

362

ISOLAMENTO DE REGIÕES GENÔMICAS DIFERENCIAIS ENTRE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO AZOSPIRILLUM. Ricardo Cecagno, Luciane M P Passaglia¹, Irene S Schrank² (Dep Genética¹, Dep Bio. Mol. e Biotec²- Centro de Biotecnologia, UFRGS)

O gênero *Azospirillum* compreende espécies que realizam a fixação do nitrogênio molecular tanto em associação com diferentes gramíneas economicamente importantes, como em vida livre no solo. A complexidade do sistema de fixação biológica do nitrogênio demonstra que, apesar do complexo nitrogenase apresentar similaridade estrutural e funcional entre as bactérias diazotróficas, existem diferenças já observadas entre as espécies de *A. brasilense* e *A. amazonense*. A utilização da metodologia de RDA (representational difference analysis) permite isolar seqüências gênicas presentes preferencialmente na espécie *A. amazonense* que poderão contribuir para o entendimento da diversidade entre as espécies e estabelecer características únicas de *A. amazonense* que participam na associação da bactéria com as plantas específicas. A técnica de RDA inicia com a obtenção de uma "representação" de cada genoma que está sendo comparado, utilizando PCR para amplificar os fragmentos do genoma que está ligado aos oligonucleotídeos. Desta forma são amplificados preferencialmente fragmentos que estão presentes em uma população de DNA não estando presente na outra população. O protocolo utilizado para analisar as diferenças entre *A. amazonense* e *A. brasilense* descrito por Tinsley e Nassif (1996), foi modificado do original de Lisitsyn *et alli* (1993). Neste protocolo 25 µg do DNA de *A. amazonense* foram totalmente digeridos com *Sau3A*. Os fragmentos foram extraídos com fenol/clorofórmio, precipitados com isopropanol e ligados com os oligonucleotídeos RBam 12/RBam24. O DNA de *A. brasilense* (40 µg) foi digerido mecanicamente (nebulização) para obtenção dos fragmentos variando de 3 a 4 kb. Os fragmentos do DNA de *A. brasilense* foram misturados com um excesso de 100:1 com os fragmentos obtidos de *A. amazonense* e precipitados com isopropanol. A mistura contendo as duas populações de DNA foi desnaturada a 100°C e imediatamente colocada na temperatura de hibridização durante 24 horas. A amplificação subtrativa por PCR foi realizada em 30 ciclos utilizando como *primer* o oligonucleotídeo RBam24. Foram realizadas algumas alterações na metodologia original permitindo a padronização da técnica de RDA e os resultados demonstram que a temperatura ideal de hibridização entre as espécies de *Azospirillum* é de 68 °C, pois estes DNAs contém alto conteúdo GC. (BIC UFRGS)