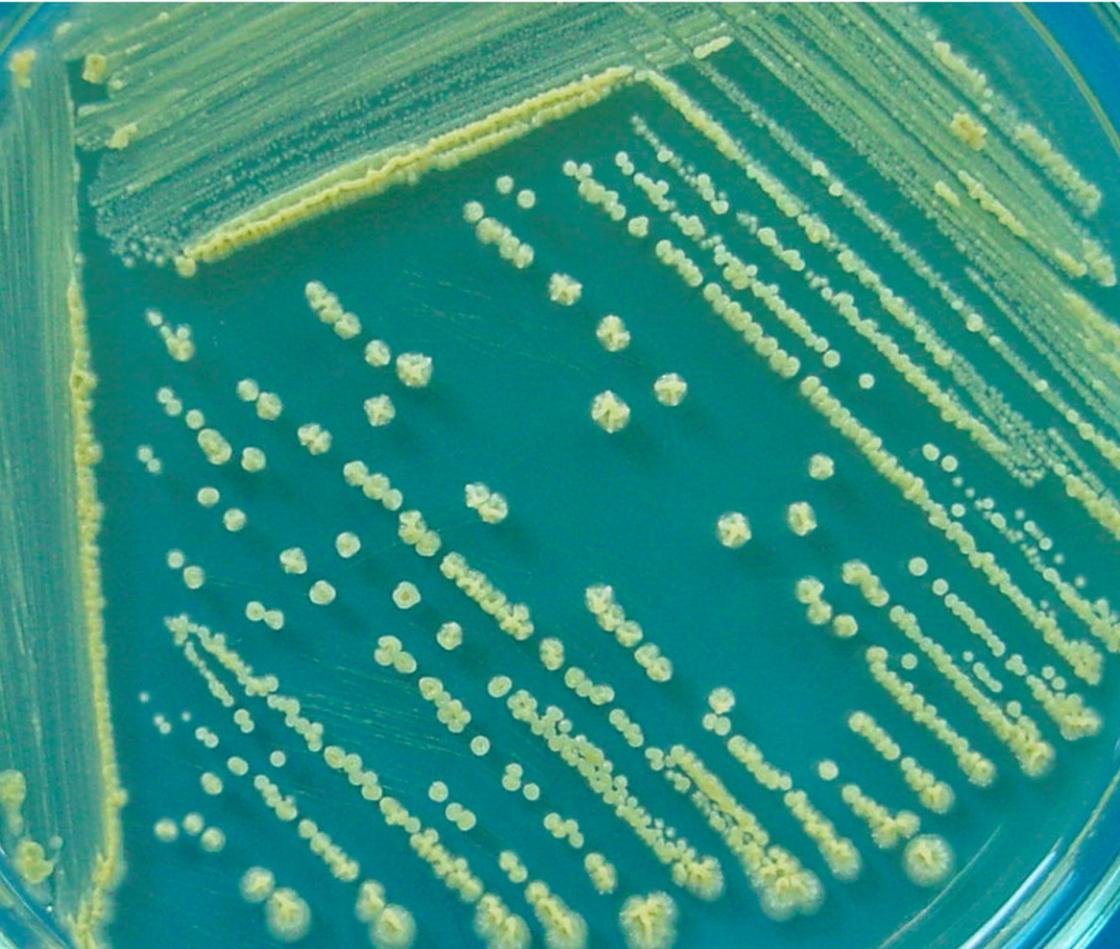


Caracterização morfo-fisiológica e molecular das estirpes diazotróficas do inoculante de cana-de-açúcar



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

Documentos 280

Caracterização morfo-fisiológica e molecular das estirpes diazotróficas do inoculante de cana-de-açúcar

*Veronica Massena Reis
Rosa Maria Pitard
Fernanda dos Santos Dourado
Natália Neutzling Camacho
Sandy Sampaio Videira
Anita Bueno de Camargo
Paulo Fernandes Boa Sorte
Marcia Soares Vidal
Stefan Schwab
José Ivo Baldani*

Embrapa Agrobiologia
Seropédica, RJ
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465, km 7, CEP 23.851-970, Seropédica, RJ

Caixa Postal 74505

Fone: (21) 3441-1500

Fax: (21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Norma Gouvêa Rumjanek

Secretária-Executivo: Carmelita do Espírito Santo

Membros: Bruno José Rodrigues Alves, Carmelita do Espírito

Santo, Ednaldo da Silva Araújo, Janaína Ribeiro Costa Rouws, Luc

Felicianus Marie Rouws, Luis Cláudio Marques de Oliveira, Luiz

Fernando Duarte, Márcia Rodrigues Reed Coelho

Supervisora editorial: Norma Gouvêa Rumjanek

Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Tratamento de ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

Foto da capa: Luiz Fernando Duarte de Moraes

1ª edição

1ª impressão (2011): 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

CARACTERIZAÇÃO morfo-fisiológica e molecular das estirpes diazotróficas do inoculante de cana-de-açúcar. / Veronica Massena Reis et al. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2013. 31 p. (Embrapa agrobiologia. Documentos, 280).

ISSN: 1517-8498

1. Inoculante. 2. Cana-de-açúcar. I. Reis, Veronica Massena. II. Pitard, Rosa Maria. III. Dourado, Fernanda dos Santos. IV. Camacho, Natália Neutzling. V. Videira, Sandy Sampaio. VI. Camargo, Anita Bueno de. VII. Boa Sorte, Paulo Fernandes. VIII. Vidal, Marcia Soares. IX. Baldani, José Ivo. X. Schwab, Stefan. XI. Embrapa Agrobiologia. XII. Série.

631.84 CDD 23.ed

Autores

Veronica Massena Reis

Marcia Soares Vidal

Stefan Schwab

José Ivo Baldani

Eesquisadores da Embrapa Agrobiologia.

BR 465, km 7, CEP 23890-000 - Seropédica, RJ.

E-mails: veronica.massena@embrapa.br, marcia.

vidal@embrapa.br, stefan.schwab@embrapa.br,

ivo.baldani@embrapa.br

Rosa Maria Pitard

Curadora da Coleção de Culturas

da Embrapa Agrobiologia

Fernanda dos Santos Dourado

Natália Neutzling Camacho

Analistas do Laboratório Coleção de Culturas

Sandy Sampaio Videira

Paulo Fernandes Boa Sorte

Bolsistas de Doutorado em Agronomia - UFRRJ/

Embrapa Agrobiologia

Anita Bueno de Camargo

Bolsista de Doutorado em Fitotecnia - UFRRJ/

Embrapa Agrobiologia

Apresentação

As atitudes de usar com responsabilidade os recursos naturais (solo, água, ar, flora, fauna, energia), de preservar e conservar a natureza são cada vez mais necessárias para a sociedade moderna acarretando em uma busca constante por sistemas de produção agropecuários apoiados em princípios ecológicos e naturais.

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia construiu o seu atual plano diretor de pesquisa, desenvolvimento e inovação com a seguinte missão “gerar conhecimentos e viabilizar tecnologias e inovação apoiados nos processos agrobiológicos, em benefício de uma agricultura sustentável para a sociedade brasileira”.

A série documentos se constitui em uma linha de publicações que visa disponibilizar informações relevantes das mais diversas etapas dos processos de pesquisa científica e tecnológica. Podem disponibilizar revisões de literatura sobre temas relevantes, relatórios técnicos, um determinado procedimento metodológico, levantamentos de campo, entre outros tipos de conteúdo.

A presente publicação intitulada “Caracterização morfo-fisiológica e molecular das estirpes diazotróficas do inoculante de cana-de-açúcar”

tem indicação para todos aqueles interessados em conhecer mais sobre o assunto, portanto, boa leitura.

Eduardo Francia Carneiro Campello
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

Sumário

Introdução	9
Caracterização fenotípica	10
Resistência a antibióticos	14
Aspectos moleculares	18
Amplificação da sequência repetitiva de DNA genômico por BOX-PCR	10
Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)	11
Considerações finais	20
Anexos	21
Referências Bibliográficas	21

Caracterização morfo-fisiológica e molecular das estirpes diazotróficas do inoculante de cana-de-açúcar

Veronica Massena Reis, Rosa Maria Pitard, Fernanda dos Santos Dourado, Natália Neutzling Camacho, Sandy Sampaio Videira, Anita Bueno de Camargo, Paulo Fernandes Boa Sorte, Marcia Soares Vidal, Stefan Schwab, José Ivo Baldani

Introdução

O cultivo de cana-de-açúcar no Brasil é vital para a manutenção da economia de combustíveis fósseis, além da produção de açúcar. Estima-se que a cultura ocupe mais de oito milhões de hectares podendo chegar a 15 milhões até 2015 (CONAB, 2011). O nitrogênio é um dos elementos requeridos em maior quantidade pela cultura, mas sua produção está vinculada ao preço do petróleo, o que pode onerá-la. Sabe-se que a cana-de-açúcar é capaz de obter parte do nitrogênio necessário para seu crescimento através do processo biológico de fixação de nitrogênio (FBN) (URQUIAGA et al., 1992) enquanto que o restante é obtido por meio da utilização de compostos nitrogenados sintéticos que além de onerar a produção são prejudiciais ao meio ambiente uma vez que somente 1/3 da dose aplicada é assimilada pelas plantas.

O uso de bactérias fixadoras de nitrogênio é uma estratégia adotada visando substituir parte do N-fertilizante aplicado na cultura já que as bactérias diazotróficas ao colonizarem os tecidos das plantas fixam o nitrogênio atmosférico e o disponibilizam para as plantas. (BALDANI et al., 2009). Além disso, as bactérias diazotróficas podem exercer outras atividades funcionais tais como produção de fitohormônios que promovem um maior desenvolvimento do sistema radicular. Por

consequente, ajudam na absorção mais eficiente dos fertilizantes nitrogenados aplicados na cultura e assim reduzem os custos de produção e o impacto ambiental negativo.

O desenvolvimento de inoculante para as culturas da família das Poaceae (antiga Gramineae) é uma demanda do setor agrícola brasileiro e que vem sendo trabalhada na Embrapa Agrobiologia há muitos anos. Neste sentido, diversos estudos foram realizados para definir um produto que responda total ou parcialmente às necessidades da cultura (OLIVEIRA et al., 2006). No caso da cana-de-açúcar, a inoculação dessas bactérias, previamente selecionadas em laboratório, é feita por ocasião da implantação do canavial (diretamente nos toletes) e após o corte das canas (nas soqueiras). O inoculante em fase final de desenvolvimento pela Embrapa Agrobiologia para cana-de-açúcar é constituído do consórcio de cinco espécies de bactérias diazotróficas, isoladas da própria cultura e aqui denominado "Inoculante de cana-de-açúcar". As espécies componentes do inoculante são: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica* (OLIVEIRA et al., 2006).

O desenvolvimento de um inoculante requer, dentre os diversos aspectos que envolvem o controle de qualidade do mesmo, a rápida identificação das estirpes. Neste sentido, o presente documento apresenta uma série de testes fenotípicos, bioquímicos e moleculares, alguns dos quais já publicados na literatura, que permitem a identificação das estirpes que compõem o inoculante para cana-de-açúcar.

Caracterização fenotípica

As estirpes presentes no inoculante foram selecionadas a partir de estudos conduzidos inicialmente por Oliveira et al. (2002) e, posteriormente, levadas ao campo em três locais diferentes para quantificar a contribuição da FBN na cultura (OLIVEIRA et al., 2006). Baseado neste trabalho, o consórcio, composto das cinco estirpes apresentado na Tab. 1, foi selecionado como o "Inoculante de cana-de-açúcar".

Para facilitar a identificação das cinco estirpes usadas no consórcio foi indicado o meio de cultivo 79 sólido modificado quanto à fonte de carbono (Anexo I). O mesmo já é utilizado pela indústria de inoculantes do Brasil e é de fácil preparação e por permitir a fácil diferenciação das cinco estirpes. Esta caracterização rápida permite separar no inoculante a presença das duas espécies de *Herbaspirillum*, que crescem em condições idênticas no meio de cultivo semi-sólido JNFb usado para a sua caracterização.

A morfologia das colônias e a sua caracterização estão apresentadas na Fig. 1. Como podemos observar a PAL5 é facilmente diferenciada das outras quatro espécies pelo seu crescimento ácido no meio com açúcar

Tabela 1. Bactérias diazotróficas endofíticas e partes da planta de cana-de-açúcar usadas para a obtenção das estirpes do inoculante.

