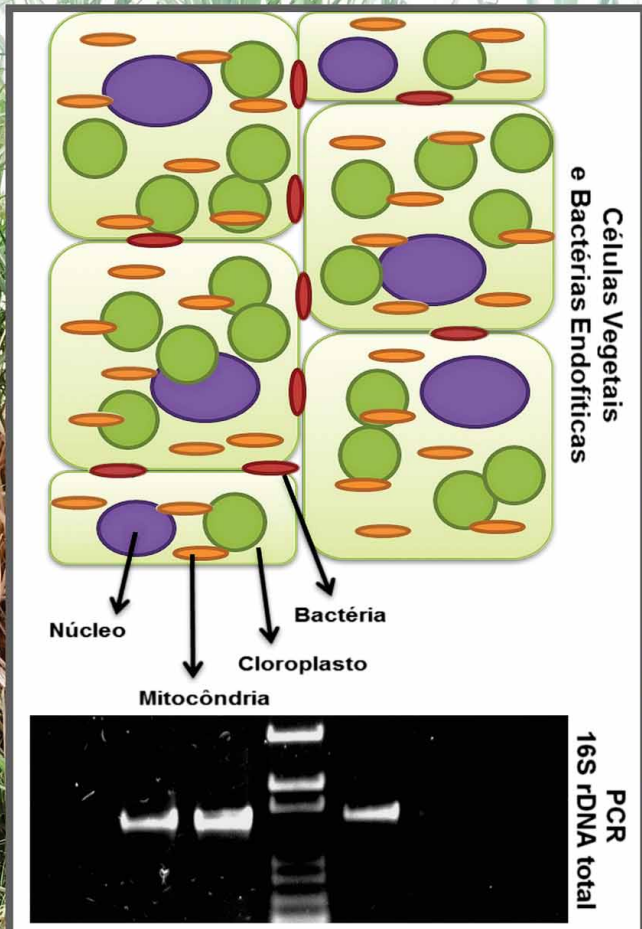


Análise de restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA) para uma distinção rápida entre DNA bacteriano e de cana-de-açúcar



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 95

Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA) para uma distinção rápida entre DNA bacteriano e de cana-de-açúcar

Stefan Schwab
Carlos Magno dos Santos
José Ivo Baldani

Embrapa Agrobiologia
Seropédica, RJ
2014

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465, km 7, CEP 23.891-000, Seropédica, RJ

Caixa Postal 74505

Fone: (21) 3441-1500

Fax: (21) 2682-1230

Home page: www.embrapa.br/agrobiologia

Comitê de Publicações

Presidente: Bruno José Rodrigues Alves

Secretária-Executivo: Carmelita do Espírito Santo

Membros: Ednaldo da Silva Araújo, Janaina Ribeiro Costa Rouws,

Luc Felicianus Marie Rouws, Luis Claudio Marques de Oliveira,

Luiz Fernando Duarte de Moraes, Marcia Reed Rodrigues Coelho,

Maria Elizabeth Fernandes Correia, Nátia Élen Auras

Supervisora editorial: Maria Elizabeth Fernandes Correia

Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Tratamento de ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa

Editoração eletrônica: Maria Christine Saraiva Barbosa

Foto/montagem da capa: Carlos Magno dos Santos

1ª edição

1ª impressão (2014): 50 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agrobiologia

S398a SCHWAB, Stefan

Análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA) para uma distinção rápida entre DNA bacteriano e de cana-de-açúcar / Stefan Schwab, Carlos M. dos Santos e José I. Baldani. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2014. 22 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 95).

ISSN 1676-6709

1. Metagenômica. 2. Microbiota do solo. 3. Bactéria endofítica. 4. ARDRA. I. Santos, Carlos M. dos. II. Baldani, José I. III. Título. IV. Embrapa Agrobiologia. V. Série

631.523 CDD 23.ed.

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	12
Conclusão	18
Referências Bibliográficas	19

Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA) para uma distinção rápida entre DNA bacteriano e de cana-de-açúcar

