



Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp)

Método de inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas

Verônica Massena Reis¹

Introdução

A técnica de regeneração de plantas a partir do cultivo de meristemas facilita a inoculação de bactérias fixadoras de N₂ e possibilita selecionar estirpes ou mesmo a inoculação de bactérias modificadas geneticamente, visando um aumento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Visando estabelecer um protocolo de inoculação e estabelecimento de bactérias diazotróficas inoculadas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar foram feitas várias modificações do meio de cultivo Murashige & Skoog (1962) tradicionalmente utilizado para propagação vegetal. Estas modificações foram necessárias para proporcionar um equilíbrio na associação planta-bactéria. A metodologia aprimorada estipulou a inoculação da bactéria ao final do período de enraizamento em meio sem hormônios ou vitaminas e com a concentração de sais e sacarose reduzida 10 vezes. As plantas, após a individualização, foram inoculadas e permaneceram nas mesmas condições de luz e temperatura por 7 dias. Este período foi suficiente para promover a infecção e o estabelecimento da bactéria na planta. As mudas inoculadas foram transferidas para a fase de aclimação sendo que, após trinta dias foi possível reisolar a bactéria apenas do tecido vegetal. Esta metodologia permitiu estudos de infecção e comparação entre estirpes. As plantas foram examinadas em microscópio ótico e eletrônico de transmissão e varredura aos 4, 7, 9 e 15 dias após a inoculação "in vitro".

Metodologia

A partir de uma placa contendo colônias puras e individualizadas da estirpe de *G. diazotrophicus* ou outra espécie de bactéria diazotrófica que se deseja inocular, transferiu-se 1 colônia para 5 mL de meio DYGS (Rodrigues Neto et al., 1986 - anexo) e deixou-

se crescer a 125 rpm a 30°C por 24-48 horas, dependendo do crescimento.

Plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) de diferentes variedades tais como: NA 56-79, SP70 - 1143, SP71-6163 ou SP79-2312 foram obtidas através do cultivo de meristemas. A metodologia utilizada para a obtenção das plantas enraizadas segue o protocolo de HENDRE et al., (1983). As plantas foram mantidas em meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado quanto a concentração de hormônios usada para promover a multiplicação da parte aérea (fase I) e o enraizamento (fase II) durante 50-60 dias. Somente após esta segunda fase, onde as plantas exibiram folhas e raízes em abundância, foi que se procedeu a inoculação.

Inoculação: Após a fase de enraizamento e perfilhamento "in vitro", as plantas foram transferidas para novo meio líquido MS sem hormônios e com a concentração de sacarose e nutrientes reduzida 10 vezes (em anexo). Nesta fase foi possível individualizar as pequenas touceiras transferindo-as para o máximo de vidros (maionese de 250 mL) possíveis. Esta individualização permitiu que a região de inserção das folhas, o que foi o calo (tecido não diferenciado) no início do desenvolvimento, sofresse feridas pelo corte das mudas. Estas feridas também permitiram a entrada da bactéria. Cada frasco foi inoculado com 0,1 mL de uma suspensão de bactérias crescidas em meio de cultivo DYGS (Rodrigues Neto et al., 1986 - anexo) por 24 h e com a D.O.₄₃₆ = 1 contendo de 10⁶ a 10⁷ células mL⁻¹. As plantas foram mantidas por até 7 dias à 25°C sob luz artificial (3.000 lux) com um fotoperíodo de 12 horas de luz.

Aclimação: As plantas inoculadas foram plantadas em bandejas de Isopor do tipo PlantágilTM com 12 cm de profundidade e preenchidas com uma mistura de areia

¹ Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 07, Caixa Postal 74.505. CEP 23851-970, Seropédica, RJ



Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp)

Método de inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas

Verônica Massena Reis¹

Introdução

A técnica de regeneração de plantas a partir do cultivo de meristemas facilita a inoculação de bactérias fixadoras de N₂ e possibilita selecionar estirpes ou mesmo a inoculação de bactérias modificadas geneticamente, visando um aumento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Visando estabelecer um protocolo de inoculação e estabelecimento de bactérias diazotróficas inoculadas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar foram feitas várias modificações do meio de cultivo Murashige & Skoog (1962) tradicionalmente utilizado para propagação vegetal. Estas modificações foram necessárias para proporcionar um equilíbrio na associação planta-bactéria. A metodologia aprimorada estipulou a inoculação da bactéria ao final do período de enraizamento em meio sem hormônios ou vitaminas e com a concentração de sais e sacarose reduzida 10 vezes. As plantas, após a individualização, foram inoculadas e permaneceram nas mesmas condições de luz e temperatura por 7 dias. Este período foi suficiente para promover a infecção e o estabelecimento da bactéria na planta. As mudas inoculadas foram transferidas para a fase de aclimação sendo que, após trinta dias foi possível reisolar a bactéria apenas do tecido vegetal. Esta metodologia permitiu estudos de infecção e comparação entre estirpes. As plantas foram examinadas em microscópio ótico e eletrônico de transmissão e varredura aos 4, 7, 9 e 15 dias após a inoculação "in vitro".

Metodologia

A partir de uma placa contendo colônias puras e individualizadas da estirpe de *G. diazotrophicus* ou outra espécie de bactéria diazotrófica que se deseja inocular, transferiu-se 1 colônia para 5 mL de meio DYGS (Rodrigues Neto et al., 1986 - anexo) e deixou-

se crescer a 125 rpm a 30°C por 24-48 horas, dependendo do crescimento.

Plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) de diferentes variedades tais como: NA 56-79, SP70 - 1143, SP71-6163 ou SP79-2312 foram obtidas através do cultivo de meristemas. A metodologia utilizada para a obtenção das plantas enraizadas segue o protocolo de HENDRE et al., (1983). As plantas foram mantidas em meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) modificado quanto a concentração de hormônios usada para promover a multiplicação da parte aérea (fase I) e o enraizamento (fase II) durante 50-60 dias. Somente após esta segunda fase, onde as plantas exibiram folhas e raízes em abundância, foi que se procedeu a inoculação.

Inoculação: Após a fase de enraizamento e perfilhamento "in vitro", as plantas foram transferidas para novo meio líquido MS sem hormônios e com a concentração de sacarose e nutrientes reduzida 10 vezes (em anexo). Nesta fase foi possível individualizar as pequenas touceiras transferindo-as para o máximo de vidros (maionese de 250 mL) possíveis. Esta individualização permitiu que a região de inserção das folhas, o que foi o calo (tecido não diferenciado) no início do desenvolvimento, sofresse feridas pelo corte das mudas. Estas feridas também permitiram a entrada da bactéria. Cada frasco foi inoculado com 0,1 mL de uma suspensão de bactérias crescidas em meio de cultivo DYGS (Rodrigues Neto et al., 1986 - anexo) por 24 h e com a D.O.₄₃₆ = 1 contendo de 10⁶ a 10⁷ células mL⁻¹. As plantas foram mantidas por até 7 dias à 25°C sob luz artificial (3.000 lux) com um fotoperíodo de 12 horas de luz.

Aclimação: As plantas inoculadas foram plantadas em bandejas de Isopor do tipo PlantágilTM com 12 cm de profundidade e preenchidas com uma mistura de areia

¹ Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 07, Caixa Postal 74.505. CEP 23851-970, Seropédica, RJ

vermiculita + turfa na proporção de 4:2:1 (v/v) esterilizada em autoclave.

Marcação com ouro para visualização ao microscópio ótico e eletrônico de transmissão (James et al., 1994): pequenos pedaços de raízes e parte aérea (1 a 2 mm) das plântulas mantidas "in vitro" foram fixados com solução de glutaraldeído (fixador) a 5% dissolvido em tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) por 24 horas. O material foi lavado no mesmo tampão, desidratado com a série alcoólica de etanol:água destilada (10, 30, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% durante 10 min para cada etapa) e embebido em resina LR White (London Resin Company, UK). As amostras foram transferidas para cápsulas de gelatina, identificadas com um pequeno papel e em seguida colocou-se a amostra orientada embebida resina. Para a polimerização as amostras foram mantidas na geladeira por seis dias e finalmente transferidas para estufa com temperatura de 55-60°C por 24 hs.

Microscopia ótica: Seções semi-finas (1µm) foram recolhidas em gota de água e colocada sobre lâminas de vidro cobertas com gelatina (1% em água destilada filtrada e estéril) e a seguir foram secas a 60°C. Imunomarcação: as seções foram incubadas em tampão 1 (tampão fosfato salino – PBS, pH 7,4 contendo 1% de albumina bovina (BSA) e 1% de Tween 20) por 1 hora a 20-25°C. O tampão fosfato salino foi feito da seguinte forma: NaCl - 8,0 g; KCl - 0,2 g; Na₂HPO₄ .2H₂O - 1,4 g; KH₂PO₄ - 0,2g e completa-se para 1litro com água destilada. As amostras foram lavadas com água destilada esterilizada rapidamente e incubou-se com o anticorpo primário entre 1 e 4 horas a 20-25°C. O anticorpo primário foi desenvolvido contra a estirpe padrão da bactéria inoculada (anti-*Gluconacetobacter diazotrophicus* por exemplo; PAL5^T de acordo com a método descrito por Reis et al., (2000). Novamente as seções foram lavadas com água destilada esterilizada e a seguir foi feita a incubação com solução tampão 1 (PBS) por 3 vezes (5 min cada seção) e lavou-se com água destilada estéril. Continuando, foi aplicado o anticorpo secundário (diluído 1:50 em solução tampão 1) por 1-2 horas. Finalmente após a lavagem e secagem das amostras foi usado o revelador de prata (Silver Enhancement kit – Amersham) cujo tempo médio de revelação variou de 9 a 10 min a 22-25°C. No tempo ótimo de contraste, procedeu-se a lavagem e as lâminas foram coradas azul de toluidina (0,01%) e observadas ao microscópio ótico Olympus BH 12.

Microscopia eletrônica de transmissão: seções ultrafinas (50-90 nm) inclusas em LR White devem ser recolhidas em grades de níquel ou ouro de 300 mesh recobertas com FORMVAR. Hidratação e bloqueio: as

grades contendo os cortes voltados para baixo foram colocadas sobre uma superfície contendo uma gota (40-50 µl) da solução de bloqueio (solução tampão 1) por um período de 1 hora à temperatura de 20-25°C. Marcação primária e secundária: a amostra foi transferida diretamente da solução tampão 1 para a solução contendo o anticorpo primário desenvolvido contra a estirpe padrão da bactéria inoculada (neste caso foi o anti-*Gluconacetobacter diazotrophicus* – PAL5^T), deixando reagir por 1-4 horas à temperatura ambiente. O anticorpo foi diluído em solução tampão 1 na proporção de 1:400 (após testar a melhor diluição), utilizando uma gota de 40-50 µl. A seguir as amostras foram lavadas em água destilada estéril e removido o excesso de água com um papel de filtro. A colocação do anticorpo secundário, acoplado a uma partícula de ouro de tamanho de 15 µm (antibody-gold ou protein A-gold – Amersham), foi diluído 1:50 em solução tampão 1 por 1-2 horas a temperatura ambiente. Após este período lavou-se a amostra uma vez com solução e duas vezes em água destilada estéril. Retirou-se o excesso de água e para visualização as amostras foram coradas com acetato de uranila (5%) por 10 min e citrato de chumbo (0,2%) por 2 min. Os controles devem constar de: a) soro pré-imune (tirado antes da imunização do animal); b) sem o anticorpo primário que permite visualizar reações inespecíficas com o anticorpo secundário; c) amostra sem o organismo alvo: controle negativo, testemunha não inoculada.

Preparação das amostras para visualização ao microscópio eletrônico de varredura: As plantas foram cortadas em pequenos pedaços de 2 a 3 mm e fixadas em solução de glutaraldeído a 5% dissolvido em tampão 1. Desidratação: após a fixação o material vegetal foi lavado (mesmo tampão), desidratado em série alcoólica de 30 a 100% de etanol seguido de uma gradual substituição do álcool por acetona. As amostras foram transferidas para o aparelho Biorad E 3000 onde se efetuou a desidratação completa utilizando CO₂ líquido. Metalização: a seguir as amostras foram transferidas para o equipamento que permite a cobertura das amostras com partículas de ouro (Sputter Coater modelo E5 200), onde o tempo de cobertura depende a visualização perfeita das amostras que neste caso foi de 40s. Visualização: finalmente as amostras foram transferidas para o microscópio eletrônico de varredura modelo Cambridge Stereoscan 200 MEV para visualização do padrão de colonização.

Resultados

Para constatação da eficiência da metodologia foi necessário visualizar o estabelecimento da bactéria

inoculada. Neste caso foi testada a inoculação com a bactéria *G. diazotrophicus*.

Após 7 dias de inoculação, *G. diazotrophicus* estava presente sobre o tecido vegetal, desde as raízes até as folhas (Figura 1) e inclusive dentro dos vasos do xilema (Figura 2). A ponta da raiz também foi um sítio de entrada da bactéria no tecido vegetal visto que, nesta região as paredes da endoderme e a Estria de Caspari não estavam enrijecidas e os vasos ainda não estavam diferenciados (Figura 3 a). A bactéria colonizou preferencialmente as cavidades e acumulou na região de emergência da raiz secundária (Figura 3 a, 3b). Cortes semi-finos localizaram a bactéria nos espaços intercelulares (Figura 3 d). As células bacterianas foram confirmadas como sendo da espécie inoculada, *G. diazotrophicus*, utilizando o soro policlonal específico para a espécie, acoplado a partículas de ouro e enriquecidas com prata para permitir a visualização ao microscópio ótico (Figura 3 b). Não foi observada nenhuma reação patogênica óbvia contra a bactéria presente no xilema (Figura 3 e).

Foi constatado neste sistema de inoculação que a bactéria colonizou a superfície do tecido vegetal através da entrada por aberturas naturais presentes na ponta das raízes ou na junção das raízes secundárias, ou mesmo de aberturas provocadas pelo processo de individualização das mudas. Uma vez dentro do vegetal, colonizou a parte aérea através dos vasos do xilema.

Esta metodologia permitiu o estabelecimento definitivo da bactéria sobre e dentro das plantas sem causar nenhum sintoma de doença. Ao final deste período "in vitro" as plantas foram transferidas para o substrato e aclimatizadas em casa de vegetação. Logo após o plantio as folhas foram cortadas pela metade para impedir parte da evapo-transpiração. As plantas permaneceram por um período mínimo de 30 dias para permitir que uma nova brotação foliar.

Recomenda-se que este período de aclimação deva ser o suficiente para que a muda de cana-de-açúcar seja capaz de suportar as condições de plantio no campo. Dependendo da umidade, radiação solar, temperatura e nutrição através da aplicação de solução nutritiva com baixos teores de nitrogênio (10 a 20 mg/g de substrato por cada mês), este período pode ser entendido por 2 a 3 meses.

Anexo - Meios de cultivo:

1. Murashige & Skoog (1962) concentrações em mg L⁻¹:
macronutrientes - NH₄NO₃, 1650; KNO₃, 1900;
CaCl₂.7H₂O, 440; MgSO₄.7H₂O, 370; KH₂PO₄, 170.
Micronutrientes - Na₂EDTA 37,5; FeSO₄.7H₂O, 27,8;

H₃BO₃, 6,2; MnSO₄.4H₂O, 22,3; ZnSO₄.4H₂O, 8,6; KI, 0,83; Na₂MoO₄.2H₂O, 0,025; CoCl₂.6H₂O, 0,025. Sacarose - 20 e pH final 5,8. Autoclavar por 20 min a 121 psi.

2. Meio Dygs (Rodrigues Neto et al., 1986) - composição (g L⁻¹): glucose, 2; peptona, 1,5; extrato de levedura, 2; KH₂PO₄, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 0,5; ácido glutâmico, 1,5; água destilada para completar 1000 mL e o pH final ajustado para 6,8.

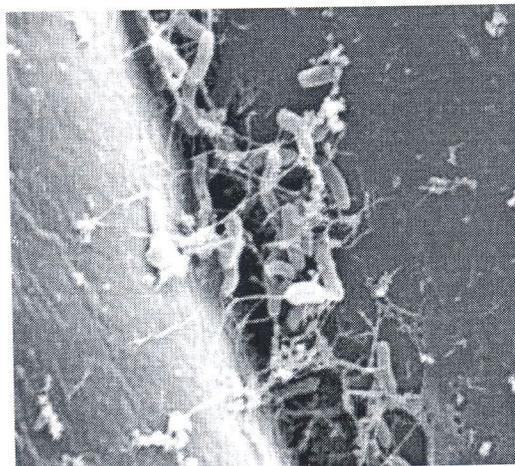


Figura 1: Micrografia de varredura mostrando as células de *G. diazotrophicus* colonizando a superfície das folhas de cana-de-açúcar variedade SP70-1143 aos 7 dias após a inoculação.



Figura 2: Micrografia de varredura mostrando células de *G. diazotrophicus* colonizando o interior dos vasos do xilema de plântulas de cana-de-açúcar variedade SP70-1143 aos 7 dias após a inoculação.

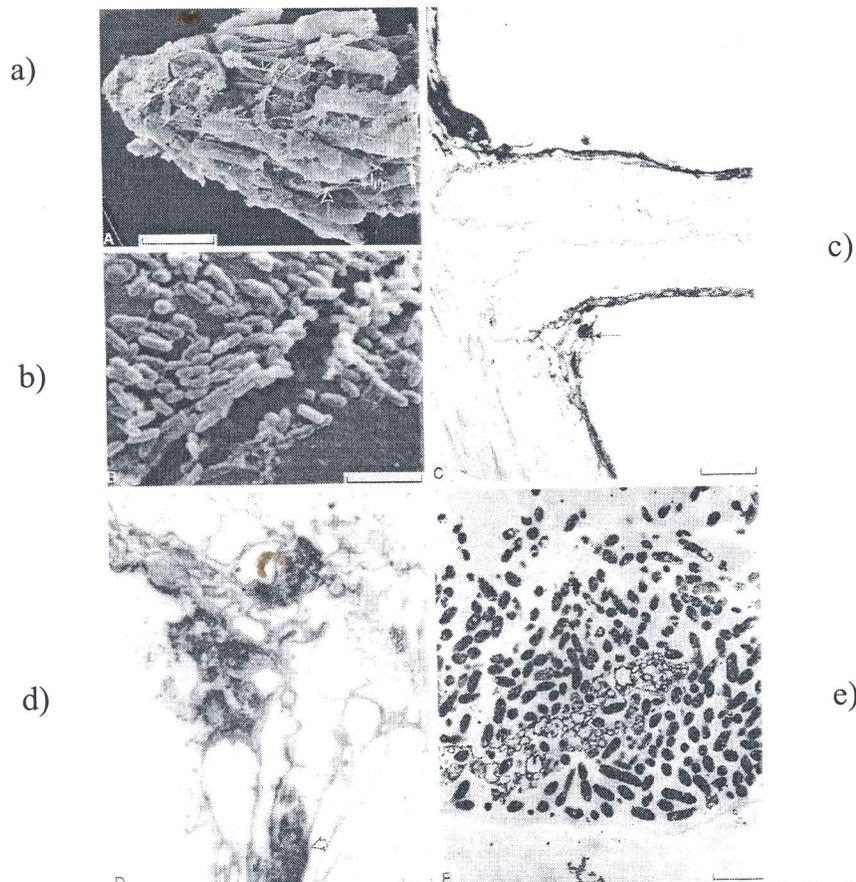


Figura 3: Micrografia ótica e de varredura de plântulas de cana-de-açúcar (variedade SP70-1143) inoculadas com *G. diazotrophicus*. a) Ponta da raiz colonizada pela bactéria; b) Região da emergência da raiz secundária. Note que a maior concentração de células encontra-se na região da junção das raízes; c) Superfície das raízes colonizadas pela bactéria; d) detalhe da junção da raiz primária com a secundária; e) microscopia eletrônica de transmissão mostrando a colonização do espaço intercelular

Referências Bibliográficas

JAMES, E. K., REIS, V. M., OLIVARES, F. L., BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 45, p. 757-766, 1994.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. Revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen. v. 15, p. 473-497, 1962.

REIS, V. M.; REIS JR., F. B.; SALES, J. F.; SCHLOTTER, M. Characterization of different polyclonal antisera to quantify *Hervaspirillum* spp. In Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schun.) **Symbiosis**, Rehovot, v.29: p. 139-150, 2000.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo *Xanthomonas campertis* pv. *citri* tipo B. **Summa Phytopathologia** v. 12, p. 16, 1986.

Comunicado Técnico, 65

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia
BR465 – km 7
Caixa Postal 74505
23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil
Telefone: (0xx21) 2682-1500
Fax: (0xx21) 2682-1230
Home page: www.cnpab.embrapa.br
e-mail: sac@cnpab.embrapa.br



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Governo
Federal

1ª impressão (2004): 50 exemplares

Comitê de publicações

Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Verônica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente

Revisor e/ou ad hoc: Vera Lúcia Divan Baldani
Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix
Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia