

102

UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS A GRAMÍNEAS. *Rene Arderius Soares, Geancarlo Zanatta, Luciane Maria Pereira Passaglia (orient.)* (Departamento de Genética, Instituto de

Biociências, UFRGS).

Devido à grande importância ecológica e econômica da fixação biológica do nitrogênio FBN, torna-se necessário o mapeamento da diversidade dos organismos diazotróficos associados a gramíneas no nosso estado. Foram coletadas amostras (raiz, parte aérea e solo rizosférico) da gramínea de cobertura aveia preta (*Avena strigosa*) de seis localidades, situadas nas regiões norte e nordeste do estado para o início desse trabalho. Das amostras coletadas foi extraído o DNA das bactérias. Esse material foi utilizado como molde em PCRs, onde foram utilizados oligonucleotídeos degenerados, que amplificam uma região do gene *nifH*, um dos genes responsáveis pela síntese da nitrogenase. Alíquotas dos fragmentos amplificados nessas reações serviram como DNA-molde para uma segunda reação de amplificação. Nesse caso, os oligonucleotídeos iniciadores anelaram em uma região interna do fragmento anteriormente amplificado, resultando em fragmentos de tamanhos entre 314 a 317 nucleotídeos. As seqüências nucleotídicas dessa mesma região de diversas bactérias diazotróficas disponíveis foram alinhadas e, a partir desse alinhamento, foram previstos os padrões de restrição para as enzimas *TaqI* e *HaeIII*. Alguns desses padrões foram verificados na prática, onde amostras amplificadas do fragmento de 314/317 nucleotídeos do gene *nifH*, obtidas da amplificação do DNA de bactérias diazotróficas isoladas, foram clivadas com as mesmas enzimas. Os fragmentos amplificados a partir dos DNAs das amostras ambientais também foram clivados. Os produtos das clivagens foram analisados em géis de acrilamida 10%, corados com nitrato de prata e os padrões obtidos foram comparados com os padrões conhecidos ou esperados, através do programa *KBcalc*. Através da análise dos géis foi possível estimar a presença e a diversidade dos microrganismos diazotróficos nas amostras ambientais. Para a validação desse método de análise, os fragmentos amplificados do DNA extraído de duas amostras ambientais, solo e parte aérea da planta, do ponto de coleta número seis, foram clonados em *pUC18* e estão sendo seqüenciados. (FAPERGS/IC).