de succinato e teste positivo para a produção de hidroxiacetona. Apenas 3 estirpes, pertencentes ao cultivar CMS22, divergiram quanto aos resultados esperados para a espécie *P. polymyxa* (Gordon, Haynes, & Pang, 1973). Estas três estirpes mostraram resultado negativo para a utilização do glicerol, indicando que elas poderiam pertencer à espécie *Paenibacillus peoriae*, como descrito por Montefusco, Nakamura & Labeda (1993) e Heyndrickx *et al.* (1996). A observação de resultados positivos para a utilização de succinato e citrato por estas três estirpes também confirmou nossa suspeita, fazendo com que elas

fossem excluídas deste estudo. As 67 estirpes restantes foram então consideradas como à espécie *P. polymyxa*. Em algumas estirpes esta identificação foi confirmada, através dos resultados, esperados para esta espécie, obtidos utilizando os Kits API 50CH (fermentação com produção de ácido para os carboidratos: glicerol, L-arabinose, ribose, D-xilose, β -metil-xilosideo, galactose, D-glucose, D-frutose, D-manose, manitol, α -metil-D-manosideo, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiose, maltose, lactose, melibiose, sacarose, trealose, inulina, D-rafinose, amido, glicogênio, β -gentiobiose e D-turanose; resultados negativos, sem produção de ácidos para os carboidratos: eritritol, D-arabinose, L-xilose, adonitol, L-sorbose, rhamanose, dulcitol, inositol, sorbitol, N-acetil glucosamina, melezitose, xilitol, D-lixose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, gluconato, 2 ceto-gluconato, 5 ceto-gluconato). Estas 67 estirpes são apresentadas na Tabela 2, juntamente com os cultivares de milho dos quais elas foram isoladas.

Tabela 2. Diferentes grupos formados pela amplificação do DNA total das 67 estirpes de *P. polymyxa* com os “primers” arbitrários e o “primer” BOXA1R.

Cultivares de milho	Estirpes de <i>P. polymyxa</i>	“PRIMERS”				Grupos genotípicos ^b
		OPA-A03	OPA-C17	OPD-2	BOXA1R	
CMS04	PM04-1	Gr.23 ^a	Gr.10	Gr.1	Gr.13	G.1
	PM04-2	Gr.24	Gr.3	Gr.2	Gr.14	G.2
	PM04-3	Gr.2	Gr.8	Gr.3	Gr.15	G.3
	PM04-4	Gr.22	Gr.10	Gr.1	Gr.15	G.4
	PM04-5	Gr.25	Gr.3	Gr.2	Gr.13	G.5
	PM04-6	Gr.21	Gr.5	Gr.3	Gr.15	G.6
	PM04-7	Gr.22	Gr.10	Gr.1	Gr.15	G.4

	PM04-8	Gr.1	Gr.1	Gr.4	Gr.15	G.7
	PM04-9	Gr.24	Gr.3	Gr.2	Gr.6	G.8
	PM04-10	Gr.22	Gr.3	Gr.1	Gr.15	G.9
	PM04-11	Gr.2	Gr.2	Gr.5	Gr.7	G.10
	PM04-12	Gr.26	Gr.1	Gr.6	Gr.7	G.11
	PM04-14	Gr.2	Gr.2	Gr.7	Gr.15	G.12
	PM04-15	Gr.2	Gr.4	Gr.3	Gr.16	G.13
	PM04-16	Gr.27	Gr.3	Gr.2	Gr.14	G.14
	PM04-17	Gr.28	Gr.10	Gr.12	Gr.13	G.15
CMS11	PM11-1	Gr.1	Gr.1	Gr.13	Gr.13	G.16
	PM11-2	Gr.2	Gr.1	Gr.14	Gr.4	G.17
	PM11-3	Gr.1	Gr.1	Gr.13	Gr.6	G.18
	PM11-4	Gr.2	Gr.2	Gr.8	Gr.16	G.19
	PM11-5	Gr.11	Gr.2	Gr.8	Gr.16	G.20
	PM11-6	Gr.1	Gr.1	Gr.13	Gr.16	G.21
	PM11-7	Gr.1	Gr.1	Gr.13	Gr.16	G.21
	PM11-8	Gr.2	Gr.2	Gr.8	Gr.16	G.19
	PM11-9	Gr.4	Gr.3	Gr.13	Gr.16	G.22
	PM11-10	Gr.2	Gr.2	Gr.8	Gr.16	G.19
	PM11-11	Gr.3	Gr.4	Gr.3	Gr.16	G.23
	PM11-12	Gr.4	Gr.5	Gr.3	Gr.16	G.24
	PM11-13	Gr.2	Gr.2	Gr.8	Gr.2	G.25
	PM11-14	Gr.2	Gr.2	Gr.8	Gr.2	G.25

	PM11-15	Gr.15	Gr.1	Gr.17	Gr.2	G.26
	PM11-16	Gr.17	Gr.1	Gr.13	Gr.2	G.27
	PM11-17	Gr.17	Gr.1	Gr.13	Gr.2	G.27
	PM11-18	Gr.16	Gr.1	Gr.13	Gr.2	G.28
	PM11-21	Gr.17	Gr.1	Gr.13	Gr.16	G.29
	PM11-22	Gr.11	Gr.2	Gr.18	Gr.2	G.30
CMS22	PM22-2	Gr.2	Gr.2	Gr.8	Gr.2	G.25
	PM22-4	Gr.4	Gr.3	Gr.16	Gr.3	G.31
	PM22-5	Gr.1	Gr.1	Gr.13	Gr.2	G.32
	PM22-6	Gr.2	Gr.2	Gr.8	Gr.2	G.25
	PM22-7	Gr.2	Gr.2	Gr.8	Gr.13	G.33
	PM22-8	Gr.19	Gr.1	Gr.13	Gr.2	G.34
	PM22-9	Gr.2	Gr.2	Gr.8	Gr.2	G.25
	PM22-11	Gr.20	Gr.9	Gr.10	Gr.5	G.35
	PM22-16	Gr.20	Gr.9	Gr.10	Gr.5	G.35
CMS36	PM36-1	Gr.5	Gr.2	Gr.15	Gr.7	G.36
	PM36-2	Gr.5	Gr.2	Gr.13	Gr.13	G.37
	PM36-3	Gr.6	Gr.5	Gr.3	Gr.13	G.38
	PM36-4	Gr.5	Gr.2	Gr.15	Gr.7	G.36
	PM36-5	Gr.7	Gr.1	Gr.13	Gr.7	G.39
	PM36-6	Gr.5	Gr.3	Gr.13	Gr.7	G.40
	PM36-7	Gr.5	Gr.6	Gr.15	Gr.8	G.41
	PM36-9	Gr.5	Gr.6	Gr.15	Gr.8	G.41

PM36-10	Gr.5	Gr.5	Gr.3	Gr.7	G.42
PM36-11	Gr.8	Gr.1	Gr.16	Gr.7	G.43
PM36-12	Gr.8	Gr.1	Gr.16	Gr.7	G.43
PM36-13	Gr.7	Gr.1	Gr.9	Gr.7	G.44
PM36-14	Gr.18	Gr.7	Gr.11	Gr.11	G.45
PM36-15	Gr.6	Gr.5	Gr.3	Gr.7	G.46
PM36-16	Gr.9	Gr.1	Gr.15	Gr.9	G.47
PM36-17	Gr.10	Gr.11	Gr.15	Gr.12	G.48
PM36-18	Gr.12	Gr.1	Gr.19	Gr.1	G.49
PM36-19	Gr.11	Gr.2	Gr.5	Gr.2	G.50
PM36-20	Gr.10	Gr.5	Gr.3	Gr.10	G.51
PM36-21	Gr.13	Gr.5	Gr.3	Gr.10	G.52
PM36-22	Gr.13	Gr.5	Gr.3	Gr.11	G.53
PM36-23	Gr.14	Gr.3	Gr.20	Gr.12	G.54

^a Grupos de estirpes (**Gr.**) obtidos a partir dos padrões de amplificação do DNA total da estirpe com cada um dos “primers” usados. (Apresentados a seguir nas Figuras e Dendrogramas 1, 2, 3 e 4)

^b Grupos genotípicos (**G.**) formados pela combinação dos dados com os quatro “primers”.

6.3. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

6.3.1. AP-PCR

Inicialmente, os DNAs de quatro estirpes de *P. polymyxa* (PM04-2, PM11-1, PM22-2 e PM36-3) foram amplificados pela técnica de AP-PCR com os 22 “primers” arbitrários apresentados na Tabela 1. Nenhum produto de PCR foi obtido quando

foram utilizados os “primers” OPD-8, 10, 14, 15 e 17, quando os “primers” OPD-3, 9, 11, 13 e 19 foram utilizados, foram observadas somente bandas de alto peso molecular. Os padrões mais reprodutíveis foram observados com os “primers” OPD-2, OPA-A03 e OPA-C17, que geraram 8, 9 e 5 marcadores, respectivamente, dando um total de 22 marcadores de AP-PCR para estas quatro estirpes analisadas (dados não mostrados). As amplificações subsequentes com o DNA genômico de todas as 67 estirpes isoladas com esses três “primers” arbitrários (OPA-A03, OPA-C17 e OPD-2) geraram diferentes padrões de amplificação que puderam ser usados para agrupar as estirpes. Isto é, estirpes que apresentavam o mesmo padrão de amplificação com um determinado “primer” eram reunidas em um grupo (**Gr.**).

Utilizando o “primer” OPAA-03 para verificar a diversidade entre as 67 estirpes isoladas, foram observados 28 padrões de amplificação diferentes (apresentados na Tabela 2), e mostrados a Figura 1.

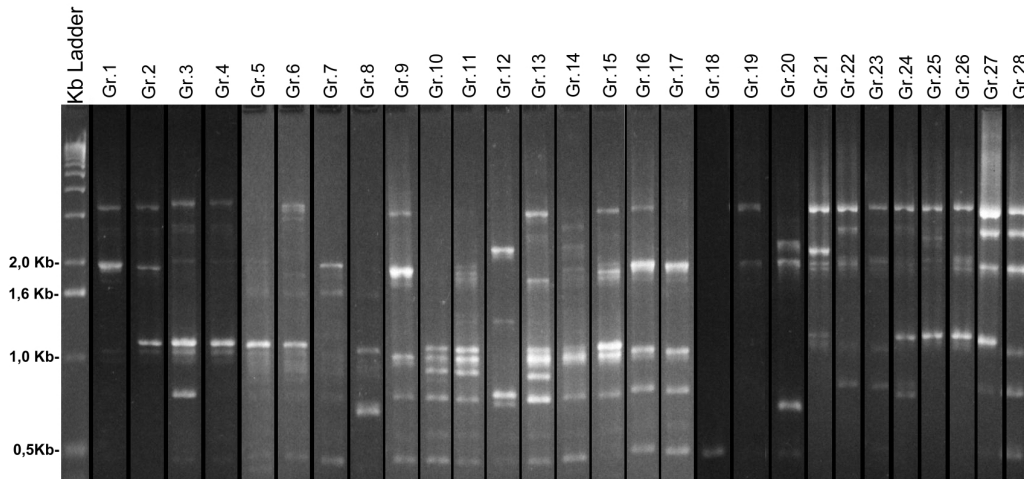


Figura 1: Grupos de estirpes (**Gr.**), apresentados na Tabela 2, obtidos a partir dos padrões de amplificação utilizando o “primer” OPA-A03.

Utilizando o “primer” OPA-C17, as 67 estirpes foram agrupadas conforme o padrão de amplificação observado em 11 grupos (**Gr.**), apresentados na Tabela 2, como mostra a Figura 2:

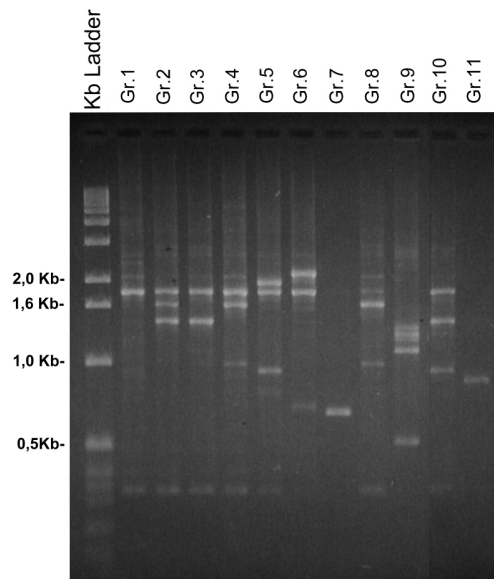


Figura 2: Grupos de estirpes (**Gr.**), apresentados na Tabela 2, obtidos a partir dos padrões de amplificação utilizando o “primer” OPA-C17.

Utilizando o “primer” OPD-2, as 67 estirpes foram agrupadas conforme o padrão de amplificação observado em 20 grupos (**Gr.**), apresentados na Tabela 2, como mostra a Figura 3:

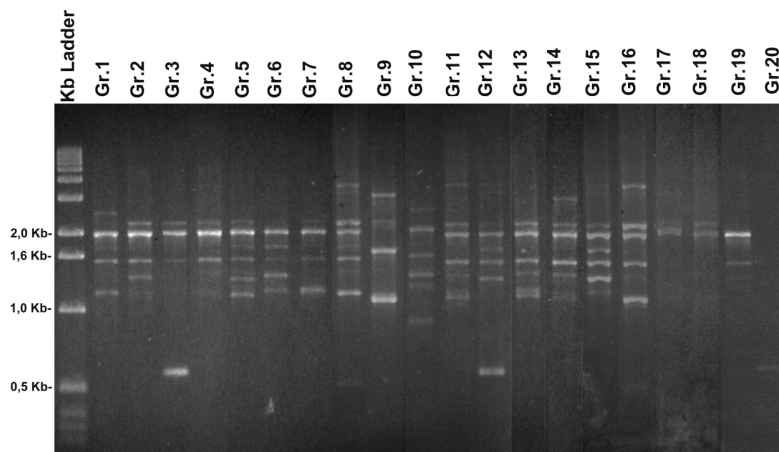


Figura 3: Grupos de estirpes (**Gr.**), apresentados na Tabela 2, obtidos a partir dos padrões de amplificação utilizando o “primer” OPD-2.

6.3.2. BOX-PCR

Utilizando o “primer” BOXA1R, as 67 estirpes foram agrupadas conforme o padrão de amplificação observado em 16 grupos (**Gr.**), apresentados na Tabela 2, como mostra a Figura 4:

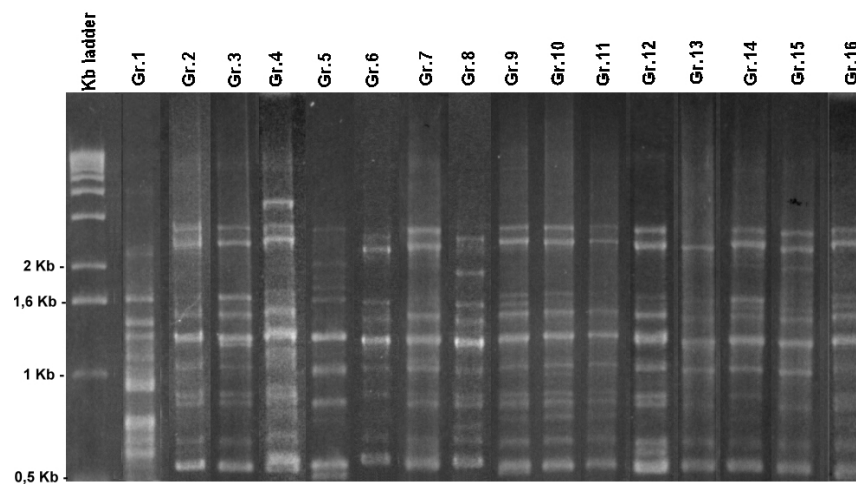


Figura 4: Grupos de estirpes (**Gr.**), apresentados na Tabela 2, obtidos a partir dos padrões de amplificação utilizando o “primer” BOXA1R.

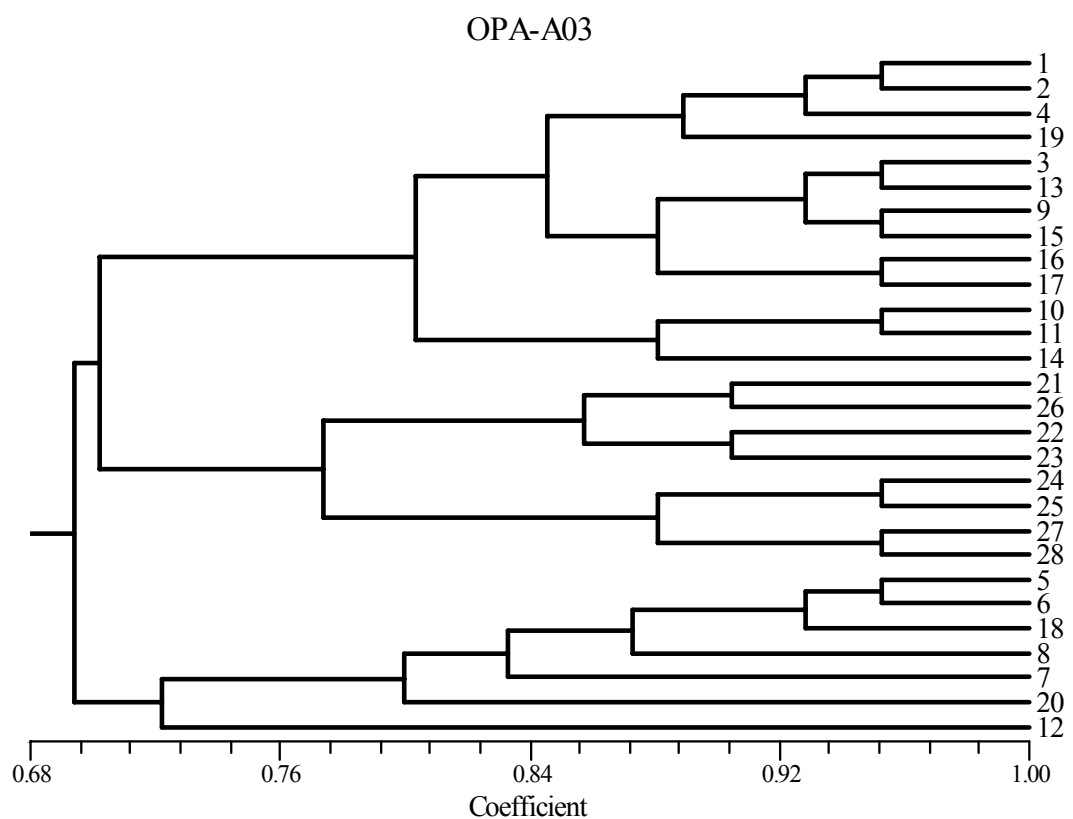
6.4. ANÁLISES COMPUTACIONAIS

6.4.1. ANÁLISES DE SIMILARIDADE

As amplificações usando os “primers” OPA-A03, OPA-C17, OPD-2 e BOXA1R geraram respectivamente 21, 14, 16 e 26 marcadores (bandas de diferentes tamanhos) nos padrões de amplificação das 67 estirpes. A análise de similaridade entre as estirpes foi baseada na presença e ausência de bandas de diferentes tamanhos nos padrões de amplificação, empregando-se o coeficiente SM e o método UPGMA,

o que possibilitou agrupar as 67 estirpes como demonstram os Dendrogramas 1, 2, 3 e 4.

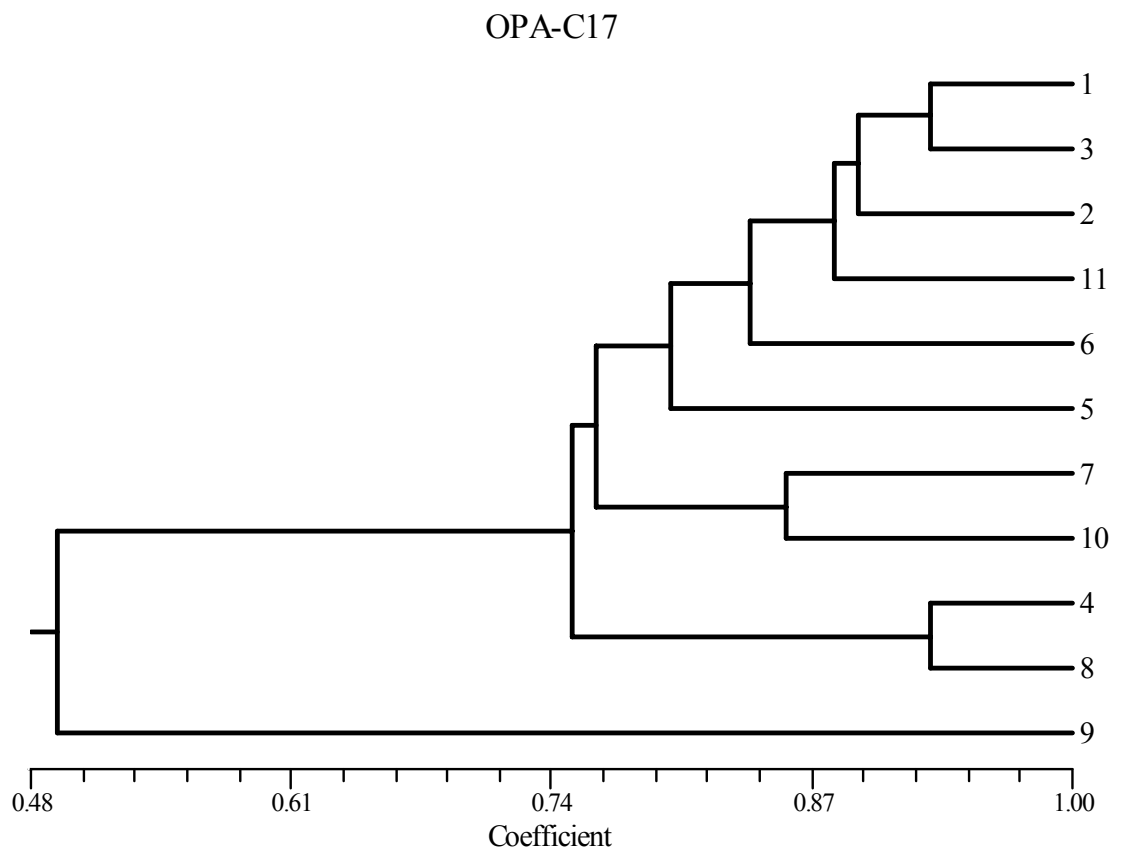
Analisando a combinação de todos os dados (77 marcadores obtidos nas ampliações das 67 estirpes com os quatro “primers”), somente quando o “primer” BOXA1R foi utilizado, uma banda (de aproximadamente 1,2 Kb) foi comum a todas as 67 estirpes estudadas e outra banda de 570 pb foi observada em 66 estirpes (não