Espécies	Estirpe	Partes da Planta	Cana-de-açúcar
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	BR 11281 ^T = PAL5 ^T	Raízes	<i>Saccharum</i> sp. (híbrido)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	BR 11335 = HRC54	Raízes	SP701143
<i>H. rubrisubalbicans</i>	BR 11504 = HCC103	Colmos	SP701284
<i>Azospirillum amazonense</i>	BR 11145 = CBAmC	Colmos	CB453
<i>Burkholderia tropica</i>	BR 11366 ^T = PPe8 ^T	Perfilhos	SP711406

Todas as estirpes estão depositadas na coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia.

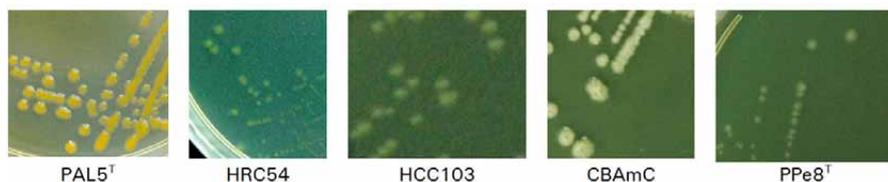


Fig. 1. Morfologia de colônias das cinco estirpes do inoculante de cana-de-açúcar cultivadas em meio de cultura 79 contendo açúcar cristal como fonte de carbono à 30°C pelo período de 5 dias.

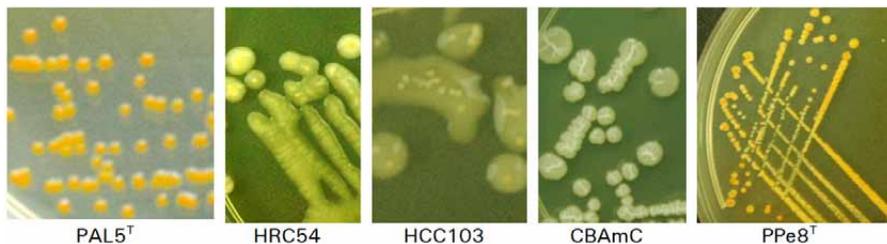


Fig. 2. Morfologia de colônias das cinco estirpes do inoculante de cana-de-açúcar cultivadas em meio de cultura 79 contendo glicose como fonte de carbono à 30°C pelo período de 5 dias.

(açúcar cristal ou glicose), uma vez que as colônias ficam amareladas na presença do indicador azul de bromotimol. As duas estirpes do gênero *Herbaspirillum* são identificadas pela forma da colônia nestes dois meios de cultivo, sendo que no meio 79 com açúcar cristal (Fig. 1 e Tab. 2) há uma menor produção de muco do que na presença de glicose, enquanto que *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103, produz mais muco que a *H. seropedicae* estirpe HRC54 nas duas condições. A estirpe CBAmC é muito fácil de ser caracterizada nestes meios, pois apresenta a mesma colônia rugosa que no meio batata tradicionalmente usado para a sua caracterização (DÖBEREINER et al. 1995). Já a estirpe PPe8^T não fica alaranjada no meio 79 com sacarose e torna-se muito similar a PAL5^T quando crescido na presença de glicose (Fig. 2 e Tab. 3). Estes meios de cultivo podem ser utilizados em conjunto para o cultivo das bactérias a partir das maiores diluições da contagem do inoculante, facilitando a sua identificação prévia e permitindo a sua confirmação molecular (descrita a seguir).

Resistência a antibióticos

A análise da resistência intrínseca de cada estirpe aos diferentes antibióticos mostrou que a maioria delas é sensível aos antibióticos em concentrações que dependem da estirpe e antibiótico testado (Tab. 4). É possível identificar as estirpes com base na resistência intrínseca para no mínimo dois antibióticos quando avaliados em placas

Tabela 2. Morfologia de colônias das cinco estirpes do inoculante de cana-de-açúcar crescidas em meio de cultura 79 contendo açúcar cristal como fonte de carbono à 30°C.

Estirpe	pH do meio	Forma da colônia	Borda da colônia	Superfície da colônia	Produção de muco ^a	Transparência	Cor da colônia
PAL5 ^T	Ácido	Circular	Inteira	Lisa	++	Opaca	Amarelo
HRC54	Alcalina	Circular	Inteira	Lisa	+	Translúcida	Creme c/centro amarelo
HCC103	Alcalina	Circular	Inteira	Lisa	+	Translúcida	Creme
CBAmC	Ácido	Circular	Ondulada	Rugosa	-	Opaca	Creme
PPe8 ^T	Alcalina	Circular	Inteira	Lisa	+	Translúcida	Creme

a- ++ média; + baixa; - ausente.

Tabela 3. Morfologia de colônias das cinco estirpes do inoculante de cana-de-açúcar crescidas em meio de cultura 79 contendo glicose como fonte de carbono à 30°C pelo período de 5 dias.

Estirpe	pH do meio	Forma da colônia	Borda da colônia	Superfície da colônia	Produção de muco ^a	Transparência	Cor da colônia
PAL5 ^T	Ácido	Circular	Inteira	Lisa	+	Opaca	Amarelo
HRC54	Ácido	Circular	Inteira	Lisa	++	Opaca	Creme c/centro amarelo
HCC103	Ácido	Irregular	Inteira	Lisa	+++	Opaca	Creme c/ centro amarelo
CBAmC	Ácido	Circular	Ondulada	Rugosa	-	Opaca	Creme
PPe8 ^T	Ácido	Circular	Inteira	Lisa	+	Opaca	Amarelo c/ borda branca

a- +++ alta; ++ média; + baixa; - ausente

Tabela 4. Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para as estirpes do inoculante de cana-de-açúcar.

Antibiótico	Estirpes				
	PAL5 ^T	HRC54	HCC103	CBAmc	PPe8 ^T
	µg antibiótico/ml meio de cultivo *				
Canamicina	< 25	< 25	< 25	< 25	< 25
Tetraciclina	< 10	< 10	< 10	40	< 10
Ampicilina	<u>500</u> **	1000	1000	1000	500
Estreptomicina	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Cloranfenicol	30	< 15	< 15	30	<u>30</u>
Ácido nalidíxico	20	<u>40</u>	<u>80</u>	40	< 10
Gentamicina	< 20	160	160	80	< 20
Rifampicina	< 10	< 10	< 10	<u>10</u>	20

* As estirpes foram crescidas em meio DYGS líquido e inoculadas em placas de meio DYGS com o uso de cotonete esterilizado (Anexo II).

** As concentrações de antibióticos sugeridas para identificação das estirpes estão apresentadas em negrito (1ª opção) ou sublinhado (2ª opção).

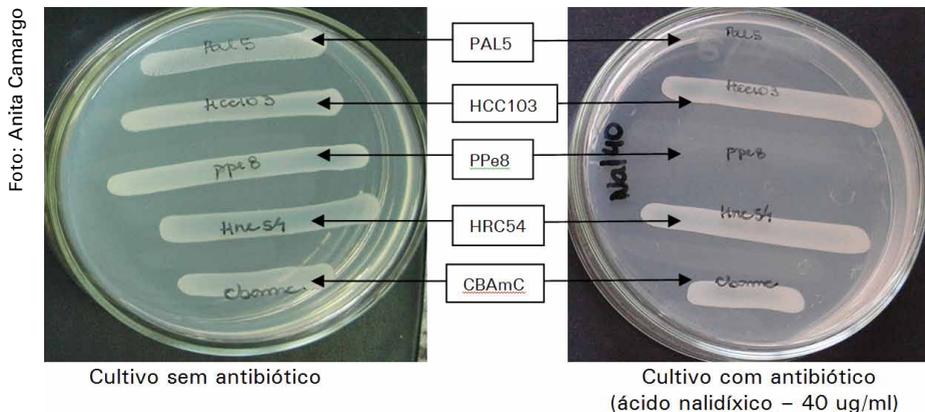


Fig. 3. Crescimento das estirpes do inoculante de cana-de-açúcar em meio DYGS sem e com antibiótico: PAL5^T - *Gluconacetobacter diazotrophicus*; HCC103 - *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; PPe8^T - *Burkholderia tropica*; HRC54 - *Herbaspirillum seropedicae*; CBAmc - *Azospirillum amazonense*.

contendo meio DYG'S (Anexo I): PAL5^T (cloranfenicol e ampicilina); HRC54 (gentamicina e ácido nalidíxico); HCC103 (gentamicina e ácido nalidíxico); CBAmc (tetraciclina e rifampicina) e PPe8^T (rifampicina e cloranfenicol). A Fig. 3 exemplifica a sensibilidade das estirpes ao ácido nalidíxico.

Aspectos moleculares

Amplificação da sequência repetitiva de DNA genômico por BOX-PCR

A análise de sequência repetitiva de DNA genômico das cinco estirpes do inoculante de cana-de-açúcar foi realizada com os iniciador BOX A1R (5´ - CTACGGCAAGGCGACGCTGACG - 3´) (VERSALOVIC et al., 1994) e seguiu a metodologia descrita por Kaschuk et al. (2006). Pode-se observar que as espécies de bactérias diazotróficas apresentaram perfis distintos em relação a quantidade e a intensidade de bandas geradas pelas reações de amplificação por PCR, o que possibilita a diferenciação das estirpes no gel (Fig. 4). Dessa forma, a metodologia permite a análise rápida das estirpes do inoculante de cana-de-açúcar seja em cultura pura ou em mistura. Os detalhes do protocolo usado na caracterização das estirpes encontram-se no anexo III.

Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A técnica de DGGE (MUYZER et al. 1996) foi aplicada para a amplificação da região 16S DNAr das estirpes do inoculante de cana-

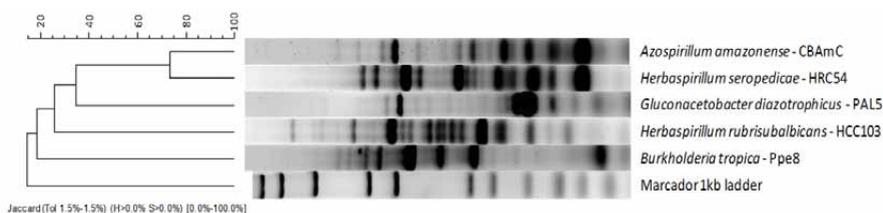


Fig. 4. Perfil genômico das cinco estirpes que compõem o inoculante de cana-de-açúcar obtido através da técnica de BOX-PCR.

de-açúcar visando separar as estirpes com base no posicionamento dos fragmentos (bandas) amplificados no gel de gradiente. O DNA genômico foi inicialmente amplificado com os iniciadores F799 (5` - AAC MGG ATT AGA TAC CCK G-3` , onde M: A ou C; K: G ou T) e R1492 (5` GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3`) conforme descrito por Chelius e Triplett (2001). Em seguida o produto da amplificação foi submetido a uma segunda reação de amplificação utilizando o iniciador 1401R (5` - CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG) e o iniciador com grampo 968F-GC (5` - CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGGAA CGC GAA GAA CCT TAC). Os detalhes das condições das reações encontram-se no anexo IV.

Foi possível efetuar a separação das bandas das estirpes utilizadas no inoculante inclusive para as amostras 4 e 5 que constituem duas espécies do mesmo gênero *Herbaspirillum* (Fig. 5) em gel de gradiente de concentração de formamida. O perfil de bandas gerados no gel foi condizente com o gradiente crescente de agente desnaturante e a porcentagem das bases nucleotídicas GC da região amplificada de estirpes referência das espécies.

Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) - Sequências do 16S DNAr e acesso ao banco NCBI

A sequência parcial (aproximadamente 1400 pares de base) do gene 16S DNAr de cada estirpe, sequenciada na Embrapa Agrobiologia, pode ser acessada no Banco de dados do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) com os códigos de identificação apresentados na Tab. 5. A amplificação do 16S DNAr foi realizada com os iniciadores Y1 e Y3 conforme descrito por Cruz et al. (2001). Os detalhes do protocolo usado na caracterização das estirpes encontram-se no anexo V.

Análise in silico

As sequências do 16S DNAr obtidas do banco de dados do Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) foram submetidas à análise *in silico*. Para

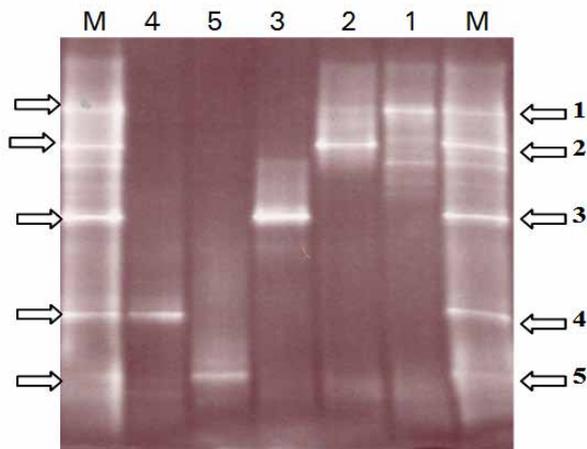


Fig. 5. Gel de DGGE corado com Syber Gold evidenciando o fragmento do gene 16S DNAr, amplificado por PCR, correspondente a cada estirpe constituinte do inoculante de cana-de-açúcar: 1 - PAL5^T - *Gluconacetobacter diazotrophicus*, 2 - PPe8^T - *Burkholderia tropica*, 3 - CBAmC - *Azospirillum amazonense*, 4 - HRC54 - *Herbaspirillum seropedicae* e 5 - HCC103 - *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. M - Mistura Padrão contendo o produto de amplificação do 16SS DNAr das 05 estirpes. O gradiente químico de desnaturação utilizado para a análise foi de 55% a 65% de uréia-formamida e 6% de poliacrilamida.

tanto, as sequências foram exportadas para o programa pDRAW32 com o objetivo de escolher as seis endonucleases de restrição que são rotineiramente utilizadas para a análise de ARDRA. O gel de eletroforese virtual foi feito com as seguintes condições: gel de agarose 2,5%; mínimo de 100 pares de base. Os resultados apresentados na Fig. 6 indicam que as enzimas *AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *Hpy188III*, *MboI* e *TaqI* permitem distinguir as estirpes do inoculante. O uso dessas enzimas durante o processo de digestão do produto de PCR do gene 16S DNAr das bactérias do inoculante deverá mostrar um perfil de bandas muito similar ao perfil obtido nas análises *in silico*. O Anexo VI apresenta a metodologia a ser empregada nas reações de digestão.

Tabela 5. Código de identificação das seqüências de 16S DNAr das estirpes do inoculante de cana-de-açúcar depositadas no banco de dados do NCBI.

Espécies	Estirpe	Código de identificação - NCBI
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	PAL5 ^T	NR_027591
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	HRC54	HM485593
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	HCC103	HM485594
<i>Azospirillum amazonense</i>	CBAmc	HM485596
<i>Burkholderia tropica</i>	Ppe 8 ^T	NR_028965

Tabela 6. Descrição das sondas oligonucleotídicas utilizadas na hibridização *in situ* das estirpes que compõem o inoculante de cana-de-açúcar.

Estirpe	Nome da Sonda oligo- nucleotídica	Seqüência da sonda	Posição no genoma/ estringência* de hibridização	Referência
PAL5 ^T	Glac. Dia. GDDA	5'CGGGAAACAGCCATCTCT3'	16S (1012-1029)/20**	Franke-Whittle et al. (2005)
HRC54	Hsero445	5'GCCAAAACCGTTTCTTCC3'	16S (445-462)/35**	Kirchhof et al. (2001)
HCC103	Hrubri -445	5'GCTACCACCGTTTCTTCG3'	16S (445-462)/60**	Kirchhof et al. (2001)
CBAmC	Aama1250	5'CACGAGTGCCTGCCAC3'	16S (1250-1267)/50**	Stoffels et al (2001)
Ppe8 ^T	Btrop636	5'CAAGCGATGCAGTCACCA3'	16S (636-653)/55**	Stoffels et al (2001)

*. A temperatura ótima para as hibridizações foi de 46°C, sendo que a mesma foi alcançada com a variação na % de formamida (***) empregada na reação.

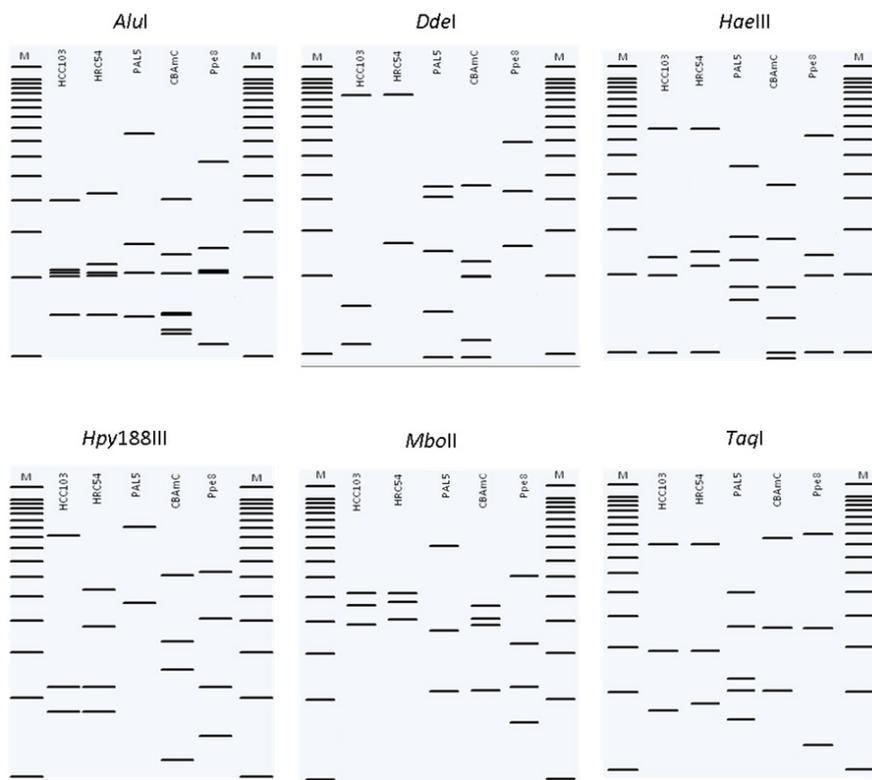


Fig. 6. Representação gráfica do perfil de bandas esperado pela restrição do produto de amplificação do gene 16S DNAr das estirpes do inoculante de cana-de-açúcar com base nas seqüências de 16 S DNAr depositada no banco de dados do NCBI.

Uso de sondas oligonucleotídicas espécie específicas

As estirpes também podem ser identificadas através do uso de sondas oligonucleotídicas fluorescentes espécie-específica conforme apresentado na Tab. 6. Com exceção das sondas para as estirpes PAL5^T e PPe8^T, as demais foram desenhadas para outras estirpes pertencentes as mesmas espécies que compõem o inoculante de cana-de-açúcar. Como existe uma alta conservação das regiões das seqüências de 16S DNAr as sondas devem reconhecer as estirpes do inoculante conforme já foi observado durante a validação das sondas.

As sondas indicadas foram usadas com sucesso no trabalho de Oliveira et al. (2009) em estudos de colonização de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar pelas estirpes do inoculante de cana.

As sondas permitem identificar as espécies presentes no inoculante mesmo quando as duas estirpes do gênero *Herbaspirillum* (HRC54 e HCC103) estão presentes nas amostras. Entretanto, o método não permite a separação das estirpes inoculadas em casos das amostras apresentarem outras estirpes da mesma espécie. O preparo das amostras e as etapas de hibridização das sondas com as células bacterianas estão detalhados no anexo VII. As reações de hibridização são analisadas no microscópio de epifluorescência

Considerações finais

A produção de um inoculante em larga escala pela indústria agrícola requer um controle rígido de identificação, manutenção celular e estoque. A instrução normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), preconiza como qualidade a pureza e o elevado número de células viáveis; além da determinação do tempo de estocagem que são descritos na embalagem do produto. O estabelecimento de testes rápidos de rotina, que permitam identificação das estirpes assim como a detecção de possíveis contaminantes durante o processo de produção, é fundamental na recomendação e venda de insumos biológicos no Brasil. No caso de inoculantes para as leguminosas, os testes de rotina já estão bem definidos (HUNGRIA et al. 2005). Entretanto, para as plantas da família das Poaceae e em especial para a cana-de-açúcar, não existem informações padronizadas para serem ofertadas. Neste sentido, o presente documento sugere uma série de análises que incluem testes morfo-fisiológicos e moleculares que permitem identificar de maneira rápida as cinco estirpes presentes no inoculante quer seja durante a fase de produção ou nas etapas de cura e armazenamento do produto, até a etapa final da venda aos agricultores.

ANEXOS

I. Meios de cultivo

Meio 79 - As quantidades para 1.000 ml são: 10 g de manitol*; 1 ml de solução de K_2HPO_4 a 10%; 1 ml de solução de K_2HPO_4 a 10%; 4 ml de solução de KH_2PO_4 a 10%; 2 ml de solução de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 10%; 1 ml de solução de NaCl a 10%; 0,4 g de extrato de levedura; 5 ml de solução de azul de bromotimol a 0,5% em 0,2N de KOH. Completar para 1000 ml com água destilada, ajustar o pH para 6,8-7,0 com solução de KOH a 10% e colocar ágar por último (18 g).

* *O manitol pode ser substituído pelo açúcar cristal ou pela glicose na mesma quantidade e o pH é ajustado para 6,0.*

Meio DYGS - Composição (g L⁻¹): 2 g glicose; 2 g ácido málico; 1,5 g peptona; 2 g extrato de levedura; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,5 g ácido glutâmico. Completar o volume para 1000 ml com água destilada. Ajustar para pH 6, para *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* e pH 6,8 para as espécies de *Azospirillum*.

II. Resistência intrínseca aos antibióticos

Uma colônia de cada bactéria foi inoculada em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura Dygs que foram mantidos sob agitação (150 rpm, 30°C) por aproximadamente 24 horas. O plaqueamento foi realizado com o auxílio de hastes flexíveis com ponta de algodão estéreis, onde cada espécie de bactéria foi embebida na ponta da haste e levemente friccionada contra o meio de cultura Dyg's sólido contendo concentrações crescentes dos antibióticos testados: canamicina (25 a 400 ug/ml), tetraciclina (10 a 320 ug/ml), ampicilina (125 a 4000 ug/ml), estreptomomicina (10 a 320 ug/ml), cloranfenicol (15 a 240 ug/ml), ácido nalidíxico (10 a 320 ug/ml), gentamicina (20 a 640 ug/ml) e rifampicina (10 a 320 ug/ml). As placas foram incubadas por 24 horas a 30°C e analisadas visualmente.

III. BOX-PCR

Cada reação de amplificação com volume final de 25 μl foi composta de 25 ng de DNA genômico; 20 mM de Tampão para PCR; 0,05% de Tween 20; 3 mM de MgCl_2 ; 0,3 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dNTPs - dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Cat. No. 11615010) e 2 μM do iniciador BOX A1R. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador do tipo Mastercycler[®] gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) com uma desnaturação inicial de 94°C por 7 minutos; seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto; anelamento a 53°C por 1 minuto; extensão à 65°C por 8 minutos; e uma extensão final à 65°C por 16 minutos. Após a amplificação, 12 μl de cada amostra foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% a uma voltagem de 65 volts/cm por 6 horas em tampão TAE 1X (40 mM de Tris base, 5 mM de acetato de sódio pH 7,8 e, 1 mM de EDTA). Em seguida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e visualizado sob a luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak). As imagens foram capturadas e salvas diretamente como documentos do tipo TIFF e processadas pelo programa GelCompar II versão 2.0 para Windows (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). As matrizes de similaridade foram calculadas utilizando-se o coeficiente de correlação de Jaccard. As análises de agrupamentos de matrizes de similaridade foram realizadas utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*).

IV. Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE)

O procedimento sugerido é o descrito por Muyzer et al. (1996). Inicialmente foi realizada uma amplificação com os iniciadores utilizados por CHELIUS e TRIPLETT (2001). A reação de PCR foi constituída de iniciadores F799 (5` - AAC MGG ATT AGA TAC CCK G-3` onde M: A ou C; K: G ou T) e R1492 (5` GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3`) na concentração de 0,12 μM cada, tampão de reação (10 mM), MgCl_2 (3,0 mM), dNTPs (0,2 mM cada), albumina bovina (0,5 $\mu\text{g}\ \mu\text{L}^{-1}$), *Taq*

