

103

ANALISE DE DIFERENÇAS REPRESENTATIVAS ENTRE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO AZOSPIRILLUM. Ricardo Cecagno, Irene Silveira Schrank (orient.) (Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, 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 na espécie *A. amazonense* que poderão contribuir para o entendimento da diversidade entre as espécies. O protocolo descrito utiliza 25 µg do DNA de *A. amazonense* totalmente digeridos com *Sau3A* e ligados com os oligonucleotídeos RBam12/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 e hibridizados durante 24 horas. A amplificação subtrativa por PCR foi realizada utilizando como primer o oligonucleotídeo RBam24. Foram necessárias algumas alterações na metodologia original permitindo a padronização da técnica de RDA. Os fragmentos originados no RDA foram clonados no vetor pUC18 *SmaI* defosforilado. Foram obtidos 200 clones após a transformação e o sequenciamento de 60 clones revelou a presença de fragmentos de diferentes tamanhos em 35 destes clones. A análise das seqüências destes clones revelou similaridade com diversos genes presentes nos bancos de dados (GenBank). Após esta padronização foi iniciada uma nova metodologia de RDA que parte de 2 µg de DNA e utiliza diluições dos produtos de PCR para a preparação do TESTER/DRIVER o que poderá contribuir para a diminuição de falsos-positivos. Financiamento: FAPERGS. (PIBIC/CNPq-UFRGS).