Stefan Schwab¹

Carlos Magno dos Santos²

José Ivo Baldani¹

Resumo

Trabalhos recentes que investigaram a presença de diazotrofos ativos em cana-de-açúcar através de uma técnica independente de cultivo (RT-qPCR) revelaram forte atividade de diversas bactérias fixadoras de nitrogênio, muitas das quais até então desconhecidas. Os resultados destes trabalhos mostram que estratégias independentes de cultivo, como a metagenômica, são essenciais para melhor compreender a diversidade genética, estrutura populacional, o papel ecológico e as características funcionais dos microrganismos associados à planta de cana-de-açúcar. A dificuldade metodológica em se estudar a microbiota endofítica através de metagenômica ocorre devido à sua baixa densidade celular, tornando necessária uma etapa prévia de enriquecimento das células bacterianas endofíticas. No estabelecimento da metodologia de enriquecimento de células bacterianas da cana-de-açúcar, um procedimento rápido é necessário para avaliar a efetividade desse enriquecimento em relação ao material vegetal. Este documento descreve um método rápido com potencial para avaliar o

¹ Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR 465 km 7, CEP 23.891-000, Seropédica, RJ.

² Bolsista FAPERJ de Iniciação Científica. Aluno da UEZO, Av. Manuel Caldeira de Alvarenga, 1203, Campo Grande, CEP 23.070-200, Rio de Janeiro, RJ.

enriquecimento relativo da microbiota endofítica da cana-de-açúcar, utilizando-se a estratégia de análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA). Foram adotados *primers* que amplificam DNA de cloroplasto (além de DNA bacteriano) e, portanto, a presença do amplificado de cloroplasto funciona, na estratégia apresentada, como um indicador da presença de DNA vegetal no DNA total extraído. A estratégia de ARDRA apresentada neste documento, envolvendo a enzima de restrição *Nsi*I, mostra-se relativamente simples e rápida para distinguir DNA bacteriano do de cana-de-açúcar. Apresenta potencial para avaliar a presença de DNA vegetal em preparações de DNA de bactérias associadas à cana-de-açúcar, auxiliando em projetos microbioma.

Analysis of Amplified Ribosomal DNA Restriction (ARDRA) for a quick distinguishing bacterial DNA and cane sugar

Abstract

Recent work that aimed to investigate the presence of active diazotrophs in sugarcane, using a culture-independent technique (RT-qPCR), revealed high activity of diverse nitrogen-fixing bacteria, including many that were unknown so far. Results have shown that culture-independent approaches, such as metagenomics, are essential to better understand the genetic diversity, population structure, ecological role and functional characteristics of microorganisms associated with sugarcane plants. The methodological difficulty in studying endophytic microbiota through metagenomics occurs due to their low cell density, which makes necessary a previous step of enriching endophytic bacterial cells. During establishment of a protocol for this, a fast procedure is necessary to evaluate the effectiveness of cell enrichment. This document describes a fast procedure presenting potential to evaluate the relative enrichment of endophytic bacterial cells from sugarcane tissues, using amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). Primers were utilized that amplify chloroplast DNA (besides bacterial DNA), and thus the presence of the plastid amplicon, in the present approach, indicates the presence of plant DNA in the total DNA extracted. The ARDRA approach presented here, involving the restriction enzyme NsiI, shows to be relatively simple and fast

in order to distinguish bacterial and sugarcane DNA. It also presents potential to evaluate the presence of plant DNA in preparations from bacteria associated with sugarcane, which might support microbiome projects.

Keywords: Microbiota, endophytes, metagenome.

Introdução

Historicamente a cana-de-açúcar tem sido uma cultura de grande importância no Brasil, sendo responsável pela produção de açúcar, etanol e, mais recentemente, energia elétrica. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) que ocorre nas plantas de cana-de-açúcar tem sido apontada como a fonte provável de quantidades significativas de N suprido àquela cultura (URQUIAGA; CRUZ; BODDEY, 1992). Trabalhos recentes que investigaram a presença de diazotrofos ativos em cana-de-açúcar através de uma técnica independente de cultivo (RT-qPCR) revelaram forte atividade de bactérias fixadoras de nitrogênio da ordem Rhizobiales, além de outras bactérias previamente caracterizadas e até mesmo totalmente desconhecidas (THAWEENUT et al., 2011; BURBANO et al., 2011; FISCHER et al., 2012). Os resultados destes trabalhos também sugerem que a contribuição previamente detectada da FBN em quantidades significativas de N pode estar sendo suprido à planta de cana-de-açúcar através de bactérias não cultiváveis, e mostram que estratégias independentes de cultivo são essenciais para melhor compreender a diversidade genética, estrutura populacional, o papel ecológico e as características funcionais dos microrganismos associados à planta de cana-de-açúcar.

Em contraste à estratégia clássica reducionista da PCR de genes únicos, em que se utiliza um pequeno grupo de genes modelos, a metagenômica permite uma visão global dos fenômenos em todos os genes simultaneamente, evitando problemas associados à concepção dos *primers*, como falta de ampla cobertura filogenética, falso favorecimento de determinados grupos filogenéticos, ou inespecificidade para os genes alvos. Uma abordagem metagenômica possibilitaria a identificação de outras atividades úteis em endófitos diazotróficos, para além da fixação de nitrogênio, como: síntese de reguladores do crescimento vegetal tais como auxinas, citoquininas e giberelinas; atividade de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase; solubilização de fosfato e zinco; ou proteção contra patógenos (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011). O estudo da microbiota

endofítica através da metagenômica foi realizado pioneiramente envolvendo plantas de arroz das Filipinas (SESSITSCH et al., 2012). A dificuldade metodológica associada a este tipo de estudo ocorre devido à baixa densidade de bactérias endofíticas (estimado em $\sim 10^4$ - 10^8 g⁻¹ de raiz) quando comparado com as rizosféricas ($\sim 10^6$ - 10^9 g⁻¹ de solo) (BULGARELLI et al., 2013). Este aspecto faz com que seja necessária uma etapa prévia de enriquecimento das células bacterianas endofíticas (WILSON; PIEL, 2013). Alguns trabalhos foram publicados relatando o enriquecimento da microbiota endofítica (JIAO et al., 2006; WANG et al., 2008; IKEDA et al., 2009). Não se sabe se as metodologias empregadas nesses trabalhos poderiam funcionar com plantas de cana-de-açúcar.

As estratégias de enriquecimento da microbiota permitem aumentar a representatividade de seu material genético frente ao da planta hospedeira e, desta forma, incrementar a sensibilidade das análises moleculares, além de abrir perspectivas para o estudo de microrganismos não-cultiváveis. Estas estratégias podem envolver o uso de hidrólise enzimática (JIAO et al., 2006), tratamento salino com detergente (WANG et al., 2008), centrifugação diferencial e de gradiente de densidade (IKEDA et al., 2009), ou filtração em 5 μ m de porosidade (SESSITSCH et al., 2012).

No estabelecimento da metodologia de enriquecimento de células bacterianas da cana-de-açúcar, um procedimento rápido é necessário para avaliar a efetividade desse enriquecimento em relação ao material vegetal. Este documento descreve um método rápido com potencial para avaliar o enriquecimento relativo da microbiota endofítica da cana-de-açúcar, utilizando-se a estratégia de análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA). Foram adotados *primers* que amplificam DNA de cloroplasto (além de DNA bacteriano) e, portanto, a presença do amplificado de cloroplasto funciona em nossa estratégia como um indicador da presença de DNA vegetal no DNA total extraído. Baseando-se nas sequências de DNA disponíveis em base de dados pública para o gene 16S rDNA de cloroplasto de cana-de-açúcar, de

mitocôndria de espécies vegetais filogeneticamente próximas, e de bactérias, uma enzima de restrição apropriada foi escolhida e testada quanto à sua capacidade de distinguir entre DNA bacteriano e de cana-de-açúcar.

Material e Métodos

As sequências genômicas de cloroplasto de cana-de-açúcar e de mitocôndria de gramíneas da tribo Andropogoneae foram obtidas da base de dados pública do Centro Estadunidense de Informação Biotecnológica (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares a 16S rDNA utilizados neste trabalho foram o 27F (GAGTTTGATCCTGGCTCAG) (DYMOCK et al., 1996), Amp2 (AAGGAGGTGATCCARCCGCA) (VIDEIRA et al., 2009), 1492R (DYMOCK et al., 1996), Y1 (TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC) (YOUNG; DOWNER; EARDLY, 1991) e Y3 (TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC) (CHEN et al., 2000). As sequências de DNA dos *primers* foram comparadas com as sequências de DNA das espécies vegetais através do programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997). As análises de restrição *in silico* foram realizadas utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999).

As estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho foram a CBAmC de *Azospirillum amazonense* (BR11145), Ppe8 de *Burkholderia tropica* (BR11366), PAL5 de *G. diazotrophicus* (BR11281), DH10B de *Escherichia coli* (GRANT et al., 1990) e um isolado de *Bacillus* spp. (não publicado). O DNA total de cana-de-açúcar ou das estirpes bacterianas foi isolado pelo método do CTAB (DOYLE, 1987). O 16S rDNA de bactéria ou de cloroplasto de cana-de-açúcar foi amplificado por PCR utilizando *kit* de Taq-DNA polimerase da Invitrogen, conforme descrito (VIDEIRA et al., 2009). Após visualização por eletroforese em gel de agarose, o DNA dos sistemas de PCR foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol e redissolvido no sistema de digestão da enzima *Nsi*I, e a reação foi procedida conforme descrito pelo fabricante (New England Biolabs).

Resultados e discussão

Uma busca foi realizada, na base de dados pública do Centro Estadunidense de Informação Biotecnológica (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), por sequências genômicas de cloroplasto e mitocôndria de cana-de-açúcar, para obter informação sobre seus respectivos 16S rDNA. Para mitocôndria, não foi encontrada nenhuma sequência de cana-de-açúcar. Desta forma, neste estudo foram utilizadas sequências genômicas de mitocôndrias de espécies filogeneticamente próximas à cana-de-açúcar, de gramíneas da tribo Andropogoneae, de acordo com a base de dados de taxonomia do NCBI (Tab. 1).

Tabela 1. Sequências de DNA encontradas no banco de dados público e utilizadas para estabelecer as análises de ARDRA.

Espécie/gênero	Organela	Descrição *	Código da sequência *
Cultivar híbrida de <i>Saccharum</i> spp. (cana-de-açúcar)	Cloroplasto	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar NCo 310 chloroplast DNA, complete genome	AP006714.1
Cultivar híbrida de <i>Saccharum</i> spp. (cana-de-açúcar)	Cloroplasto	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar SP-80-3280 chloroplast, complete genome	AE009947.2
<i>Sorghum bicolor</i> (sorgo)	Mitocôndria	<i>Sorghum bicolor</i> mitochondrion, complete genome	DQ984518.1
<i>Tripsacum dactyloides</i>	Mitocôndria	<i>Tripsacum dactyloides</i> cultivar Pete mitochondrion, complete genome	DQ984517.1
<i>Zea luxurians</i> (teosinto guatemalco)	Mitocôndria	<i>Zea luxurians</i> mitochondrion, complete genome	DQ645537.1
<i>Zea mays</i> estirpe NB	Mitocôndria	<i>Zea mays</i> strain NB mitochondrion, complete genome	AY506529.1
<i>Zea mays</i> subs. <i>parviglumis</i>	Mitocôndria	<i>Zea mays</i> subsp. <i>parviglumis</i> mitochondrion, complete genome	DQ645539.1
<i>Zea perennis</i>	Mitocôndria	<i>Zea perennis</i> mitochondrion, complete genome	DQ645538.1

* De acordo com GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A próxima etapa realizada foi uma análise de comparação entre as sequências de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*, vide Material e Métodos), normalmente utilizados para a amplificação por PCR de 16S rDNA bacteriano, e as sequências genômicas de cloroplastos e mitocôndrias relacionadas na Tab. 1. A Tab. 2 resume os resultados obtidos com essa análise para os *primers* 27F e Amp2, sendo possível verificar a amplificação potencial do 16S rDNA de cloroplasto de cana-de-açúcar. As análises de comparação por BLAST revelaram que o *primer* Amp2 não se anela, sob condições de PCR, à sequência genômica de mitocôndria de nenhum dos membros testados da tribo das Andropogoneae, da qual a cana-de-açúcar também faz parte (não mostrado). Como conclusão desta análise, os resultados revelaram que o par de *primers* supracitado deve amplificar apenas 16S rDNA de cloroplasto, mas não de mitocôndria, de plantas da tribo Andropogoneae (inclusive cana-de-açúcar).

Uma análise por BLAST revelou que, entre os membros da tribo Andropogoneae para os quais há sequência genômica completa disponível para cloroplasto (inclusive as duas variedades de cana-de-açúcar), as sequências dos produtos de PCR pelos *primers* 27F e Amp2 são 100% idênticas entre si (não mostrado). Logo, é bem provável que todas as variedades de cana-de-açúcar também apresentam a mesma sequência e, portanto, perfil de restrição, de produto de PCR com os *primers* 27F e Amp2.

Escolhidos os *primers* para a amplificação por PCR do 16S rDNA de organela (cloroplasto) de cana-de-açúcar, o próximo passo foi uma análise de restrição *in silico* do produto amplificado esperado, para escolha da enzima adequada às análises de ARDRA. Conforme previamente demonstrado para uma espécie arbórea na China (WANG et al., 2008), uma enzima adequada poderia seletivamente clivar o produto de PCR do 16S rDNA de cloroplasto vegetal (no presente trabalho, cana-de-açúcar), em um sítio único gerando dois fragmentos apenas, mas não (pelo menos em sua maioria) 16S rDNA bacteriano, o que seria facilmente detectável pelo perfil eletroforético em gel de

Tabela 2. Comparação entre as seqüências de DNA dos *primers* escolhidos para as análises de ARDRA e as seqüências genômicas de cloroplasto de cana-de-açúcar disponíveis no banco de dados público.

Descrição da seqüência genômica *	Melhor resultado do BLAST de acordo com o <i>primer</i>				Tamanho esperado do produto de PCR (pb)
	27F	Amp2			
<i>Saccharum</i> hybrid cultivar NCo 310 chloroplast DNA, complete genome	Query: 1 gagtttgatcctggctcag 19 	Query: 1 aaggaggtgatccatccgca 20 			1.481
	Sbjct: 128353 gagttcgatcctggctcag 128335	Sbjct: 126873 aaggaggtgatccagccgca 126892			
	Query: 1 gagtttgatcctggctcag 19 	Query: 1 aaggaggtgatccatccgca 20 			1.481
	Sbjct: 95878 gagttcgatcctggctcag 95896	Sbjct: 97358 aaggaggtgatccagccgca 97339			
<i>Saccharum</i> hybrid cultivar SP-80-3280 chloroplast, complete genome	Query: 1 gagtttgatcctggctcag 19 	Query: 1 aaggaggtgatccatccgca 20 			1.481
	Sbjct: 48797 gagttcgatcctggctcag 48779	Sbjct: 47317 aaggaggtgatccagccgca 47336			
	Query: 1 gagtttgatcctggctcag 19 	Query: 1 aaggaggtgatccatccgca 20 			1.481
	Sbjct: 16321 gagttcgatcctggctcag 16339	Sbjct: 17801 aaggaggtgatccagccgca 17782			

* Conforme GenBank.

agarose. Uma análise de restrição *in silico* foi realizada envolvendo a sequência do produto de PCR do 16S rDNA de cloroplasto de cana-de-açúcar. A Tab. 3 mostra os resultados desta análise: 1) relaciona as enzimas de restrição que reconhecem e clivam uma única vez essa sequência; 2) compara com o padrão de clivagem dessas enzimas no produto de PCR do 16S rDNA da bactéria endofítica de cana-de-açúcar *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5; e 3) exibe a frequência de clivagem dessas enzimas nas sequências dos produtos previstos de PCR de 16S rDNA bacterianos depositadas na base de dados *Ribosome Database Project* (RDP, <http://rdp.cme.msu.edu/>).

Tabela 3. Enzimas de restrição potencialmente úteis para as análises de ARDRA envolvendo DNA de (cloroplasto de) cana-de-açúcar.

Enzima	Sítio de reconhecimento e clivagem	Posição em cloroplasto de cana-de-açúcar [§] (nt)	Posição em <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 [§] (nt)	Número de sequências do RDP com sítio(s) de clivagem (frequência)*
<i>ApaI</i>	G_GGCC'C	872	869	14.566 (~ 79%)
<i>BbvCI</i>	CC'TCA_GC	160	694	8.305 ∪ 159 (~ 45% ∪ ~ 0,9%)
<i>BseYI</i>	C'CCAG_C	678	1.388	4.209 ∪ 1.474 (~ 23% ∪ ~ 8%)
<i>BspEI</i>	T'CCGG_A	494	-	15.305 (~ 83%)
<i>BsrBI</i>	CCG'CTC	628	-	7.002 ∪ 880 (~ 38% ∪ ~ 5%)
<i>BsrGI</i>	T'GTAC_A	1.331	1.331	17.253 (~ 94%)
<i>MscI</i>	TGG'CCA	1.363	-	1.928 (~ 10%)
<i>NsiI/ BfrBI</i>	A_TGCA'T/ ATG'CAT	640/638	-	2.593 (~ 14%)
<i>PmlI</i>	CAC'GTG	1.169	1.171	16.176 (~ 88%)
<i>PspOMI</i>	G'GGCC_C	868	865	14.566 (~ 79%)
<i>SacII</i>	CC_GC'GG	468	466	18.318 (~ 99%)
<i>SmaI/</i>	CCC'GGG/	1.324/1.32	1.324/1.322	17.411 (~ 94%)
<i>XmaI</i>	C'CCGG_G	2		
<i>SphI</i>	G_CATG'C	39	39	9.664 (~ 52%)
<i>StuI</i>	AGG'CCT	380	229	9.745 (~ 53%)

§ Considerando o produto de PCR com os *primers* 27F e Amp2, complementares ao 16S rDNA.

* Os valores de frequência foram calculados considerando o total de 18.451 sequências do banco de dados. As enzimas com sítio de reconhecimento não palíndromo apresentam valores distintos de frequência entre as fitas de DNA, valores estes separados por "∪".

Essa análise de restrição *in silico* revelou que, dentre as enzimas que clivam a sequência do 16S rDNA de cloroplasto de cana-de-açúcar uma única vez, *MscI* e *NsiI* são as que menos reconhecem/clivam sequências dos 16S rDNA bacterianos, com ~10% e ~14% de frequência, respectivamente (Tab. 3). Pelos sítios de clivagem em 16S rDNA de cloroplasto de cana-de-açúcar (Tab. 3), é possível prever que a enzima *MscI* geraria fragmentos de restrição de 1.363 e 118 pb, enquanto *NsiI* geraria 841 e 640 pb. Comparando com os produtos de PCR não clivados (16S rDNA da maioria das bactérias com cerca de 1.482 pb), certamente o perfil de restrição com a *NsiI* seria mais facilmente distinguível em gel do que o perfil com a *MscI*, pois esta última enzima geraria uma banda com tamanho bastante próximo ao do produto não clivado e uma outra banda bastante pequena comumente não detectável após revelação do gel. Portanto, os resultados destas análises *in silico* mostraram o potencial da enzima *NsiI* em ARDRA para distinguir DNA bacteriano do de cana-de-açúcar.

Como forma de demonstrar a utilidade da enzima *NsiI* em distinguir DNA bacteriano do de cana-de-açúcar através de ARDRA, uma análise com essa enzima foi realizada envolvendo DNA de algumas estirpes bacterianas (inclusive algumas que foram isoladas da própria cana-de-açúcar), e DNA total extraído da cana. A Fig. 1 exibe os perfis de ARDRA obtidos com *NsiI*: como se pode verificar, a enzima *NsiI* clivou quase que completamente o amplificado de DNA de cana, gerando uma banda próxima aos 850 pb e outra próxima aos 650 pb, perfil este condizente ao obtido *in silico* para 16S rDNA de cloroplasto (Tab. 3). Por outro lado, essa enzima aparentemente não clivou o amplificado de nenhuma das cinco estirpes bacterianas testadas (quatro Proteobactérias e uma Firmicuta).

No caso da amostra vegetal (coluna "C" da Fig. 1), é possível que uma pequena fração do DNA não tenha sido clivado (banda fraca próxima aos 1.500 pb) por pelo menos um dos seguintes motivos: 1) a digestão pela enzima tenha sido apenas parcial; e 2) o DNA de bactérias associadas naturalmente às plantas utilizadas tenha sido detectado pela

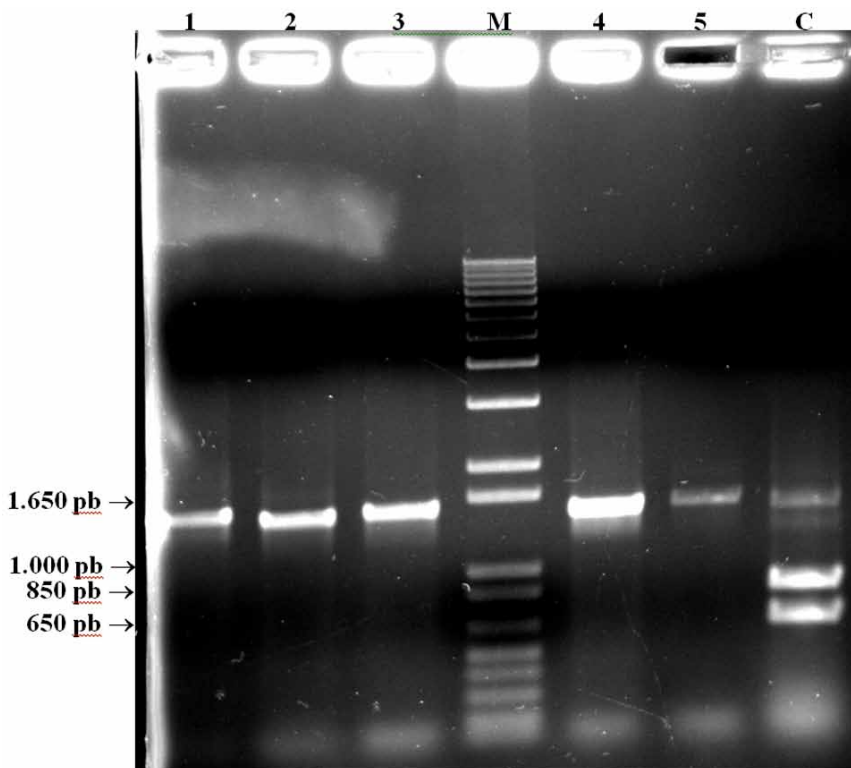


Fig. 1. Perfil de ARDRA de cloroplasto de cana-de-açúcar com a enzima *Nsi*I em comparação com perfis de cinco estirpes bacterianas de grupos taxonômicos distintos. 1 = *Bacillus* spp., 2 = *A. amazonense* estirpe CBAmC, 3 = *B. tropica* Ppe8, 4 = *G. diazotrophicus* PAL5, 5 = *E. coli* DH10B, M = marcador de tamanho molecular 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen), e C = DNA total de cana-de-açúcar.

análise. De qualquer forma, ao se utilizar a estratégia aqui descrita, esse tipo de amostra (DNA total da cana) deve ser utilizado como controle-referência, representando a condição “0% de enriquecimento de DNA bacteriano em relação a DNA vegetal”.

De acordo com os dados na última coluna da Tab. 3 (enzima *Nsi*I), apenas cerca de 14% das sequências depositadas em banco de dados

são sujeitas a clivagem, sugerindo que apenas uma minoria de bactérias tenha seu 16S rDNA clivado pela enzima. Os resultados de comparação com o banco de dados RDP mostraram perfis variáveis de restrição *Nsi*I dentro daquela minoria de bactérias (não mostrado).

Para uma situação ideal próxima a 100% de enriquecimento, em que o DNA de cloroplasto de cana estaria ausente, seria de esperar um perfil de ARDRA próximo ao das bactérias utilizadas neste trabalho (Fig. 1, colunas 1, 2, 3, 4 e 5). Pelo menos um fator poderia levar a uma situação diferente desta proposta: a preponderância de bactéria(s) endofítica(s) cujo 16S rDNA é reconhecido pela enzima *Nsi*I. No entanto, trabalhos anteriores mostraram uma diversidade significativa de bactérias endofíticas da cana-de-açúcar, o que torna esta situação pouco provável (MAGNANI et al., 2010; THAWEENUT et al., 2011).

Conclusão

A estratégia de ARDRA apresentada neste documento, envolvendo a enzima de restrição *Nsi*I, mostrou ser relativamente simples e rápida para distinguir DNA bacteriano do de cana-de-açúcar. Apresenta potencial para avaliar a presença de DNA vegetal em preparações de DNA de bactérias associadas à cana-de-açúcar, auxiliando em projetos microbioma (ALVAREZ et al., 2011; PAUNGFOO-LONHIENNE et al., 2012). Da mesma forma, apresenta potencial para estudar o conteúdo genético de bactérias associadas a outras gramíneas da tribo Andropogoneae, como por exemplo sorgo e milho.

Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ALVAREZ, T. M.; PAIXÃO, D. A.; FRANCO CAIRO, J.; RULLER, R.; BUCHLI, F.; RIBEIRO, D.; PAES LEME, A.; PRADE, R.; SQUINA, F. Target discovery of enzymes involved in degradation of lignocellulosic biomass from sugar cane soil metagenome. In: BRAZILIAN BIOENERGY SCIENCE AND TECHNOLOGY CONFERENCE - BBEST, 1., 2011, Campos do Jordão, SP. [Anais...]. São Paulo: FAPESP, 2011. Disponível em: <<http://bbest.org.br/abstracts/resumos/R0229-1.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2012

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; Ver LOREN Van THEMAAT, E.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.

BURBANO, C. S.; LIU, Y.; RÖSNER, K. L.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J.; REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Predominant *nifH* transcript phylotypes related to rhizobium rosettiformans in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 3, p. 383-389, 2011.

CHEN, L. S.; FIGUEREDO, A.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.11, p.5099-5103, 2000.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DYMOCK, D.; WEIGHTMAN, A. J.; SCULLY, C.; WADE, W. G. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 537-542, 1996.

FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; REIS, V. M.; PEREIRA, W.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HAI, B.; HOFMANN, A.; SCHLOTER, M. Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 83-99, 2012.

GRANT, S. G.; JESSEE, J.; BLOOM, F. R.; HANAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 12, p. 4645-4649, 1990.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

IKEDA, S.; KANEKO, T.; OKUBO, T.; RALLOS, L. E. E.; EDA, S.; MITSUI, H.; SATO, S.; NAKAMURA, Y.; TABATA, S.; MINAMISAWA, K. Development of a bacterial cell enrichment method and its application to the community analysis in soybean stems. **Microbial Ecology**, v. 58, n. 4, p. 703-714, 2009.

JIAO, J. Y.; WANG, H. X.; ZENG, Y.; SHEN, Y. M. Enrichment for microbes living in association with plant tissues. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 4, p. 830-837, 2006.

MAGNANI, G. S.; DIDONET, C. M.; CRUZ, L. M.; PICHETH, C. F.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.

PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; YUNKIT, Y.; LONHIENNE, T.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S.; HUGENHOLT, P. Culture-independent community profiling and directed isolation of the sugarcane rhizosphere. In: NEW PHYTOLOGIST SYMPOSIUM, 28, 2012, Grécia. **Functions and ecology of the plant microbiome: programme, abstracts and participants**. Lancaster, UK: New Phytologist Trust, 2012. Disponível em: <<http://www.newphytologist.org/app/webroot/img/upload/files/28thNPSAbstractBook.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2012.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 435-443, 2011.

SESSITSCH, A.; HARDOIM, P.; DÖRING, J.; WEILHARTER, A.; KRAUSE, A.; WOYKE, T.; MITTER, B.; HAUBERG-LOTTE, L.; FRIEDRICH, F.; RAHALKAR, M.; HUREK, T.; SARKAR, A.; BODROSSY, L.; van OVERBEEK, L.; BRAR, D.; van ELSAS, J. D.; REINHOLD-HUREK, B. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 1, p. 28-36, 2012.

THAWEENUT, N.; HACHISUKA, Y.; ANDO, S.; YANAGISAWA, S.; YONEYAMA, T. Two seasons study on *nifH* gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): expression of *nifH* genes similar to those of rhizobia. **Plant and Soil**, v. 338, n. 1-2, p. 435-449, 2011.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society American Journal**, v. 56, n. 1, p.105-114, 1992.

VIDEIRA, S. S.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; RODRIGUES, L. da S.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. **FEMS Microbiol Letters**, v. 293, p. 11-19, 2009.

WANG, H. X.; GENG, Z. L.; ZENG, Y.; SHEN, Y. M. Enriching plant microbiota for a metagenomic library construction. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2684-2691, 2008.

WILSON, M. C.; PIEL, J. Metagenomic approaches for exploiting uncultivated bacteria as a resource for novel biosynthetic enzymology. **Chemistry & Biology**, v. 20, n. 5, p. 636-647, 2013.

YOUNG, J.; DOWNER, H.; EARDLY, B. Phylogeny of the phototrophic rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 7, p. 2271-2277, 1991.

Embrapa

Agrobiologia

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

G O V E R N O F E D E R A L
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA