

409

IDENTIFICAÇÃO POR MÉTODOS MOLECULARES DE ORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS ENDOFÍTICOS E DE SOLO. Soares, R. A.; Jacques, G; Cecagno, R; Roesch, L. F; Passaglia, L. M. P. (Centro de Biotecnologia, Departamento de Genética e Microbiologia dos Solos, UFRGS).

Os organismos diazotróficos são os únicos capazes de transformar o nitrogênio gasoso atmosférico, que está na forma N_2 e inacessível aos demais organismos, em formas assimiláveis, como, por exemplo, a amônia. O grande interesse em torno destes microrganismos é tanto econômico quanto ecológico, pois através da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) a indústria agrícola economiza grande parte de seus gastos com adubação. Além disso, a utilização do nitrogênio como adubo causa danos ao meio ambiente, sendo um deles a lixiviação do mesmo, que pode contaminar as diversas fontes de águas existentes. A metodologia utilizada para a identificação de diazotróficos neste trabalho está baseada na existência de seqüências conservadas que codificam a enzima nitrogenase, esta sendo a principal enzima responsável pela FBN. Nas amostras de solo, a lise é feita *in situ*, onde o material genético das bactérias é separado do restante dos componentes celulares, precipitado e purificado de impurezas e substâncias contaminantes presentes no solo, que precipitam junto com o DNA. Nas amostras de planta, a lise é feita *ex situ*, de forma que existe uma prévia separação das bactéria e dos tecidos vegetais. Essa separação se dá através de lavagem do tecido vegetal, que é cortado em pequenos pedaços e fica sob agitação para que as bactérias se libertem e passem para a solução. Nas etapas seguintes, as bactérias são separadas, lisadas e o DNA é extraído e purificado. Para averiguar a existência de bactérias diazotróficas nas diferentes amostras ambientais, o DNA extraído é utilizado como molde em reações de PCR, onde são utilizados oligonucleotídeos específicos, que foram projetados a partir de uma região bastante conservada do gene *nifH*. Fragmentos ao redor de 300 pares de bases (pb), correspondentes ao tamanho esperado, foram obtidos com amostras de DNA extraídas do solo e raízes de milho. Uma amplificação inespecífica foi obtida com DNA obtido de amostras do colmo das mesmas plantas. Os fragmentos amplificados foram hibridizados com o fragmento de 300 pb do gene *nifH* de *A. brasilense*. Um sinal específico de hibridização foi obtido. Os fragmentos amplificados serão, agora, utilizados em experimentos de SSCP e clonagem. (Fapergs e PROPESQ-UFRGS)