DNA polimerase (2 U) e aproximadamente 80 ng de DNA para um volume final de 50 μ l por reação. As condições de reação foram as mesmas descritas pelos autores acima: desnaturação inicial de 95 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos com 20 seg. a 94 °C, 40 seg. a 53 °C e 40 seg. a 72 °C, seguidos de uma extensão final de 72 °C por 7 min. Após a primeira reação de PCR, 1 μ l do produto obtido (diluído 1:25) foi submetido à nova reação de PCR, contendo 20 mM de Tampão para PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP; 0,06 mg.ml⁻¹ de BSA l⁻¹; 3 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Cat. No. 11615010) e 0,5 μ l dos iniciadores 1401r e o grampo GC-968f (HEUER e SMALLA, 1997) na concentração de 25 mM em um volume final de 50 μ l por reação. Ao final da reação de PCR, o material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE 1X (40 mM de Tris base, 5 mM de acetato de sódio pH 7,8 e, 1 mM de EDTA) a 100 V por 1 h, para visualização da qualidade do material amplificado. O produto da amplificação foi analisado por DGGE, em gradiente desnaturante de 50 a 70%, com uso do sistema DCode System. Foram utilizados 15 μ l de DNA amplificado por linha, tampão de corrida (0,5% de azul de bromofenol, 40% de sacarose, 0,1 mol.l⁻¹ de EDTA e 5% de SDS), na concentração final de 1X. Como marcador para normalização dos géis, foi utilizado uma mistura formada por amplicons do 16S DNAr das cinco bactérias do inoculante de cana-de-açúcar cujas cujas posições de bandas no gel são conhecidas e são dispostas nas laterais e na parte central dos géis (BOA SORTE, 2009). Após a eletroforese em 120 volts/cm a 60°C durante 16 horas, o gel foi corado com prata e permaneceu secando por um período de 5 dias. Os géis obtidos foram analisados utilizando o programa GelCompar II.

V. Protocolo extração DNA, amplificação do gene 16S DNAr e sequenciamento do produto de amplificação

a. Protocolo extração DNA

O DNA genômico foi extraído com o *Wizard Genomic DNA Purifications Kit* (Promega, Cat. No. A1120). Outros kits e métodos podem ser utilizados desde que seguido as instruções do fabricante. A partir

do material purificado em placas contendo meio sólido, uma colônia isolada de cada bactérias foi cultivada em meio DYGS por 24 horas a uma rotação de 150 rpm sob temperatura de 30°C. Posteriormente, 1 ml da cultura foi centrifugado por 2 minutos a 13.000-16.000 x g (Máxima velocidade da microcentrífuga) e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 600 µl de solução de lise celular ao precipitado, agitando-se gentilmente com auxílio da micropipeta seguido da incubação a 80°C por 5 minutos. Os tubos foram mantidos sob a bancada até atingirem a temperatura ambiente. Adicionou-se 3 µl da solução de RNase, seguido da mistura e incubação a 37°C por 15-60 minutos. Para precipitação das proteínas, foi adicionado 200 µl da solução de precipitação de proteínas, procedido de homogeneização e incubação por 5 minutos no gelo. As amostras foram centrifugadas a 13.000-16.000 x g por 3 minutos. Para a precipitação do DNA, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionado 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente. O material foi centrifugado por 2 minutos a 13.000-16.000 x g e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 600 µl de etanol a 70% a temperatura ambiente e procedeu-se uma nova centrifugação por 2 minutos a 13.000-16.000 x g sendo que o sobrenadante foi removido com auxílio de uma micropipeta. Os microtubos foram mantidos a temperatura ambiente até completa secagem do precipitado. Posteriormente, foram adicionados 100 µl de solução de reidratação e incubados por 1 hora a 65°C. As amostras foram armazenadas a -20°C.

b. Amplificação do 16S DNAr

Cada reação de amplificação com volume final de 50 µl foi composta de 50 ng de DNA genômico; 20 mM de Tampão para PCR; 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; 2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Cat. No. 11615010) e 0,5 µM de cada iniciador. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo PTC-100 (MJ Research, Watertown, Estados Unidos da América) ou similar. Os ciclos de amplificação constituir-se de uma etapa de desnaturação a 93°C por 45 segundos, uma etapa de anelamento a 62°C por 45 segundos

e uma etapa de extensão a 72°C por 2 minutos. Ao final de 35 ciclos, foi efetuada uma última etapa de extensão a 72°C por 5 minutos. Após a reação de amplificação, os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (40 mM de Tris base, 5 mM de acetato de sódio pH 7,8 e, 1 mM de EDTA), segundo Sambrook e Russell (2001). Cinco microlitros de cada amostra, juntamente com 2^o μl de tampão da amostra foram submetidos a uma voltagem de 80 volts por 2 horas em tampão TAE 1X. Em seguida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 μg.ml⁻¹) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak®) para avaliação do produto amplificado com relação ao sucesso da reação, tamanho e concentração aproximada.

c. Sequenciamento do produto de amplificação do 16S DNAr

Para a reação de sequenciamento foram utilizados 200 ng dos produtos de PCR purificados, 1 μl de cada iniciador 5,0 μM (27f e 108r; Amp2 e 420r; 16S1203f e 16S1110r), 4,0 μl do kit "TE Dynamics Kit"(GE Healthcare) e água ultrapura para o volume final de 10 μl. As condições para a reação de sequenciamento foram: 25 ciclos de desnaturação anelamento e extensão de 95°C por 25 segundos, 58°C por 15 segundos; 60°C por 1 minuto, respectivamente. Após a reação de marcação, as amostras foram precipitadas adicionando 1,0 μl de acetado de amônio 7,5 M e 27,5 μl de etanol e incubadas a 4°C por uma noite. Em seguida foram centrifugadas a 3.220 x g por 45 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 100 μl de etanol a 70% e novamente centrifugado 3220 x g por 10 minutos a 4°C. As amostras foram secas ao ar, e ressuspensas em 7,5 μl de tampão de carregamento ou de amostra para Mega BACE ("loading") e analisadas em sequenciador automático MegaBACE1000 (GE Healthcare).

d. Análise de restrição do produto do 16S DNAr amplificado por PCR

Uma amostra contendo 5-8 μl de produto de PCR foi digerida a 37°C (65°C para *TaqI*) por 2 horas, utilizando-se 10 U de enzima de restrição

e tampão correspondente 1X. Ao final da digestão, os produtos foram separados em eletroforese em gel de agarose 2,5-3,0% em tampão TAE 1X (40 mM de Tris base, 5 mM de acetato de sódio pH 7,8 e, 1 mM de EDTA) a uma voltagem de 50 volts/cm por aproximadamente 4 horas. Em seguida, o gel foi corado e analisado conforme descrito no item anterior.