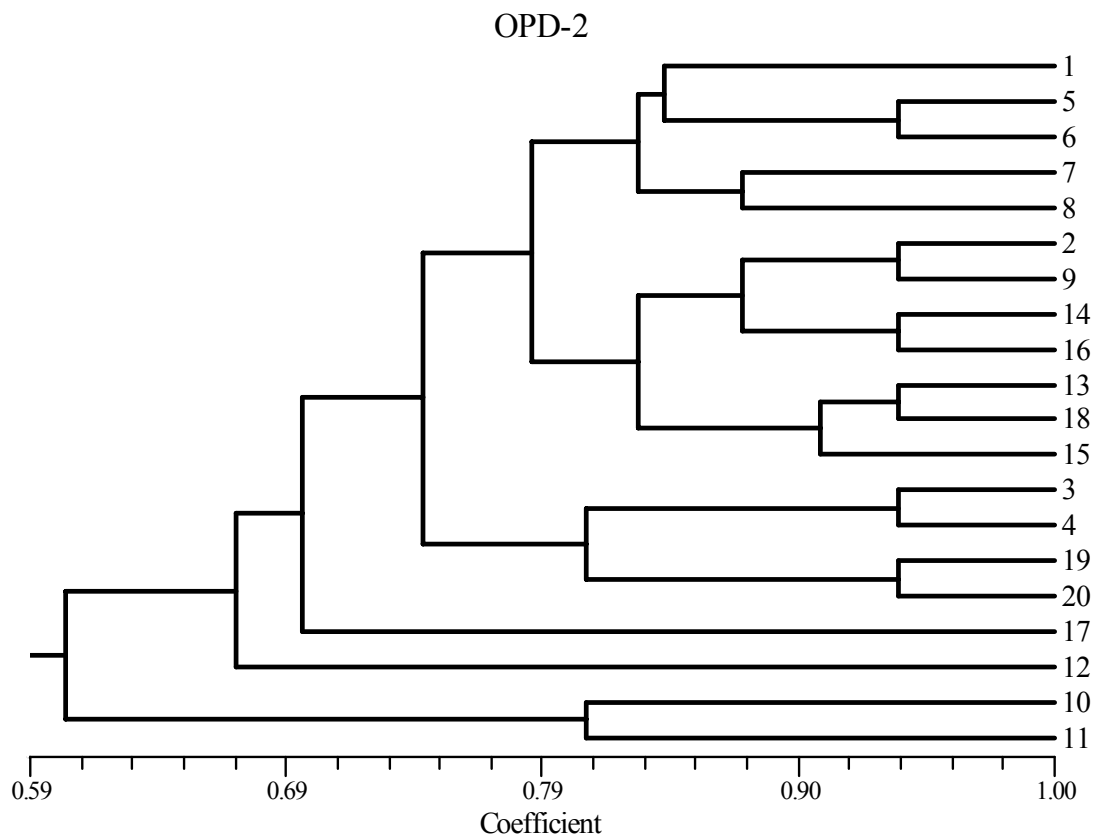
sendo detectada somente na estirpe PM36-18).

Dendrograma 1: Similaridade entre os grupos de estirpes (**Gr.**), formados utilizando os marcadores gerados com o “primer” OPA-A03 e apresentados na Tabela 2 e

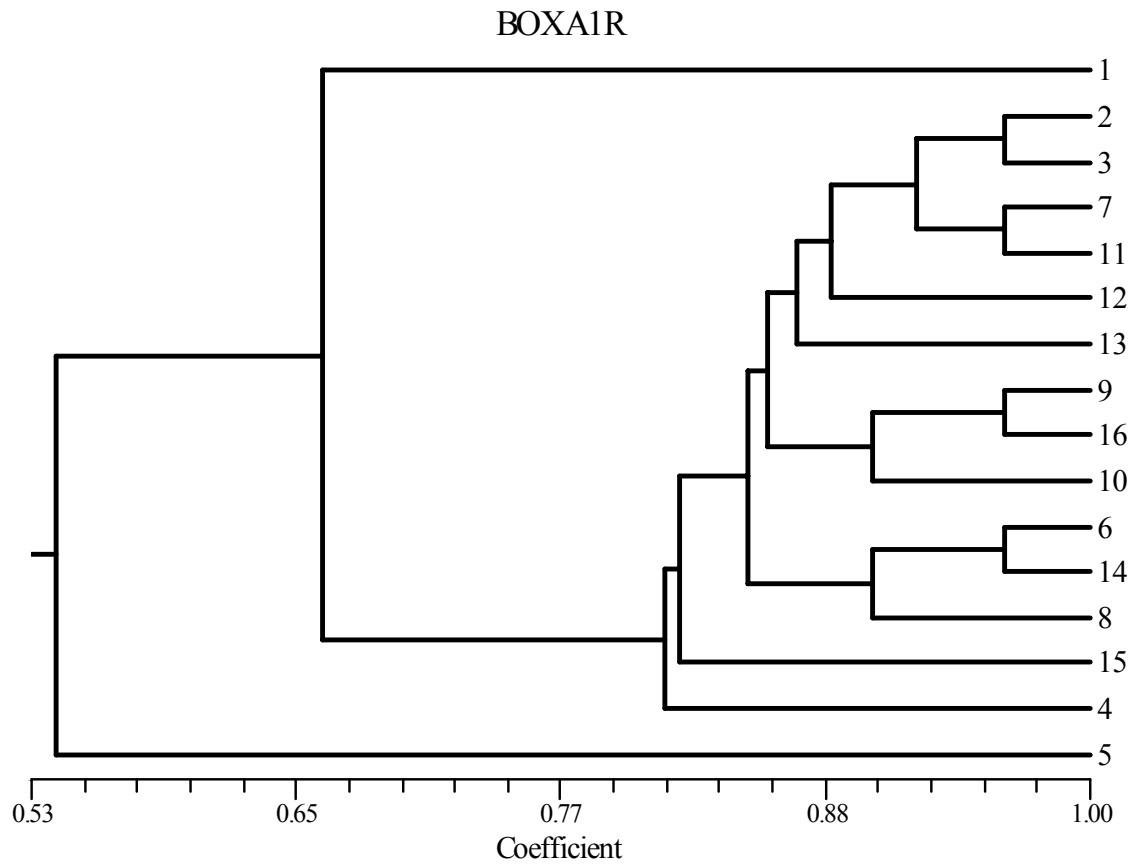
Figura 1.



Dendrograma 2: Similaridade entre os grupos de estirpes (**Gr.**), formados utilizando os marcadores gerados com o “primer” OPA-C17 e apresentados na Tabela 2 e Figura 2.



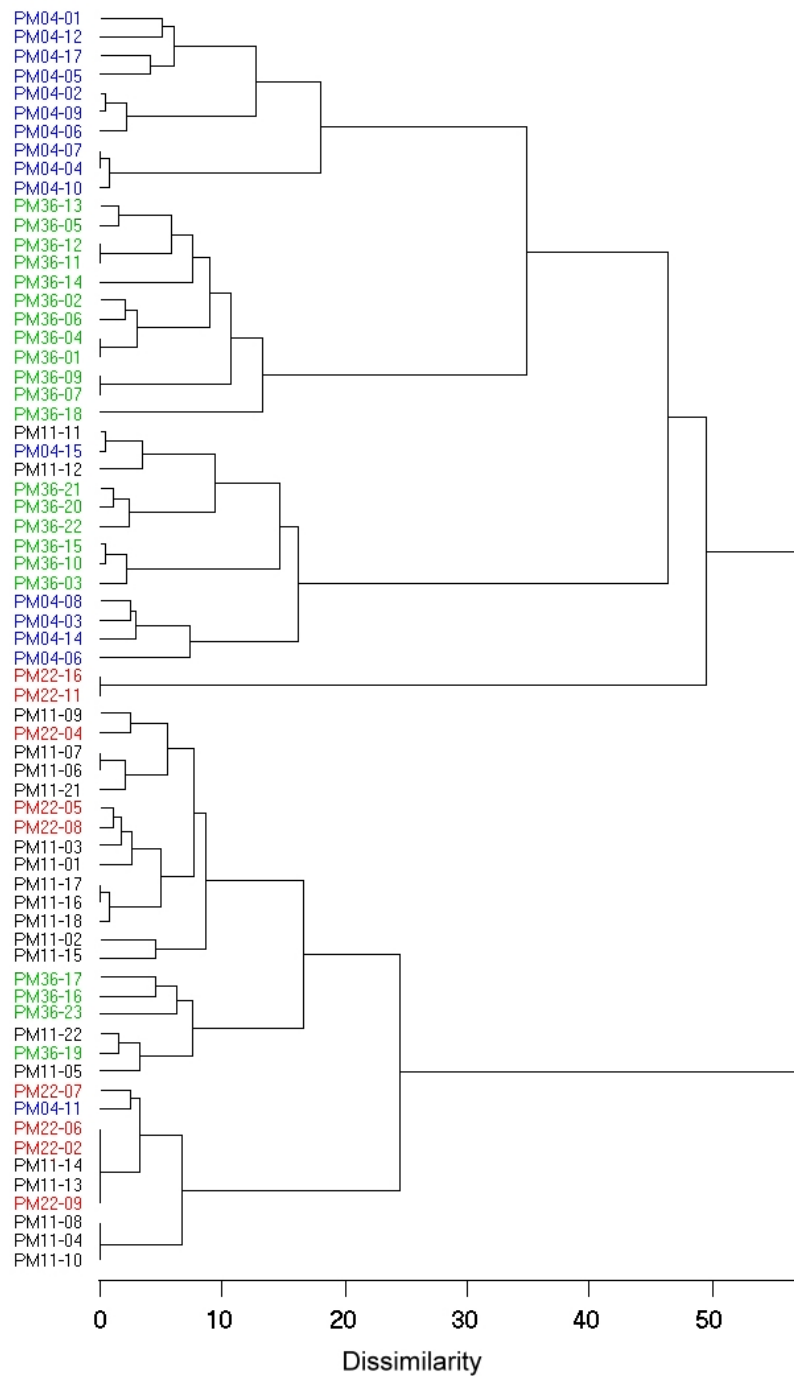
Dendrograma 3: Similaridade entre os grupos de estirpes (**Gr.**) , formados utilizando os marcadores gerados com o “primer” OPD-2 e apresentados na Tabela 2 e Figura 3.



Dendrograma 4: Similaridade entre os grupos de estirpes (**Gr.**) , formados utilizando os marcadores gerados com o “primer” BOXA1R e apresentados na Tabela 2 e Figura 4.

6.4.2. ANÁLISE DE GRUPO

Utilizando todos os dados (77 marcadores obtidos nas ampliações das 67 estirpes com os quatro “primers” OPA-A03, OPA-C17, OPD-2 e BOXA1R) foi realizada uma análise de grupo de acordo com o critério de variância-mínima (Ward) e distância Euclidiana. O resultado obtido é mostrado no Dendrograma 4, no qual as 67 estirpes isoladas foram divididas em 54 grupos genotípicos (G.), apresentados na Tabela 2. Ainda no Dendrograma 4, podemos observar dois grupos principais, denominados I e II. O Grupo I foi formado predominantemente por estirpes isoladas dos cultivares de milho CMS04 e CMS36, enquanto o Grupo II foi formado predominantemente por estirpes isoladas dos cultivares CMS11 e CMS22. Somente uma estirpe do cultivar CMS04 (PM04-11) pode ser encontrada no Grupo II, enquanto que somente duas estirpes isoladas do cultivar CMS11 (PM11-11 e PM11-12) foram encontradas no Grupo I. Os grupos I e II foram formados por 37 e 30 estirpes, respectivamente.



Dendrograma 4: Construído a partir de todos os dados obtidos nos experimentos de PCR, utilizando o método Ward e distância Euclidiana.

6.4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Antes de compararmos as diferentes populações de *P. polymyxa* isoladas de cada um dos 4 cultivares de milho, os dados obtidos com as ampliações por AP-PCR e rep-PCR (77 marcadores) foram primeiramente submetidos à análise do componente principal (ACP), um método multivariado, no qual a dimensão dos parâmetros é reduzida enquanto a maior parte da variância dos dados é preservada. Após este tratamento, a matriz de dados foi comprimida para 67x5 (cinco primeiros fatores resultantes da ACP, os quais representam 56% da variância da população) e 67x8 (oito primeiros fatores, que representam 73% da variância total dentro da população estudada). Para realizar a MANOVA, a matriz contendo os oito primeiros fatores foi utilizada. A população total de *P. polymyxa* (67 estirpes) foi dividida em quatro subpopulações (CMS04, CMS11, CMS22 e CMS36), correspondentes aos isolados de cada um dos quatro cultivares de milho. Os resultados das comparações entre as quatro subpopulações estão apresentados na Tabela 3. Os dados mostram claramente que as estirpes isoladas dos diferentes cultivares de milho são significativamente diferentes ($P=1,7 \times 10^{-7}$). A MANOVA foi realizada para todas as combinações possíveis, três-a-três e dois-a-dois, com as estirpes dos quatro cultivares de milho. Todas as combinações três-a-três foram significativamente diferentes. A maioria das combinações dois-a-dois não foi significativamente diferente. Somente em dois casos, quando a subpopulação isolada do cultivar CMS36 foi comparada com as isoladas dos cultivares CMS04 e CMS11, os resultados mostraram ser significativamente diferentes, sugerindo que as estirpes isoladas deste cultivar distanciam-se das outras. O diagrama apresentado na Figura 5 corresponde à representação em duas dimensões dos resultados da MANOVA, confirmando estas observações.

Tabela 3. MANOVA das 67 estirpes de *P. polymyxa*, isoladas das rizosferas dos quatro cultivares de milho.

Análise canônica variada	Estatístico ^a	F estatístico	P ^b
Cultivares de milho:			
CSM04 x 11 x 22 x 36	1.80	3.81	1.7 x 10 ⁻⁷
CSM04 x 11 x 22	2.13	2.35	0.0075
CSM04 x 22 x 36	2.13	3.36	2.0 x 10 ⁻⁴
CSM11 x 22 x 36	2.09	2.93	7.6 x 10 ⁻⁴
CSM04 x 11 x 36	2.09	3.97	1.0 x 10 ⁻⁵
CSM04 x 11	3.12	2.22	0.058
CSM04 x 22	3.20	1.99	0.114
CSM04 x 36	3.12	3.63	0.0048
CSM11 x 22	3.15	1.68	0.165
CSM11 x 36	3.08	3.61	0.0041
CSM22 x 36	3.15	2.23	0.065

^aTeste multivariado de significância (valor de lambda Wilk's)

^bP, probabilidade de ocorrência de variância extrema.

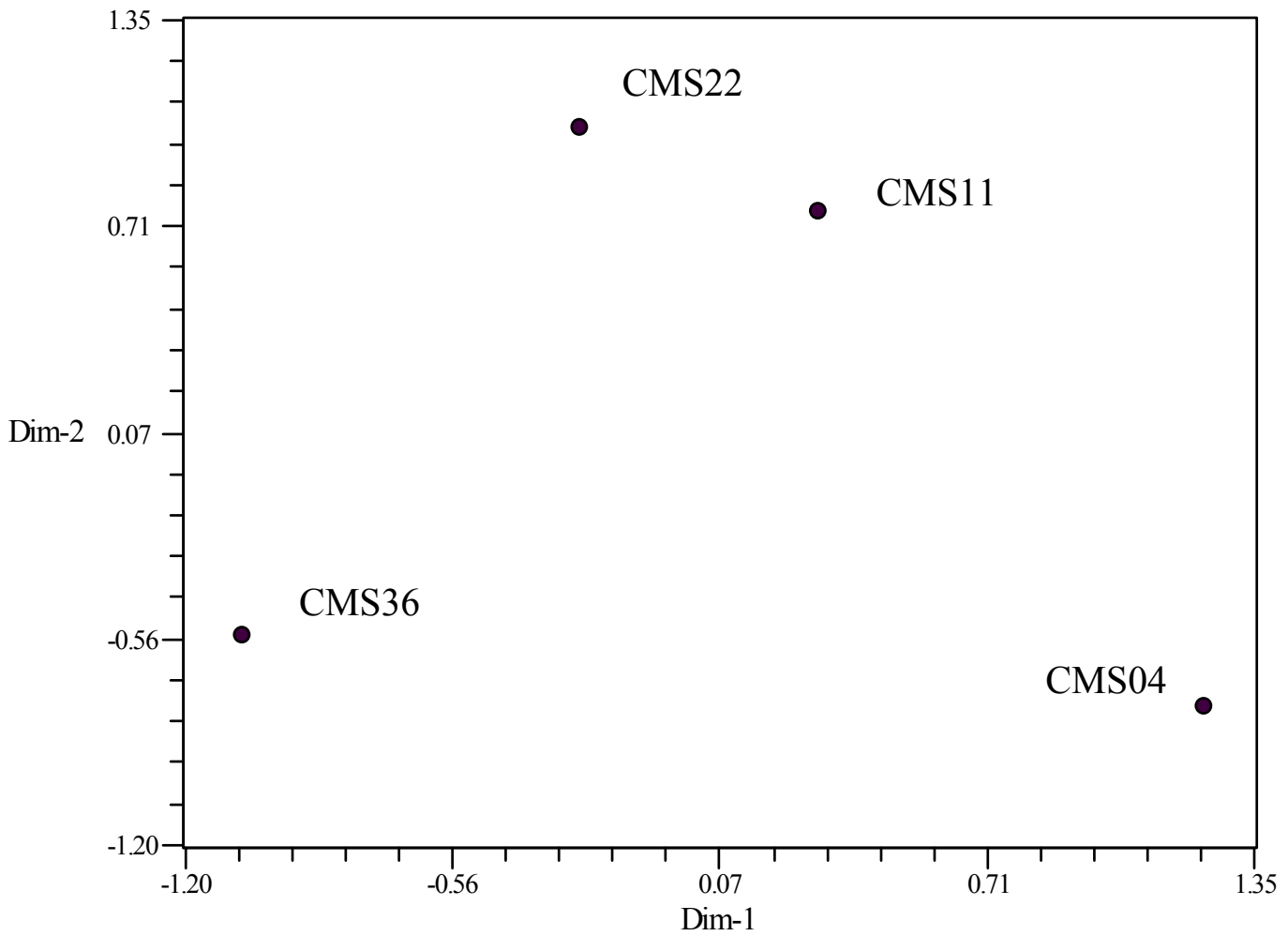


Figura 5. Representação em duas dimensões dos resultados da MANOVA das subpopulações de estirpes isoladas dos diferentes cultivares de milho.

7. DISCUSSÃO:

Tem sido mostrado que a diversidade bacteriana é afetada pela quantidade e composição de materiais orgânicos excretados pelas raízes das plantas (exudatos), e que estes podem variar em diferentes cultivares ou durante o desenvolvimento da planta (Neal, Ackinson & Larson, 1970; Neal & Larson, 1976; Chanway, Holl & Turkington, 1998).

Neste estudo foi analisada a diversidade genética de 67 estirpes de *P. polymyxa*, que foram isoladas da rizosfera de quatro diferentes cultivares de milho plantados em solo de cerrado. Estirpes de *P. polymyxa* já haviam sido descritas na rizosfera de milho (von der Weid, *et al.* 2000), entretanto não haviam dados sustentando a seleção de subpopulações específicas de *P. polymyxa* em diferentes cultivares.

As técnicas de AP-PCR e rep-PCR se mostraram eficientes na discriminação das 67 estirpes isoladas. Um alto nível de diversidade genética foi encontrado dentro da população de *P. polymyxa* isolada neste estudo, o que é demonstrado pelos 54 grupos genotípicos (G.) distintos apresentados na Tabela 2.

Os quatro Dendrogramas 1, 2, 3 e 4, construídos baseados nos dados obtidos com cada um dos “primers” separadamente, não apresentam exatamente a mesma relação filogenética entre as estirpes. Porém eles nos permitem separar as estirpes isoladas em grupos geneticamente relacionados (Tabela 2). As estirpes desses grupos podem pertencer a um ancestral comum ou serem estirpes co-isoladas. Diferenças entre as estirpes isoladas foram mostradas claramente nos dendrogramas, independente dos “primers” utilizados para a construção destes. Em um estudo anterior, von der Weid *et al.* (2000) demonstraram que estirpes de *P. polymyxa* isoladas de milho (cultivar BR-201) também foram heterogêneas. Além disto, eles

foram capazes de associar a diversidade da população de *P. polymyxa* presente na rizosfera aos diferentes estágios de desenvolvimento do milho plantado em solo de cerrado. A diversidade de estirpes associadas com o crescimento do milho também foi demonstrada por Seldin *et al.*, (1998) trabalhando com *Paenibacillus azotofixans*. Mc Arthur, Kovacic & Smith, (1988) e Di Cello *et al.*, (1997) também conseguiram estabelecer esta relação trabalhando com *Burkholderia cepacia*.

No estudo apresentado foram fixados 90 dias após o plantio do milho para conduzir o isolamento das estirpes, baseado nas observações de Hamlen, Lukezic & Bloom., (1972) de que os exudatos das plantas, os quais representam fontes nutricionais para microrganismos da rizosfera podem influenciar a comunidade microbiana. Sendo assim o estágio médio-final do crescimento do milho (aproximadamente 90 dias) deveria representar um ecossistema mais estável quando comparado com ecossistemas de plantas muito jovens ou em declínio.

Para compreender melhor como a variabilidade genética da população de *P. polymyxa* foi influenciada pelos cultivares de milho, os marcadores obtidos com o AP-PCR e rep-PCR foram agrupados de acordo com o critério de variância-mínima utilizando distância Euclidiana (Dendrograma 4). Dois grupos principais foram observados, um formado basicamente por estirpes isoladas dos cultivares CMS04 e CMS36 e o outro formado basicamente por estirpes isoladas dos cultivares CMS11 e CMS22. A Figura 5 também mostra uma grande proximidade entre as subpopulações isoladas destes dois últimos cultivares. Esses dois cultivares CMS11 e CMS22 foram originados dos germoplasmas do México e Caribe, esta poderia ser uma explicação para esta proximidade encontrada entre as subpopulações isoladas destes dois cultivares.

Quando os dados das análises de PCR (AP-PCR e rep-PCR) foram posteriormente utilizados na MANOVA, o problema gerado por diferenças no número de estirpes isoladas de cada um dos cultivares e o baixo número de estirpes (67) em

relação ao número de parâmetros analisados (77 marcadores) foi minimizado pelo tratamento da matriz pela ACP, o que possibilitou a compressão da matriz de dados em 67x8, utilizando os 8 primeiros fatores que representam 73% da variância total da população estudada. O número de estirpes isoladas foi no mínimo oito vezes maior do que o número de parâmetros analisados na MANOVA (8 fatores), tornando o tamanho da amostra (67 estirpes) estatisticamente robusto, preservando a maior parte (73%) da variância encontrada na população. Os resultados da MANOVA, assim como os resultados da análise de grupo, mostraram que os cultivares de milho afetaram significativamente a diversidade das populações de *P. polymyxa* (Tabela 3 e Figura 5). Isto pode ser observado claramente quando as estirpes isoladas do cultivar CMS36 foram comparadas com as demais subpopulações isoladas dos outros cultivares (Tabela 3), o que sugere que a planta tenha selecionado uma subpopulação de *P. polymyxa* específica. É importante apontar que este cultivar é o mais bem adaptado as condições tropicais e ao solo ácido do Cerrado, dentre os cultivares estudados. Resultados similares tem sido descritos por Paffeti *et al.* (1996) e Carelli *et al.* (2000) em cultivares de alfafa e populações de *Sinorhizobium meliloti* e por Garcia de Salomone *et al.*, (1996) em um cultivar de milho associado com *Azospirillum*. Em todos esses casos o cultivar influenciou significativamente na distribuição da variabilidade genética de populações específicas.

As descobertas apresentadas enfatizam a importância da seleção de estirpes de *P. polymyxa* para serem usadas como inoculantes de milho em solo de cerrado, entretanto mais estudos são necessários para avaliar o potencial efetivo dessas estirpes como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABDEL-WAHAB, A.M. (1975) Nitrogen fixation by *Bacillus* strains isolated from rhizosphere of *Amnophila arenaria*. *Plant Soil* **42**: 703-708.

BASHAN, Y. & LEVANONY, H. (1990) Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* **36**: 591-608.

BERG, D.E., AKOPYANTS, N.S. & KERSULYTE, D. (1994) Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method. *Methods Mol. Cell. Biol.* **5**: 13-24.

CARELLI, M., GNOCCHI, S., FANCELLI, S., MENGONI, A., PAFFETTI, D., SCOTTI, C. & BAZZICALUPO, M. (2000) Genetic diversity and dynamics of *Sinorhizobium meliloti* populations nodulating different alfalfa cultivares in Italian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4785-4789.

CHANWAY, C.P., HOLL, F.B. & TURKINGTON, R. (1988) Genotypic coadaptation in plant growth promotion of forage species by *Bacillus polymyxa*. *Plant Soil* **106**: 281-284.

DAVISON, J. (1988) Plant beneficial bacteria. *Biotechnol.* **6**: 282-286

DÉFAGO, G., DUFFY, B.K. & KEEL, C. (1994) Risk assessment for the release of plant growth-promoting rhizobacteria. **In:** "Proceedings of the third international workshop on plant growth-promoting rhizobacteria". pp. 254 CSIRO Adelaide, Australia.

DI CELLO, F., BEVIVINO, A., CHIARINI, L., FANI R., PAFFETTI D., TABACCHIONI S. & DALMASTRI C. (1997) Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4485-4493.

GARCIA DE SALOMONE, I.E., DÖBEREINER, J., URQUIAGA, S. & BODDEY, R.M. (1996) Biological nitrogen fixation in Azospirillum strain-maize genotype associations as evaluated by the ^{15}N isotope dilution technique. *Biol. Fertil. Soils* **23**: 249-256.

GLICK, B.R. (1995) The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**: 109-117.

GORDON, R.E., HAYNES, W.C. & PANG, H.N. (1973) The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook n°427. US Department of Agriculture, Washington, DC.

GUEMOURI-ATHMANI, S., BERGE, O., BOURRAIN, M., MAVINGUI, P., THIÉRY, J.M., BHATNAGAR, T. & HEULIN, T. (2000) Diversity of *Paenibacillus polymyxa* in the rhizosphere of wheat (*triticum durum*) in Algerian soils. *Eur. J. Soil Biol.* **36**: 149-159.

HAMLEN, R.A., LUKEZIC, F.L. & BLOOM, J.R. (1972) Influence of age and stage of development on the neutral carbohydrate components in root exudates from alfalfa plants grown in a gnotobiotic environment. *Can. J. Plant Sci.* **52**: 633-642.

HEYNDRICKX, M., VANDEMEULEBROECKE, K., SCHELDEMAN, P., KERSTERS, K., DE VOS, P., LOGAN, N.A., AZIZ, A.M., ALI, N. & BERKELEY, R.C.W. (1996) A polyphasic reassessment of genus *Paenibacillus* reclassification of *Bacillus lautus* (Nakamura 1984) as *Paenibacillus lautus* comb. nov. and *Bacillus peoriae* (Montefusco *et al.* 1993) as *Paenibacillus peoriae* comb. nov., and emended description of *P. lautus* and *P. peoriae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 988-1003.

HOLL, F.B. (1983) Plant genetics: manipulation of the host. *Can. J. Microbiol.* **29**: 945-953.

HOLL, F.B. & CHANWAY, C.P. (1992) Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Can. J. Microbiol.* **38**: 303-308.

HOLL, F.B., CHANWAY, C.P., TURKINGTON, R. & RADLEY, R.A. (1988) Response of crested wheatgrass (*Agropyron cristatum* L.), perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and white clover (*Trifolium repens* L.) to inoculation with *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.* **20**: 19-24.

JORDAN, D.C., McNICOL, P.J. & MARSHALL, M.R. (1978) Biological nitrogen-fixation in the terrestrial environment of a high arctic ecosystem (Truelove Lowland, Devon Island, N.W.T). *Can. J. Microbiol.* **24**:643-649

JURGENSEN, M.F. & DAVEY, C.B. 1971. Nonsymbiotic nitrogen-fixing microorganisms in forest and tundra soils. *Plant Soil* **34**: 341-356.

KHAMMAS, K.M. & KAISER, P. (1992) Pectin decomposition and associated nitrogen fixation by mixed cultures of *Azospirillum* and *Bacillus* species. *Can. J. Microbiol.* **38**: 794-797.

KLOEPPER, J.W., LIFSHITZ, R. & ZABLOTOWICZ, R.M. (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol.* **7**: 39-44.

KLOEPPER, J.W. & SCHROTH, M.N. (1978) Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. **In**: "Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria". pp. 879-882., Angers, France.

KUNDU, B.S., & GAUR, A.C. (1980) Establishment of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere and their effect on yield and nutrient uptake of wheat crop. *Plant Soil* **57**: 223-230.

LAMBERT, B. & JOOS, H. (1989) Fundamental aspects of rhizobacterial plant growth promotion research. *Trends Biotechnol.* **7**: 215-219.

LATOUR, X., CORBERAND, T., LAGUERRE, G., ALLARD, F. & LEMANCEAU, P. (1996) The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2449-2456.

LYNCH, S.M. (1990) Beneficial interactions between microorganisms and roots. *Biotechnol. Adv.* **8**: 335-346.

MAVINGUI, P. & HEULIN, T. (1994) *In vitro* chitinase antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane populations of *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 801-803.

MAVINGUI, P., LAGUERRE, G., BERGE, O. & HEULIN, T. (1992) Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1894-1903.

MC ARTHUR, J.V., KOVACIC, D.A. & SMITH, M.H. (1988) Genetic diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 9621-9624

MONTEFUSCO, A., NAKAMURA, L.K., LABEDA, D.P., (1993) *Bacillus peorieae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 388-390.

NEAL Jr, J.R., ACKINSON, T.G. & LARSON, R.I. (1970) Changes in the rhizosphere microflora of spring wheat induced by disomic substitution of a chromosome. *Can. J. Microbiol.* **16**: 153-158.

NEAL Jr, J.R. & LARSON, R.I. (1976) Acetylene reduction by bacteria isolated from the rhizosphere of wheat. *Soil. Biol. Biochem.* **8**: 151-155.

O'NEIL, G.A, CHANWAY, C.P., AXELROOD, P.E., RADLEY, R.A & HOLL, F.B. (1992) An assessment of spruce growth response specificity after inoculation with coexistent rhizosphere bacteria. *Can. J. Bot.* **70**: 2347-2353.

PAFFETTI, D., SCOTTI, C., GNOCCHI, S., FANCELLI, S. & BAZZICALUPO, M. (1996) Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2279-2285.

PERSING, D.H., SMITH, T.F., TENOVER, F.C. & WHITE, T.J. (eds) (1993) Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. Washington, DC: American Society for Microbiology.

PETERSEN, D.J., SRINIVASAN, M. & CHANWAY, C.P. (1996) *Bacillus polymyxa* stimulates increased *Rhizobium etli* populations and nodulation when co-resident in the rhizosphere of *Phaseolus vulgaris*. FEMS Microbiol. Lett. **142**: 271-276.

PIURI, M., SANCHEZ-RIVAS, C. & RUZAL, S.M. (1998) A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. Letters Appl. Microbiol. **27**: 9-13.

PRIEST, F.G. (1993) Systematics and Ecology of *Bacillus* **In**: “*Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics”. (ed). Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. & Losick, R. American Society for microbiology, Washington, D.C.

RADEMAKER, J.L.W., LOUWS, F.J. & DE BRUIJN (1998) Characterization of diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting **In**: “Molecular Microbial Ecology Manual”. (ed). Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., Bruijn, F.J. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

RENCHER, A.C. (1995) **In**: Methods of Multivariate analysis. John Wiley & Sons, Inc. A Wiley-Interscience Publication, New York.

RENNIE, R.J., DE FREITAS, J.R., RUSCHEL, A.P. & VOSE, P.B. (1982) Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.) Can. J. Microbiol. **28**: 462-467.

ROSADO, A.S. & SELDIN, L. (1993) Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa* . World J. Microbiol. Biotechnol. **9**: 521-528.

SELDIN, L., AZEVEDO, F. S., ALVIANO, D. S., ALVIANO, C. S. & BASTOS, M. C. F. (1999) Inhibitory activity of *Paenibacillus polymyxa* SCE2 against human pathogenic micro-organisms. *Lett. Appl. Microbiol.* **28**: 423-427.

SELDIN, L. & DUBNAU, D. (1985) DNA homology among *Bacillus polymyxa*, *Bacillus macerans*, *Bacillus azotofixans* and others nitrogen fixing *Bacillus* strains. *Int. Syst. Bacteriol.* **35**: 151-154.

SELDIN, L. & PENIDO, E. C. G. (1986) Identification of *Bacillus azotofixans* using API tests. *Antonie van Leeuwenhoek* **52**: 403-409.

SELDIN, L., ROSADO, A. S., CRUZ, D. W., NOBREGA, A., VAN ELSAS, J. D. & PAIVA, E. (1998). Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere and non-root-associated soil from maize planted in two different brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3860-3868.

SELDIN, L., VAN ELSAS, J.D. & PENIDO, E.C.G. (1983) *Bacillus* nitrogen fixers from Brazilian soils. *Plant Soil* **70**: 243-255.

SELDIN, L., VAN ELSAS, J.D. & PENIDO, E.G. (1984) *Bacillus polymyxa* bacteriophages from Brazilian soils. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **50**: 39-51.

SHISHIDO, M., LOEB, B. M. & CHANWAY, C. P. (1995) External and internal root colonization of lodgepole pine seedlings by two growth-promoting *Bacillus* strains originated from different root microsites. *Can. J. Microbiol.* **41**: 703-713.

VERSALOVIC, J., KOEUTH, T. & LUPSKI, J.R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**: 6823-6831

VERSALOVIC, J., SCHNEIDER M., BRUIJN, F.J. & LUPSKI, J. (1994) Genomic fringerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell Biol.* **5**: 71-77.

VON DER WEID, I., PAIVA, E., NÓBREGA, A., VAN ELSAS, J.D. & SELDIN, L. (2000) Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in Cerrado soil. *Res. Microbiol.* **151**: 369-381.

WANG, G., WHITTAM, T., BERG, C.M. & BERG, D.E. (1993) RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. *Nucleic Acids Res.* **21**: 5930-5933.

WALKER, R., POWELL, A.A & SEDDON, B. (1998) *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf french beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 791-801.

WELSH, J. & McCLELLAND, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 7213-7218.

WELSH, J. & McCLELLAND, M. (1993) Characterization of pathogenic microorganisms by genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR. **In**: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (eds): *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp 595-602.

WILLIAMS, J.G.K., HANAFEY, M.K, RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. (1993) Genetic Analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol.* **218**: 704-740.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535.