e. Hibridização *in situ*

Fixação das células bacterianas

Os isolados devem ser crescidos em meio líquido DYGS, pH 6,0 (para as estirpes de *Herbaspirillum*, *G. diazotrophicus* e *A. amazonense*) e NB, pH 5,2 (para a estirpe de *Burkholderia*), sob agitação de 150 rpm, a 30°C, por cerca de 12 h e com densidade óptica (D.O.) próxima de 0,8 usando um comprimento de onda de 436 nm. Posteriormente, alíquotas de 1 ml das bactérias devem ser centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos, lavados duas vezes em 1 ml de PBS estéril (por filtração em millipore de 0,2 µm) e centrifugados na mesma rotação e pelo mesmo período. Em seguida, devem ser ressuspensos em 1 ml de paraformaldeído a 4% (PFA:PBS), onde permaneceram por 1 h sobre a bancada do laboratório à temperatura ambiente. Logo após, devem ser centrifugados, lavados 1 vez em 1 ml de PBS, novamente centrifugados, ressuspensos em 1 ml de etanol:PBS (6:4) e, por fim, guardados em freezer doméstico pelo período de até 6 meses.

Montagem das lâminas

As lâminas contendo 6 campos de marcação devem ser previamente lavadas em água destilada, sonicadas duas vezes por 1 minuto, imersas em álcool isopropanol por 10 minutos, secas a temperatura ambiente e banhadas em Bacto Gelatin (Difco) a 1% em água ultrapura. Após o banho as lâminas devem ser secas durante a noite. Em cada campo da lâmina de hibridização devem ser colocados 10 µl da suspensão de células guardadas em etanol:PBS. Essas lâminas devem ser secas à temperatura ambiente por 30 minutos e então, imersas por ± 30 minutos em cada uma das soluções de etanol a 50, 80 e 100% sucessivamente.

Processo de hibridização

Uma alíquota de 8µl de tampão de hibridização (vide abaixo) e 1µl de sonda oligonucleotídica são transferidos para poços individuais da lâmina. Em seguida, as lâminas devem ser incubadas a 46°C em tubos de fundo cônico com capacidade para 50 ml, contendo papel embebido com 2 ml do tampão de hibridização correspondente (o fator determinante da hibridização foi dependente de diferentes % de formamida usadas), por no mínimo 1h30 minutos, lavando-se logo após, com tampão de lavagem (vide abaixo) por 15-20 minutos a 46°C. Posteriormente, devem ser lavadas em água destilada para remover o excesso de tampão de lavagem e secas à temperatura ambiente e, então avaliadas em microscópio de epifluorescência com adição da solução anti-fading (Glicerol:PBS, na proporção de 7 para 3) sob a lamínula e entre os campos.

Tampão de hibridização

Todas as soluções devem ser preparadas com água ultrapura e filtradas antes do uso. Por lâmina: Tris-HCl a 1 M pH 8,0 - 40 µl; SDS a 10% - 2 µl; NaCl a 5 M - 360 µl. Completar para 2 ml com água ultrapura estéril. OBS. A concentração de formamida (FA) foi ajustada com base na % sobre o volume final do tampão (2 ml). A mesma foi definida de acordo com os valores apresentados na Tab. 6 para cada tipo de sonda.

Tampão de lavagem

EDTA a 0,5 M pH 8,0 - 0,5 ml; Tris-HCl a 1 M pH 8,0 - 1,0 ml; SDS a 10% - 50 l; NaCl a 5 M. Completar para 50 ml com água ultrapura.

Referências Bibliográficas

BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; SCHWAB, S.; OLIVAES, F. L.; HEMERLY, A. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; NOGUEIRA, E. M.; ARAUJO, J. L. S. de; BORGES, L. E.; SOARES, L. H. de B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V. L. D.; CARVALHO, T. L. G. de; ALVES, B. J. R.; JAMES, E. K.; JANTALIA, C. P.; FERREIRA, P. C. G.; VIDAL, M. S.; BODDEY, R. M. Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família Poaceae (antiga Gramineae). **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 6, p. 204-271, 2009.

BOA SORTE, P. M. F. **Uso da técnica de DGGE para monitorar o estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em duas variedades de cana-de-açúcar**. 56 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The Diversity of Archaea and Bacteria in association with the Roots of *Zea mays* L., **Microbiology Ecology**, v. 41, p. 252- 263, 2001.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO.

Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>> Acesso em fev. 2011.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, I.; PEDROSA, F. O. 16s ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated ITom banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas.** Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60 p.

FRANKE-WHITTLE, I. H.; O_SHEA, M. G.; LEONARD, G. J. e SLY, L. I. Design, development, and use of molecular primers and probes for the detection of gluconacetobacter species in the pink sugarcane mealybug. **Microbial Ecology**, v. 50, p. 128-139, 2005.

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: van ELSAS, J. D., TREVORS, J. T. Wellington EMH (Ed.). **Modern soil microbiology.** Dekker, New York, p. 353-373, 1997.

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, F. M.; MENDES, I. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. **Inoculant preparation, production and application.** In: WERNER, D.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation agriculture, forestry, ecology and the environment.** Dordrecht, Amsterdam: Springer, 2005. 347 p. p. 224-253.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 32, p. 210-220, 2006.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fiber plants.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 51, p. 157-168, 2001.

MUYZER, G.; HOTTENTRAGER, S.; TESKE, A.; WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA: A new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities. In: AKKERMANS, A. D. L.; van ELSAS, J. D., de BRUIJN, F. J. (Ed.). **Molecular Microbial Ecology Manual**. Kluwer, Dordrecht, 1996, p.1-27.

OLIVEIRA, A. L. M., CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S., REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, p. 23-32, 2006.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**. v. 45, p.106-113, 2009.

STOFFELS, M.; CASTELLANOS, T.; HARTMANN, A. Design and application of new 16S rRNA-targeted Oligonucleotide Probes for the *Azospirillum-Skermanella-Rhodocista*-Cluster. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24:83-97, 2001.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen-fixation to sugarcane: nitrogen 15 and nitrogen balance estimate. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, p.105-114, 1992.

VALENTIN, J. L. **Ecologia numérica: introdução à análise multivariada de dados ecológicos**. Rio de Janeiro: Interciências, 2000. 118 p.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

Embrapa

Agrobiologia

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA