

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

Uso da Técnica de PCR em Tempo Real para
Quantificação de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em
Tecidos de Cana-de-açúcar

Cleudison Gabriel Nascimento da Silva

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**USO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA
QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS
EM TECIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

CLEUDISON GABRIEL NASCIMENTO DA SILVA

Sob a Orientação do Professor
Dr. Segundo Urquiaga

e Co-orientação do
Dr. Jean Luiz Simões de Araújo

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Fitotecnia**, no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRRJ, Área de concentração em Produção Vegetal.

Seropédica, RJ
Agosto de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586u Silva, Cleudison Gabriel Nascimento da, 1989-
Uso da Técnica de PCR em Tempo Real para
Quantificação de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em
Tecidos de Cana-de-açúcar / Cleudison Gabriel
Nascimento da Silva. - 2017.
98 f.

Orientador: Segundo Urquiaga.
Coorientador: Jean Luiz Simões-Araújo.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Fitotecnia , 2017.

1. Bactérias Diazotróficas Endofíticas. 2.
Inoculante para Cana-de-açúcar. 3. Ácidos Nucleicos .
4. Primers Específicos . 5. PCR em Tempo Real. I.
Urquiaga, Segundo , 1950-, orient. II. Simões-Araújo,
Jean Luiz, 1969-, coorient. III Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Fitotecnia . IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

CLEUDISON GABRIEL NASCIMENTO DA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Fitotecnia** no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Produção Vegetal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 07/08/2017.

Jean Luiz Simões de Araújo. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Coorientador)

José Ivo Baldani. Ph.D. Embrapa Agrobiologia

Márcia Soares Vidal. Dr^a. Embrapa Agrobiologia

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho a todos os professores que desde o ensino fundamental
vem contribuindo para minha formação.*

Acredito que vocês fizeram a diferença!

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai, por nos fazer seres surpreendentemente pensantes e tudo o que há de fascinante.

Ao povo brasileiro, principal financiador dos meus estudos.

Ao Dr. Segundo Urquiaga, por ter acolhido a proposta do projeto de dissertação e por ter me dado a oportunidade de trabalhar como seu orientado.

A Dra. Veronica Massena Reis, por ter colaborado imensamente com recursos e ideias na execução do projeto de dissertação.

Ao Dr. José Ivo Baldani, pelas ideias e a disposição para sempre está colaborando.

A Dr^a. Marcia Soares Vidal, pelos ensinamentos e colaboração desde a iniciação científica.

Ao Dr. Jean Luiz Simões de Araújo, pela coorientação assistida, proveitosa e amigável.

Aos colaboradores da Embrapa Agrobiologia: Hernani, Roberto, Nivaldo, Alderi, Luciano, etc. por tanto ter contribuído na montagem e acompanhamento dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório Genética e Bioquímica, e Ciclagem de Nutrientes: Carol, Patrícia, Jéssica, Francine, Elizabete, Nathalia, Bruna, Carlos, Daniella, Cleiton, Stefan, Amanda, Rafael, Márcio, Selenobaldo, Jean Felix, etc., pela força e companheirismo.

Aos colegas do Alojamento Embrapa Agrobiologia: Antônio Carlos, Edevaldo, Leonardo Terra, Vinícius, Rita, Gladis, Gustavo, Pedro, Lívia, Rodolfo, Josima, Kerly, Natália, Franciara, Murilo, Ernandes, Gabriel, Felipe, Daniel, Adamastor, Wadson, Zé, Ediana, Rulfe, Cassador, Lucero, Hagabo, Lucia, Jéssica, Priscila, etc., pelo companheirismo, convivência e confraternizações.

Aos meus Familiares, pela força e apoio as minhas decisões.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Cleudson Gabriel Nascimento da Silva, filho de Marilene Nascimento da Silva e Edson Ribeiro da Silva, nasceu no dia 02 de agosto de 1990 na cidade Marabá PA. Ingressou no Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Araguatins, TO no ano de 2007, onde iniciou o curso Técnico em Agropecuária obtendo o título de Técnico em Agropecuária em dezembro de 2009. No ano de 2010 deu início ao curso de graduação em Engenharia Agrônômica na mesma instituição, onde cursou até 2012. Nesse mesmo ano, ingressou como graduando em Agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), concluindo no ano 2015. Foi bolsista de Iniciação Científica, vinculado ao projeto INCT-FBN do CNPq de 2013 a 2014 sob a orientação e coorientação dos pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, Marcia Soares Vidal e Jean Luiz Simões de Araújo, respectivamente.

RESUMO

DA SILVA, Cleudson Gabriel Nascimento. **Uso da Técnica de PCR em Tempo Real para Quantificação de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Tecidos de Cana-de-açúcar.** 2017. 98 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia, Agronomia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

O inoculante para cana-de-açúcar, desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia, pode aumentar a produção da cultura por meio da promoção do crescimento vegetal. Esse biofertilizante é composto por estirpes de cinco espécies de bactérias diazotróficas: *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (HCC103), *H. seropedicae* (HRC54), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal5^T), *Nitrospirillum amazonense* (CbAmc) e *Paraburkholderia tropica* (Ppe8^T), as quais foram isoladas da própria cultura. Além de fixarem nitrogênio atmosférico, essas bactérias também desempenham outros papéis tais como: atividade antipatógena, produção de hormônios vegetais e sideróforos, e o aumento da tolerância a estresses. Apesar desses efeitos benéficos, ainda há necessidade de ampliar o conhecimento sobre o estabelecimento das bactérias inoculadas nos tecidos da cana-de-açúcar. A fim de monitorar a populacional dessas bactérias no interior da planta foram desenhados primers para PCR em Tempo Real utilizando (qPCR) os programas *Primers3Plus* e *Oligo Explore*. Esses primers tiveram sua especificidade avaliada em nível de espécie e estirpe utilizando a PCR convencional para posterior utilização na quantificação por qPCR. A quantificação das bactérias do inoculante utilizando o qPCR com os primers selecionados foi comparada com as técnicas de contagem em Câmara de Neubauer e Microgota em placa. Para testar os primers, a partir do DNA extraído de plantas de cana-de-açúcar, foram montados dois experimentos, um ao ar livre em solo e o outro em casa de vegetação em areia com vermicula (2:1) esterilizada, ambos na Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ, utilizando as variedades de cana-de-açúcar RB867515 e RB92579. As coletas de tecidos ocorreram para o primeiro experimento aos 90, 180 e 270 dias após o plantio e para o segundo aos 25, 40 e 55 dias após a inoculação. O DNA para análise foi extraído de aproximadamente 300 mg de cada tecido (raiz e parte aérea). As análises de PCR mostraram que os primers Hr103C4062, Pt8C14 e Pt8C3641 são provavelmente estirpe-específico para a estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans* e a estirpe Ppe8^T de *P. tropica* respectivamente. O primer de maior sensibilidade foi o NaCbCgyrA capaz de amplificar a partir de apenas 0,0000067 ng de DNA alvo. A qPCR mostrou maior sensibilidade para quantificação do número de células bacterianas que a contagem por Microgota em placa pelo teste de média Tukey a 5% de significância. As análises estatísticas do experimento I mostraram que não houve diferença significativa na população geral das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar, para os tratamentos inoculados e não inoculados, ou com e sem dose de N-fertilizante. No experimento II também não houve diferença estatística na média geral, para tratamento inoculado e controle, porém, para as espécies bacterianas do inoculante individualmente houve acréscimo populacional significativo. Além disso, em ambos os experimentos a população das bactérias do inoculante para cana-de-açúcar foi reduzida com o tempo.

Palavras-chave: Endofíticas, *Saccharum officinarum*, Oligonucleotídeos, Quantificação, qPCR.

ABSTRACT

DA SILVA, Cleudson Gabriel Nascimento. **Use of the Real-Time PCR Technique for Quantification of Endophytic Diazotrophic Bacteria in Sugarcane Tissues**. 2017. 98 f. Dissertation (Masters in Plant Science, Agronomy). Institute of Agronomy, Department of Plant Science, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The inoculant for sugarcane, developed by Embrapa Agrobiologia, can increase crop production by promoting plant growth. This biofertilizer is composed of strains from five species of diazotrophic bacteria: *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (HCC103), *H. seropedicae* (HRC54), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal5^T), *Nitrospirillum amazonense* (CbAmc) and *Paraburkholderia tropica* (Ppe8^T), which were isolated from sugarcane. In addition to fixing atmospheric nitrogen, these bacteria also play other roles such as: antipathogenic activity, production of plant hormones and siderophores, and increased stress tolerance. Despite these beneficial effects, there is still a need to increase the knowledge about the establishment of the bacteria inoculated in the sugarcane tissues. In order to monitor the population of these bacteria inside the plant primers were for PCR and Real Time using (qPCR) designed using the softwares Primers3Plus and Oligo Explore. These primers had their specificity assessed at the species and strain level using standard PCR for subsequent use for qPCR quantification. Quantification of the inoculant bacteria using qPCR with the selected primers was compared with counting techniques in Neubauer Chamber and Microdrop in plaque. In order to obtain sugarcane DNA to test the primers, two experiments were carried out, one in the open air and the other in green house with sterilized vermicula and sand (2:1), both at Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ, using the sugarcane varieties RB867515 and RB92579. Plant tissues were harvested for the first experiment at 90, 180 and 270 days after planting and at the second experiment at 25, 40 and 55 days after inoculation. The DNA for analysis was extracted from approximately 300 mg of each tissue (root and shoot). PCR analyzes suggest that the primers Hr103C4062, Pt8C14 and Pt8C3641 are strain-specific for the HCC103 strain of *H. rubrisubalbicans* and the *P. tropica* strain Ppe8^T respectively. The most sensitive primer was NaCbCgyrA, capable of amplifying from only 0.0000067 ng of target DNA. The qPCR showed to be more sensitivity for quantification of the bacterial cell number than the counting by Microdrop on plate by the Tukey test at 5% of significance. Experiment I statistical analysis showed that there was no significant difference in the general from sugarcane bacteria inoculant population for inoculated and non-inoculated treatments, as well as with or without N fertilizer dose. In the experiment II there was also no statistical difference in the general mean for inoculated treatment and control, however, for the bacterial species of the individual inoculant there was a significant population increase. Moreover, in both experiments the bacterial population of the sugarcane inoculant was reduced over time.

Key words: Endophytic, *Saccharum officinarum*, Oligonucleotides, Quantification, qPCR.

LISTA DE ABREVIACOES E SMBOLOS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
®	Marca registrada
° C	Grau Celsius
16S rDNA	DNA que codifica para o gene 16S
A	Adenina
C	Citosina
Ct	Cycle Threshold – Limiar da Fase Exponencial da qPCR
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamnio
DAI	Dias Após a Inoculação
DAP	Dias Após o Plantio
DIECA	cido dietilditiocarbmico
DNA	cido dextrorribonuclico
dNTP	Desoxirribnucleotdeos trifosfatados
dsDNA	cido Nucléico dupla fita
<i>E</i>	Eficiência de amplificação
F	Primer <i>forward</i>
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
fg	Fentograma
g	Grama
G	Guanina
ha	Hectare
log ₁₀	Logaritmo na base dez
Mg	Megagrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
N	Nitrogênio
N ₂	Nitrogênio atmosférico
ng	Nanograma
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PVP	Polivinilpirinolidona
qPCR	PCR em Tempo Real
R	Primer <i>reverse</i>
R ²	Coefficiente de determinação
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T	Timina
<i>T_a</i>	Temperatura de anelamento
<i>T_m</i>	Temperatura de Melting
UFC	Unidades formadoras de colônia
V	Volts

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Uso de BOX-PCR para caracterização molecular das bactérias do inoculante para cana-de-açúcar. Adaptado de Reis et al. (2011).	10
Figura 2. Representação do ciclo da PCR com suas etapas de amplificação (NEVES & LORENA, 2009).	12
Figura 3. Principais etapas da curva gerada durante os ciclos da PCR em tempo real. Adaptado de SIGMA [®] (2008).	16
Figura 4. Modelo da curva de calibração com equação linear, formada pelos valores: <i>Slope</i> (-3,322) e interceptação da reta (37,932) com o coeficiente de regressão igual a 1. Fonte: Kralik & Ricchi (2017).	16
Figura 5. Curva de Melting de uma qPCR mostrando ampliações específicas e inespecíficas. Fonte: Norlan et al. (2014).	18
Figura 6. Representação dos quadrantes na região chamada retículo de Neubauer. Fonte: Angelis & Valsechi (2008).	22
Figura 7. Fases do crescimento e desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar utilizados no Experimento I. Da esquerda para direita: Plantio, 90 DAP, 180 DAP e 270 DAP.	28
Figura 8. Fases do crescimento e desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar utilizadas no Experimento II. Da esquerda para direita: transplante, 15 DAT, 30 DAT e 45 DAT.	29
Figura 9. Gel de agarose 2% com o produto da amplificação por PCR convencional utilizando os primers Hr103C1870 (A), Hr103C3867 (B), Hr103C3868 (C) e Hr103C4062 (D) a partir do DNA genômico das 5 estirpes de bactérias do inoculante: 1) HCC103 ; 2) HRC54; 3) Ppe8 ^T ; 4) Pal5 ^T ; 5) CbAmc e (--) controle negativo. M- marcador de peso molecular	33
Figura 10. Gel de agarose 2% com o produto da amplificação por PCR convencional utilizando o primer Hs54CphageEndo a partir do DNA das estirpes: 1) HRC54 ; 2) HCC103; 3) Ppe8 ^T ; 4) Pal5 ^T ; 5) CbAmc e (--) controle negativo. M- marcador de peso molecular.	34
Figura 11. Gel de agarose 2% com o produto da amplificação por PCR convencional utilizando os primers Gd5C70 (A) e Gd5C4525 (B) a partir do DNA genômico das 5 estirpes de bactérias do inoculante: 1) Pal5^T 2) HCC103; 3) HRC54; 4) Ppe8 ^T ; 5) CbAmc e (--) controle negativo. M- marcador de peso molecular.	34
Figura 12. Gel de agarose 2% com o produto da amplificação por PCR convencional utilizando os primers Pt8C14 (A) e Pt8C 3641 (B) a partir do DNA genômico das 5 estirpes de bactérias do inoculante: 1) Ppe8^T 2) HCC103; 3) HRC54; 4) Pal5 ^T ; 5) CbAmc e (--) controle negativo. M- marcador de peso molecular.	34
Figura 13. Gel de agarose 2% com o produto da amplificação por PCR convencional utilizando os primers NaCbCgyrA a partir do DNA genômico das 5 estirpes de bactérias do inoculante: 1) CbAmc 2) HCC103; 3) HRC54; 4) Ppe8 ^T ; 5) Pal5 ^T e (--) controle negativo. M- marcador de peso molecular.	35
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 2% para avaliação da especificidade dos primers desenhados para estirpe HCC103 de <i>H. rubrisubalbicans</i> utilizando o DNA genômico de 6 estirpes: 1) M1; 2) M4 ^T ; 3) M5; 4) M6; 5) HRC52; (+) HCC103 e (--) controle negativo, e 4 pares de primers A) Hr103C1870; B)103C3867; C) Hr103C3868; e D) Hr103C4062.	36
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 2% para avaliação da especificidade dos primers desenhados para estirpe HRC54 de <i>H. seropedicae</i> utilizando o DNA genômico de 6 estirpes: 1) ZAE67 ^T ; 2) HRC80; 3) HCC102; 4) HS4; 5) ZAE94; (+) HRC54 e (--) controle negativo, e o primer Hs54CphageEndo.	37

- Figura 16.** Eletroforese em gel de agarose 2% para avaliação da especificidade dos primers desenhados para o gênero *Paraburkholderia* utilizando o DNA genômico de 6 estirpes: 1) Ppe5; 2) Ppe7; 3) 1172; 4) 141; 5) 139; (+) **Ppe8^T** e (-) controle negativo, e os primers A) Pt8C14 e B) C3641.37
- Figura 17.** Eletroforese em gel de agarose 2% para avaliação da especificidade dos primers desenhados para a estirpe Pal5^T *G. diazotrophicus* utilizando o DNA genômico de 6 estirpes: 1) PR-1; 2) PR34; 3) PRC1; 4) PSP19; 5) 17R⁻²; (+) **Pal5^T** e (-) controle negativo, e os primers A) Gd5C4525 e B) Gd5C70.....38
- Figura 18.** Eletroforese em gel de agarose 2% para avaliação da especificidade dos primers desenhados para estirpe CbAmc de *N. amazonense* utilizando o DNA genômico de 6 estirpes: 1) Ym6; 2) YA95; 3) YS58; 4) YA14; 5) Aam15; (+) **CbAmc** e (-) controle negativo, e os primers NaCbCgyrA.....38
- Figura 19.** Gel de agarose 2% com os produtos de PCR amplificados a partir dos primers selecionados. M- marcador molecular; 1) **Hr103C1870, 112 pb**; 2) **Hr103C3768, 197 pb**; 3) **Hr103C3868, 117 pb**; 4) **Hr103C4062, 188 pb**; 5) **Hs54CphageEndo, 186 pb**; 6) **Pt8C14, 111 pb**; 7) **Pt8C3641, 125 pb**; 8) **Gd5C70, 188 pb**; 9) **Gd5C4525, 143 pb**; e 10) **NaCbCgyrA 68 pb**.....42
- Figura 20.** Gel de agarose 2% com o produto da qPCR para as curvas com diluições seriadas do DNA genômico das bactérias do inoculante para cana-de-açúcar. Primers utilizados: A) Hr103C1870 para estirpe HCC103, B) Hs54CphageEndo para a estirpe HRC54, C) Pt8C14 para estirpe Ppe8^T, D) Gd5C4525 para estirpe Pal5^T e E) NaCbCgyrA para a estirpe CbAmc.46
- Figura 21.** Curvas padrão dos primers: A) Hr103C1870, B) Hs54phageEndo, C) Pt8C14, D) Gd5C4525 e E) NaCbCgyrA.....50
- Figura 22.** Curvas de Melting dos primers: A) Hr103C1870, B) Hs54phageEndo, C) Pt8C14, D) Gd5C4525 e E) NaCbCgyrA.....51
- Figura 23.** Produto da PCR para o gene 16S rDNA a partir do DNA total extraído de raízes de cana-de-açúcar com 90 DAP. A) Amostras de DNA sem diluir (1- 700, 2- 722, 3- 640, 4- 600) ng μL^{-1} ; B) Amostras DNA diluído 10x; C) Amostras DNA diluído 100x; D) Amostras DNA diluído 1.000x; M) Marcador molecular; (+) Amostras de DNA bacteriano; (-) controle negativo.55
- Figura 24.** Produto da PCR utilizando dois kits comerciais de DNA-polimerase diferentes e os primers 17f e Amp2 para o gene 16S, com amostras DNA extraído de colmo (C) e raízes (R) de cana-de-açúcar. A) Kit da Qiagen[®] e B) Kit da Invitrogen[®]. Concentração do DNA (ng μL^{-1}): R1- 205, R2- 231, C1- 950, e C2- 936 (RB867515) e R1- 247, R2- 246, C1- 1634, e C2- 2225 (RB92579). (+) Amostras de DNA bacteriano. (-) controle negativo.56
- Figura 25.** Média geral da população de bactérias (*H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *G. diazotrophicus*, *N. amazonense* e *P. tropica*) nas coletas realizadas aos 90, 180 e 270 DAP. Dados submetidos ao teste de média Tukey a 5% significância. Letras diferentes entre as colunas representam diferença significativa entre as médias.....57
- Figura 26.** Comportamento populacional das espécies bacterianas do inoculante ao longo das coletas feitas aos 90, 180 e 270 DAP. Dados submetidos ao teste de regressão com 5% significância. As letras diferentes entre os pontos representa a diferença significativa entre as médias nas coletas.57
- Figura 27.** Média populacional de cada espécie bacteriana que compõem o inoculante para cana-de-açúcar durante os 270 DAP (3 coletas). Letras diferentes entre as barras significa que há diferença significativa pelo teste de Tukey ($P<0,05$). *H.r.*) *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *N.a.*) *Nitrospirillum amazonense*, *H. s.*)

- Herbaspirillum seropedicae*, *G. d.*) *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *P. t.*) *Paraburkholderia tropica*.....58
- Figura 28.** Variação do número de bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar dentro das coletas. Médias submetidas ao teste de média Tukey com $p < 0,05$. As letras maiúsculas e minúsculas iguais representam a ausência de significância entre os tratamentos, respectivamente entre e dentro das coletas. *H. r.*) *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *N. a.*) *Nitrospirillum amazonense*, *H. s.*) *Herbaspirillum seropedicae*, *G. d.*) *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *P. t.*) *Paraburkholderia tropica*.59
- Figura 29.** Média geral das bactérias (*H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *G. diazotrophicus*, *N. amazonense* e *P. tropica*) quantificadas aos 25, 40 e 55 DAI. Dados submetidos ao teste de média Tukey a 5% significância. Letras diferentes entre as colunas representam diferença significativa entre as médias.60
- Figura 30.** Comportamento do número de bactérias do inoculante ao longo das coletas feitas com 25, 40 e 55 após o plantio quantificadas por qPCR. Dados submetidos ao teste de regressão com 5% significância. As letras diferentes entre os pontos representa a diferença significativa entre as médias nas coletas. 60
- Figura 31.** Média do número de células em \log_{10} referente às espécies que compõem o inoculante para cana-de-açúcar, quantificadas até os 55 DAI por qPCR. As diferenças entre as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). As letras diferentes entre as espécies representam diferença significativa. *H. r.*) *H. rubrisubalbicans*, *N. a.*) *N. amazonense*, *H. s.*) *H. seropedicae*, *G. d.*) *G. diazotrophicus* e *P. t.*) *P. tropica*.61
- Figura 32.** Comportamento do número de células das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar dentro das coletas. Médias submetidas ao teste de média Tukey com $P < 0,05$. As letras maiúsculas e minúsculas iguais representam a ausência de significância entre os tratamentos, respectivamente entre e dentro das coletas. *H. r.*) *H. rubrisubalbicans*, *N. a.*) *N. amazonense*, *H. s.*) *H. seropedicae*, *G. d.*) *G. diazotrophicus* e *P. t.*) *P. tropica*. 61
- Figura 33.** Produto de PCR em gel de agarose 2% para teste dos primers desenhados a partir do contig 1870 do genoma da estirpe HCC103, dentro e fora da espécie. M- Marcador molecular; de 1 a 5 estirpes de *H. rubrisubalbicans*; de 6 a 10 estirpes de *H. seropedicae*; de 11 a 15 estirpes de *P. tropica*; de 16 a 20 estirpes de *G. diazotrophicus*; de 21 a 25 estirpes de *N. amazonense* e (--) controle negativo.86
- Figura 34.** Produto de PCR em gel de agarose 2% para teste dos primers desenhados a partir do contig 3867 para a estirpe HCC103, entre estirpes bacterias. M- Marcador molecular; de 1 a 5 estirpes de *H. rubrisubalbicans*; de 6 a 10 estirpes de *H. seropedicae*; de 11 a 15 estirpes de *P. tropica*; de 16 a 20 estirpes de *G. diazotrophicus*; de 21 a 25 estirpes de *N. amazonense* e (--) controle negativo.86
- Figura 35.** Produto de PCR em gel de agarose 2% para teste dos primers desenhados a partir do contig do gene *phageEndo* para a estirpe HRC54, entre estirpes de bacterias. M- Marcador molecular; de 1 a 5 estirpes de *H. seropedicae*; de 6 a 10 estirpes de *H. rubrisubalbicans*; de 11 a 15 estirpes de *P. tropica*; de 16 a 20 estirpes de *G. diazotrophicus*; de 21 a 25 estirpes de *N. amazonense* e (--) controle negativo.86
- Figura 36.** Produto de PCR em gel de agarose 2% para teste dos primers desenhados a partir do contig 14/2 para a estirpe Ppe8^T, entre estirpes de bacterias. M- Marcador molecular; de 1 a 5 estirpes de *P. tropica*; de 6 a 10 estirpes de *H. rubrisubalbicans*; de 11 a 15 estirpes de *H. seropedicae*; de 16 a 20 estirpes de *G. diazotrophicus*; de 21 a 25 estirpes de *N. amazonense* e (--) controle negativo. 87
- Figura 37.** Produto de PCR em gel de agarose 2% para teste dos primers desenhados a partir do contig 3641 para a estirpe Ppe8^T, entre estirpes de bacterias. M- Marcador molecular; de 1 a 5 estirpes de *P. tropica*; de 6 a 10 estirpes de *H. rubrisubalbicans*; de 11 a 15

- estirpes de *H. seropedicae*; de 16 a 20 estirpes de *G. diazotrophicus*; de 21 a 25 estirpes de *N. amazonense* e (--) controle negativo. 87
- Figura 38.** Produto de PCR em gel de agarose 2% para teste dos primers desenhados a partir do *contig* 70 para a estirpe Pal5^T, entre estirpes de bactérias. M- Marcador molecular; de 1 a 5 estirpes de *G. diazotrophicus*; de 6 a 10 estirpes de *H. rubrisubalbicans*; de 11 a 15 estirpes de *H. seropedicae*; de 16 a 20 estirpes de *P. tropica*; de 21 a 25 de *N. amazonense* e (--) controle negativo..... 87
- Figura 39.** Produto de PCR em gel de agarose 2% para teste dos primers desenhados a partir do *contig* gene *gyrA* para a estirpe CbAmc, entre estirpes de bactérias. M- Marcador molecular; de 1 a 5 estirpes *N. amazonense*; de 6 a 10 estirpes *H. rubrisubalbicans*; de 11 a 15 estirpes de *H. seropedicae*; de 16 a 20 estirpes de *P. tropica*; de 21 a 25 estirpes de *G. diazotrophicus* e (--) controle negativo. 88
- Figura 40.** Produtos 117 pb (esquerda) e 188 pb (direita) da PCR para amostras de DNA alvo em diluição seriada (10x) utilizando os primers Hr103C3868 e Hr103C4062, respectivamente. Eletroforese em gel de agarose 2%..... 88
- Figura 41.** Produto (125 pb) da PCR para amostras de DNA alvo em diluição seriada (10x) utilizando os primers Pt8C3641. Eletroforese em gel de agarose 2%..... 88
- Figura 42.** Produto (188 pb) da PCR para amostras de DNA alvo em diluição seriada (10x) utilizando os primers Gd5C70. Eletroforese em gel de agarose 2%. 88
- Figura 43.** Placas contendo colônias de bactérias do inoculante para cana-de-açúcar utilizadas para contagem. **A)** *H. rubrisubalbicans*; **B)** *H. seropedicae*; **C)** *P. tropica*; **D)** *G. diazotrophicus* e **E)** *N. amazonense*. 89
- Figura 44.** Teste *life and death* para as estirpes do inoculante crescidas em meio líquido DYGS. Bactérias vivas (verde) e mortas (vermelha). **A)** *H. rubrisubalbicans*; **B)** *H. seropedicae*; **C)** *P. tropica*; **D)** *G. diazotrophicus* e **E)** *N. amazonense*. 90
- Figura 45.** Dendograma gerado a partir do perfil BOX-PCR de estirpes pertencentes a espécies que compõem o inoculante para cana-de-açúcar. Espécies: **A)** *H. rubrisubalbicans*; **B)** *H. seropedicae*; **C)** *P. tropica*; **D)** *G. diazotrophicus* e **E)** *N. amazonense*. *Estirpe pertencente a espécie *Paraburkholderia vietnamensis*. Parâmetros: Jaccard (Tol. 1,0 - 1,0) % (H>0,0; S>0,0) % (10,0 - 95,0) % 95
- Figura 46.** Dendograma geral a partir do perfil BOX-PCR de todas as estirpes com amostras de DNA utilizadas para selecionar primers específicos para as bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar. Parâmetros: Jaccard (Tol. 1,0 - 1,0) % (H>0,0; S>0,0) % (10,0 - 95,0) % 96
- Figura 47.** Árvore Filogenética a partir da comparação entre sequências do gene 16S rDNA de todas as estirpes com amostras de DNA utilizadas para selecionar primers específicos para as bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar nesse trabalho. Método *Neighbor-Joining* baseado na comparação de 1363 pb de cada sequência. *Bootstrap* com 1000 repetições. Distância evolucionária computada pelo método *Kimura 2-parameter*. 97
- Figura 48.** Árvore Filogenética com base na comparação das sequências do gene 16S rDNA das estirpes pertencentes a espécies que compõem o inoculante para cana-de-açúcar. Espécies: **A)** *H. rubrisubalbicans*; **B)** *H. seropedicae*; **C)** *P. tropica*; **D)** *G. diazotrophicus* e **E)** *N. amazonense*. Método *Neighbor-Joining* baseado na comparação de 1363 pb de cada sequência. *Bootstrap* com 1000 repetições. Distância evolucionária computada pelo método *Kimura 2-parameter*. 98

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Bactérias fixadoras de N ₂ que compõem o inoculante para cana-de-açúcar com os respectivos tecidos da planta de onde foram isoladas (OLIVEIRA et al., 2003).....	8
Tabela 2. Código para acessar no NCBI as sequências do gene 16S rDNA de cada bactéria que compõe o inoculante para cana-de-açúcar. Adaptação de Reis et al. (2011).....	10
Tabela 3. Tamanho dos genomas das bactérias que compõe o inoculante para cana-de-açúcar. Fonte: Baldani et al. (2011), Bertalan et al. (2009).	11
Tabela 4. Estirpes das espécies de bactérias diazotróficas utilizadas para avaliar a especificidade dos primers.	25
Tabela 5. Tratamentos utilizados no Experimento I.....	28
Tabela 6. Tratamentos utilizados no Experimento II.	29
Tabela 7. Similaridade na sequência do gene 16S rDNA das estirpes do inoculante para cana-de-açúcar com outras estirpes dentro da mesma espécie.....	39
Tabela 8. Resultados dos testes de especificidade dos primers desenhados para as estirpes de bacterias do inoculante para cana-de-açúcar.	41
Tabela 9. Primers selecionados para PCR utilizando DNA das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar.	42
Tabela 10. Condições ajustadas para a amplificação por PCR e qPCR utilizando os primers selecionados. Volume final da PCR e qPCR, respectivamente igual a, 25 e 15 µL.....	43
Tabela 11. Primers selecionados para a quantificação das bactérias do inoculante para cana-de-açúcar utilizando por meio das reações de qPCR.....	44
Tabela 12. Número de cópias do fragmento alvo detectado por qPCR usando primers espécie-específicos e o DNA genômico das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar.....	45
Tabela 13. Eficiência de amplificação dos primers para qPCR avaliada por meio de dois kits comerciais de SYBR [®] Green.....	48
Tabela 14. ANOVA para os dados das quantificações pelo método da qPCR e Câmara de Neubauer.....	52
Tabela 15. Comparação entre as quantificações (log ₁₀ do número células mL ⁻¹) realizadas por meio da Câmara de Neubauer e PCR em Tempo Real.....	52
Tabela 16. ANOVA para os dados das quantificações realizadas pelas técnicas de qPCR e contagem por Microgota em placa.	53
Tabela 17. Quantificações (log ₁₀ do número células mL ⁻¹) realizadas pelas técnicas contagem por Microgota em placa e qPCR	54
Tabela 18. Médias gerais para o fator variedade, dose e condição, fornecidas em log ₁₀ do número de células g ⁻¹ de tecido fresco.	58
Tabela 19. Log ₁₀ da média do número de células g ⁻¹ de tecido fresco das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar.....	58
Tabela 20. Média populacional em log ₁₀ do número de células g ⁻¹ de tecido fresco, para os fatores variedade e condições dentro das subparcelas.....	60
Tabela 21. Comportamento populacional em log ₁₀ n ^o células g ⁻¹ de tecido de bactérias do inoculante nas subparcelas (tecidos) para cada coleta.....	62
Tabela 22. Número de células g ⁻¹ de tecido resultante da interação nas subparcelas e cada espécie de bacteria do inoculante com as variedades e condições	62
Tabela 23. Primers desenhados para as estirpes bacterianas que compõem o inoculante para cana-de-açúcar.....	84
Tabela 24. Resultados médios em número de células mL ⁻¹ das contagens de bactérias do inoculante para cana-de-açúcar realizadas por meio da Câmara de Neubauer e qPCR. ..	91

Tabela 25. Resultados médios em número células mL ⁻¹ de meio de cultivadas contagens de bactérias do inoculante para cana-de-açúcar realizadas por meio da contagem por Microgota em placa e qPCR.....	91
Tabela 26. Componentes da solução de Hoaglands.	92
Tabela 27. ANOVA com $P < 0,05$ para os resultados do experimento I.	93
Tabela 28. ANOVA com $P < 0,05$ dos resultados do experimento II.	94

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	A Cultura da Cana-de-açúcar	3
2.2	Cana-de-açúcar e Adubação Nitrogenada	4
2.3	Fixação Biológica de Nitrogênio	5
2.4	Bactérias Diazotróficas.....	6
2.5	Fixação Biológica de Nitrogênio em Cana-de-açúcar.....	6
2.5.1	O inoculante para cana-de-açúcar.....	7
2.5.2	As espécies de bactérias do inoculante para cana-de-açúcar.....	8
2.6	Ferramentas Moleculares no Estudo das Bactérias que Compõem o Inoculante para Cana-de-açúcar	9
2.7	Reação na Cadeia da Polimerase (PCR).....	11
2.7.1	Vantagens e desvantagens da PCR.....	13
2.8	Desenho de Primers	13
2.9	PCR em Tempo Real (qPCR).....	15
2.10	Extração do DNA de Tecido Vegetal	18
3	OBJETIVOS	20
3.1	Objetivo Geral	20
3.2	Objetivos específicos	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Desenho dos Primers	21
4.2	Cultivo das Bactérias	21
4.3	Contagem em Câmara de Neubauer	21
4.4	Contagem por Microgota.....	22
4.5	Extração do DNA Genômico de Bactéria.....	23
4.6	PCR Convencional	24
4.7	Teste Estirpe-Específico dos Primers Seleccionados.....	24
4.8	BOX-PCR.....	25
4.9	Análise de Similaridade e Filogenia.....	26
4.10	Testes por PCR em Tempo Real (qPCR)	26
4.11	Cálculo do Número de Cópias do Fragmento de DNA.....	26
4.11.1	Sensibilidade da qPCR usando primers específico.....	27
4.11.2	Eficiência de amplificação dos primers selecionados para qPCR.....	27
4.12	Experimentos com Plantas de Cana-de-açúcar.....	27
4.12.1	Experimento I: plantas cultivadas em solo.....	27
4.12.2	Experimento II: plantas cultivadas em areia mais vermiculita (2:1).....	28
4.13	Extração de DNA de Tecidos de Cana-de-açúcar	29
4.13.1	Colmos.....	29
4.13.2	Raízes	30
4.14	Quantidade e Qualidade do DNA Total Extraído.....	30
4.15	PCR Utilizando primers para o 16S rDNA	30
4.16	Uso da PCR em Tempo Real (qPCR).....	30
4.16.1	Quantificação das bactérias crescidas em meio DYGS.....	31
4.16.2	Determinação do número de células por grama de tecido vegetal	31
4.17	Estatística.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	Seleção dos Primers em Nível de Espécie.....	32
5.2	Avaliação dos Primers em Nível de Estirpe	35

5.3	Primers Seleccionados.....	39
5.4	Primers selecionados para qPCR.....	44
5.4.1	Sensibilidade.....	44
5.4.2	Eficiência de amplificação e coeficiente de determinação.....	46
5.4.3	Curvas Melting.....	47
5.5	Contagem em Câmara de Neubauer Versus PCR em Tempo Real.....	52
5.6	Contagem por Microgota em Placa Versus PCR em Tempo Real.....	53
5.7	Quantificação das Bactérias do Inoculante a partir de Plantas Crescidas em Solo ao Ar Livre Utilizando qPCR (Experimento I).....	54
5.8	Quantificação das Bactérias do Inoculante em Planta Crescidas em Areia e Vermiculita em Casa de Vegetação (Experimento II).....	59
6	CONCLUSÕES.....	65
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
	ANEXOS.....	84
A.	Primers Desenhados.....	84
B.	Produtos de PCR dos Testes de Primers para as Bactérias do Inoculante.....	86
C.	Contagem por Microgota em Placa das Bactérias do Inoculante.....	89
D.	Teste de Life and Death.....	90
E.	Resultados das Contagens em Câmara de Neubauer e Microgota Versus qPCR.....	91
F.	Solução de Hoaglands.....	92
G.	Protocolo para a Extração de DNA Total de Raízes de Cana-de-açúcar.....	92
H.	Análise de Variância dos Experimentos I e II.....	93
I.	Dendogramas Gerados a partir de Perfil BOX-PCR.....	95
J.	Árvores Filogenéticas com Base no Gene 16S.....	97

1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) destaca-se desde a colonização do país, sendo explorada principalmente para produção de açúcar e etanol. Esse é um biocombustível renovável que tem como vantagem a sustentabilidade, uma vez que, o CO₂ liberado na atmosfera pelo processo de combustão do etanol pode ser novamente fixado nas plantas de cana por meio processo de fotossíntese. O setor sucroalcooleiro nacional tem diversas limitações, como por exemplo, o custo de produção, que tem aumentado em função da aquisição de insumos químicos com destaque para os adubos nitrogenados. No entanto, além de onerar a produção da cultura, a maior parte dos adubos nitrogenados aplicados pode ser perdida por volatilização e/ou lixiviação, podendo ocasionar impactos ambientais. Outra forma de fornecer o nitrogênio para cultura da cana-de-açúcar pode ser a fixação biológica de nitrogênio (FBN) realizada por bactérias diazotróficas. Essas bactérias realizam o processo da FBN no interior da planta, por ação da enzima nitrogenase, capaz de romper a tripla ligação do nitrogênio atmosférico (N₂), disponibilizando o N reduzido na forma de NH⁺³ para a planta. Além da FBN, outros efeitos benéficos por parte dessas bactérias já foram observados, como por exemplo, a produção de fitormônio que podem promover o crescimento vegetal. A Embrapa Agrobiologia no ano de 2008 lançou um inoculante para cana-de-açúcar composto pelas espécies bacterianas: *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (HCC103), *H. seropedicae* (HRC54), *Paraburkholderia tropica* (Ppe8^T), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal5^T) e *Nitrospirillum amazonense* (CbAmc), que são capazes de fixar o N₂ e promover crescimento e desenvolvimento vegetal. Essa mistura de bactérias passou a ser recomendado para a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) com base em diversos estudos, principalmente os de Oliveira et al. (2002) e Oliveira et al. (2006). No entanto, para que os efeitos da inoculação possam ser confirmados há necessidade de verificar o estabelecimento das bactérias do inoculante no interior dos tecidos da cana-de-açúcar. Para isso, podem ser empregadas as técnicas de biologia molecular como a PCR e sua variante qPCR. O uso dessas ferramentas só é possível, graças à definição da estrutura da molécula de DNA proposta por Watson e Crick (1953). Tal descoberta impulsionou diversas áreas da pesquisa e estabeleceu que os ácidos nucléicos são fundamentais para o entendimento das peculiaridades dos seres vivos (PINHO, 2006). Na década de 80, Kery Mullis desenvolveu a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) o que foi fundamental para complementar os estudos envolvendo a molécula de DNA porque permite a sintetize dessa molécula, *in vitro*, simulando o processo de replicação celular. Um dos reagentes fundamentais para que ocorra a reação de PCR são os iniciadores (do inglês, primers) que determinam qual a região da molécula de DNA será utilizada como molde para a amplificação. Na PCR em Tempo Real (qPCR), os primers são utilizados em conjunto com reagentes auxiliares tais como os corantes fluorescentes, e. g., SYBR[®] Green, ou sondas, como por exemplo, TaqMan[®], que permitem acompanhar a amplificação da molécula alvo DNA em tempo real (NORLAN et al., 2014). Para cada uma das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar, já foram desenhados primers específicos para amplificar regiões do gene 16S rDNA (BOA SORTE, 2013). No entanto, até então, o genoma da maioria dessas bactérias não havia sido completamente sequenciado, o que impossibilitou o desenho de iniciadores estirpe-específicos. Dessa forma, houve a necessidade de desenhar primers estirpe-específicos para quantificar por qPCR somente as bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar. Para a quantificação de organismos por qPCR é necessário a utilização de primers, que devem ser desenhados a partir de trechos exclusivos no genoma do organismo de interesse. Diversas abordagens poder ser utilizadas para a identificação dessas regiões no genoma de bactérias, como por exemplo, a análise de similaridade entre outras bactérias, realizada a partir da

comparação com banco de dados de sequências genômicas. Os trechos específicos por sua vez, são utilizados para o desenho dos primers (ARRUDA JÚNIOR, 2010; NORLAN et al., 2014; OSEI et al., 2017). Os primers desenhados, mesmo sendo de trechos específicos no genoma de cada bactéria, pode amplificar o DNA para estirpes muito similares ou cujo genoma ainda não foi sequenciado. Dessa forma, há necessidade de avaliar a especificidade e estabelecer condições de reação que aumentem a especificidade dos primers. A adição de algumas substâncias como, formaldeído e formamida, podem melhorar a especificidade, assim como a modificação da concentração de magnésio (Mg^{+2}), um cofator essencial para a reação de amplificação. Essas modificações associadas a alterações no tempo e temperatura de anelamento podem auxiliar a amplificação do fragmento desejado na PCR convencional e qPCR. Após esses ajustes os primers selecionados são avaliados na PCR e qPCR, respectivamente, quanto a sensibilidade e eficiência de amplificação. Existem diversas ferramentas na área de biologia molecular capazes de monitorar e quantificar os microrganismos a partir de amostras do tecido vegetal, porém, são poucos os métodos eficientes e rápidos para fazer essa avaliação (COUILLEROT et al., 2010; MONTEIRO et al., 2009). A qPCR é um metodologia que vem sendo usada para quantificação de microrganismos presentes em diversas espécies de interesse econômico tais como o milho (FALEIRO et al., 2013; PEREIRA et al., 2014), trigo (STETS et al., 2015), arroz (BONILLA, 2011) cana-de-açúcar (BOA SORTE et al., 2014) etc. e tem se mostrado uma ferramenta eficaz na estimativa de populações microbianas colonizadoras do interior de diversas plantas (LUCHI et al., 2016). Para o sucesso da PCR e qPCR é imprescindível à obtenção de amostras de DNA com alto rendimento e qualidade. Um dos métodos mais utilizado para a extração de DNA com essas características utiliza o tampão CTAB (DOYLE & DOYLE, 1987). No entanto, a metodologia CTAB pode necessitar de ajustes, como por exemplo, o uso de substâncias para melhorar a eficiência de isolamento do DNA. Dessa forma, são muitos os protocolos disponíveis na literatura que têm como base o tampão CTAB, como os desenvolvidos por Honeycutt et al., (1992), Aljanabi et al. (1999), Hossain et al. (2006), Vaze et al. (2010) e Bermúdez-Guzmán et al. (2016) para o isolamento de DNA das plantas de cana-de-açúcar. Este trabalho trata do desenvolvimento de primers estirpe-específicos para a identificação e quantificação das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar em tecidos da própria planta. No total foram desenhados 39 pares de primers para as diferentes bactérias do inoculante, eles foram avaliados previamente quando a especificidade por PCR convencional e posteriormente testados em nível de estirpe. Os melhores primers foram utilizados nas reações de qPCR para quantificação das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar. A quantificação das bactérias utilizando as técnicas de Câmara de Neubauer e Microgota foram comparadas com os resultados obtidos por qPCR. As bactérias do inoculante foram quantificadas em plantas provenientes de dois experimentos com as variedades de cana-de-açúcar RB867515 e RB92579. As bactérias foram monitoradas em diversos períodos do desenvolvimento das plantas. Para tal, foi necessário um ajuste na metodologia de extração de DNA para cana-de-açúcar e qPCR para quantificação dessas bactérias nos colmos e raízes de cana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cultura da Cana-de-açúcar

A espécie *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) é uma Angiosperma, da classe das monocotiledôneas e família Poaceae, que tem como centro de origem o continente asiático (ROACH & DANIELS, 1987). As espécies *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. robustum* e *S. edule* contribuíram em proporções genéticas diferentes para formação das atuais cultivares comerciais (GUPTA et al., 2010).

A parte aérea é formada por colmos, folhas inflorescências e frutos, já na parte subterrânea há rizomas e raízes que se distribuem de forma fasciculada. As raízes podem atingir uma profundidade de até 4 metros, sendo que 85 % dessas ficam localizadas nos primeiros 50 cm do solo e 60 % nos primeiros 20-30 cm conforme a variedade (SILVA & SILVA, 2012). A touceira da *Saccharum* ssp. é formada por perfilhos que atuam como planta independente e autônoma, porém, pode haver a troca de nutrientes e água entre perfilhos (DINARDO-MIRANDA et al., 2010).

A cana-de-açúcar é uma planta típica de clima tropical e semitropical, com ampla escala de adaptação, desde a latitude 35 °N a 35 °S. De acordo com Tauconnier & Bassereau (1975) temperaturas entre 30 e 34 °C são ideais para que a cultura apresente seu máximo potencial produtivo. A planta é considerada semi-perene podendo ser realizados sucessivos cortes sem replantio (cana-soca) realizados após o período de cana-planta (12 a 18 meses), apesar disso, para que a cana-soca tenha uma produtividade aceitável, há necessidade de adição de novas doses de adubo, sendo a resposta à adubação, decrescente quanto maior for o número de cortes (CONAB, 2015). A planta de cana tem metabolismo fotossintético do tipo C₄ tornando-a eficiente no uso da água em ambiente com restrição hídrica, e na conversão da energia luminosa em química, podendo acumular até 100 mg de CO₂ fixado por dm² de área foliar por hora, o que é o dobro, da taxa fotossintética das plantas com sistema fotossintético C₃ (ALENCAR, 2012). Nos trópicos úmidos o rendimento da cana-de-açúcar varia de 70 a 100 t ha⁻¹ em sistema de sequeiro, porém em regiões dos trópicos e sub-trópicos secos implementando sistema de irrigação a produtividade pode chegar até 150 t ha⁻¹ (DOORENBOS & KASSAN, 1994).

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil poucos anos depois do descobrimento, e teve como finalidade a diversificação dos produtos para favorecer o comércio da coroa portuguesa, sendo por muito tempo o açúcar a principal mercadoria das receitas lusitanas (DINARDO-MIRANDA et al., 2010). Em 1580 a coroa portuguesa tinha o monopólio mundial da comercialização do açúcar, em sua maioria produzido em terras brasileiras, responsáveis por gerar excelentes lucros para a corte (DINARDO-MIRANDA et al., 2010). Desde então a cultura vem contribuindo para geração de emprego e renda em todo o território nacional, não só pela produção de açúcar mais também a de álcool (DINARDO-MIRANDA, et al., 2010).

A partir da década de 70 o álcool, até então tratado como produto secundário na cadeia produtiva da cana, torna-se estratégico para “driblar” a crise do petróleo de 1973. Para isso, o governo federal criou em 1975 o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) que tinha como objetivo reduzir a alta dependência energética do petróleo importado, que devido á guerra entre os países Egito, Síria e Israel, próximos a regiões produtoras, teve seu preço quadruplicado, passando de U\$ 2,95 para U\$ 12,45 o barril (BARROS, 2007). Houve investimento do governo em pesquisas e subsídios de US\$ 7 bilhões até 1989, isso contribuiu para a geração de emprego, arrecadação fiscal, diminuição da poluição ambiental e no desenvolvimento tecnológico do setor agrícola (CRESTANA, 2006). O Proálcool é dividido

em quatro fases, sendo na primeira (1975-1979) e na segunda (1979-986) o período de ascensão e o auge do programa respectivamente, porém, no início da terceira fase (1986-2003) houve declínio em função da instabilidade econômica que passava o país, estendendo até o fim desta. A quarta fase é a que estamos passando desde o ano de 2003 quando o setor sucroalcooleiro voltou a crescer em função da introdução de carros *flex fuel* no Brasil (MICHELLON et al., 2008).

Em termos de área plantada, a cana-de-açúcar é a terceira cultura a ocupar grandes domínios no Brasil, atrás apenas da soja e do milho. O setor sucroalcooleiro é responsável pela geração de trabalho no campo em muitos países, desses o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar seguido por Índia e China (NOVACANA.COM, 2016). No início de sua exploração econômica a cana-de-açúcar começou a ser plantado na região Nordeste do país, porém, migrou para outras regiões do território nacional. Atualmente os estados com maior produção de cana-de-açúcar se encontram na região Centro-Sul do país liderados por São Paulo, Goiás e Minas Gerais. A produtividade média estimada para safra 2017 foi em torno de 75,778 Mg ha⁻¹, em área total de 9.281.517 mil hectares com produção esperada de 703,33928 milhões de toneladas (SIDRA, 2017).

O uso da cana-de-açúcar como fonte energética justifica-se pela compensação de 370% a mais de energia do que a utilizada na transformação da planta de cana em álcool (BARROS, 2007). A biomassa resultante da produção canavieira é quase que 100% aproveitada para geração de energia, os processos industriais já dominados e conhecidos aproveitam de forma eficiente os subprodutos da cana (caldo, bagaço e palha) isso implica num menor impacto ambiental por parte do setor (SOARES & ROSSELL, 2007). Segundo esses autores uma tonelada de cana-de-açúcar (1.718.000 kcal) equivale energeticamente a 1,24 barril de petróleo bruto (1 barril = 1.386.000 kcal), ou seja, a produção estimada para safra 2017 será proporcional a 872,1407 milhões de barris de petróleo bruto, isto é, 1,2087.10¹⁵ kcal.

2.2 Cana-de-açúcar e Adubação Nitrogenada

O uso de adubos convencionais é muito baixo por parte da agroindústria canavieira, isso se deve a ciclagem de nutrientes por parte da cultura (deposição de palhada) e a utilização de subprodutos como vinhaça e torta de filtro. Esses insumos podem suprir a carência de fosforo (P₂O₅) e potássio (K₂O) mantendo níveis satisfatórios de produtividade, porém, a oferta de nitrogênio por parte da vinhaça e torta de filtro é insignificante (CGEE, 2005). Mesmo assim, dentre as culturas com área plantada superiores a um milhão de hectares, a cana-de-açúcar está em quarto lugar entre as dez listadas que consomem 460 kg (formulação média de N-P₂O₅-K₂O) por hectare (NONACANA.COM, 2016).

Dada a importância do nitrogênio para o desenvolvimento vegetal, ao longo das últimas três décadas diversos experimentos têm sido realizados em diferentes tipos de solo e resultados desses experimentos têm mostrado que o N aplicado no plantio pode não contribuir significativamente com a produtividade da cana. Dessa forma, a adição desse macro nutriente no plantio e/ou na adubação de cobertura deve levar em conta a relação custo/benefício (DEMATTÊ, 2016). No entanto, a quantidade de nitrogênio extraída pela cana é alta, em torno de 100 a 130 kg ha⁻¹ de N, sendo as doses de nitrogênio aplicadas como fertilizante apenas de 30 a 60 kg ha⁻¹. Além disso, a eficiência de utilização do N aplicado por parte das plantas é baixa (ROSSETTO & DIAS, 2005). Apesar da grande quantidade de N extraído pela cultura da cana-de-açúcar, das baixas doses de fertilizantes nitrogenados aplicadas e da baixa eficiência de uso do N aplicado, as áreas cultivadas por mais de uma década não apresentaram desgaste nutricional. Essa observação sugere que a planta pode se beneficiar da FBN realizada por bactérias diazotróficas (URQUIAGA et al., 2012).

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio (N) constitui vários compostos na planta, principalmente os aminoácidos, ácidos nucleicos e a clorofila. Além disso, o N é indispensável para um grande número de reações bioquímicas nas plantas e nos microrganismos, sendo um dos elementos mais absorvidos pelas plantas. Segundo Epstein & Bloom (2005) 25% do gasto energético dos vegetais é decorrente de inúmeras reações relacionadas com a assimilação de compostos nitrogenados e sua incorporação na forma orgânica. O ciclo do N no solo é bastante complexo, e a maior quantidade desse elemento se encontra na forma orgânica presente na matéria orgânica ou incorporado a organismos vivos. Adubação química ou orgânica, deposições atmosféricas e FBN simbiótica ou não, são as formas com que esse elemento pode ser disponibilizado para o sistema solo-planta.

De acordo estimativas feitas por Stevenson (1982) a maior parte do N se encontra na litosfera ($1,6 \cdot 10^{11}$ Tg) seguido pela atmosfera ($3,9 \cdot 10^9$ Tg) onde o N molecular se encontra na forma (N_2) que compõe 78% dos gases. O N_2 é um gás pouco reativo em função da tripla ligação entre as duas moléculas de N ($N \equiv N$). Na hidrosfera principalmente nos oceanos o N é da ordem de $2,3 \cdot 10^7$ Tg, 95% na forma de N_2 e os outros 5% na forma NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- e matéria orgânica, no solo as porções de N são menores se comparado as outras localidades do globo, em torno de $2,4 \cdot 10^5$ Tg, em sua maioria na forma de matéria orgânica ou NH_4^+ fixado em argila, na biosfera estima-se cerca de $2,8 \cdot 10^5$ Tg (STEVENSON, 1982. Apud, NOVAIS et al., 2007).

O processo de FBN é realizado por microrganismos capazes de quebra a tripla ligação da molécula de N_2 , reduzida a NH_3 por meio do complexo enzimático da nitrogenase. A FBN é realizada por organismos como as bactérias ou cianobactérias em vida livre, associadas ou em simbiose com diatomáceas, fungos ou plantas. O benefício da FBN pode ser observado em diferentes espécies florestais, como por exemplo, os gêneros *Casuariana* e *Alnus* apresentam ganhos de N pela FBN na ordem de 40 a 300 kg ha⁻¹ ano⁻¹, espécies aquáticas como a *Azolla* pode ultrapassar mais de 120 kg ha⁻¹ de N em 50 dias e ser usada como adubo verde ou até mesmo na alimentação de aves, peixes e suíno (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002) além de espécies agrícolas utilizados para alimentação humana e animal.

As bactérias que realizam o processo de FBN são chamadas de fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas, esses microrganismos tem um importante papel na contribuição de sistemas agrícolas. Calcula-se que em todo o mundo 32 Tg ano⁻¹ de N são adicionados ao campo via FBN, esse valor corresponde a 30% do N fertilizante industrial. O Brasil é o país onde a FBN tem contribuição positiva significativa, 7,3 Tg ano⁻¹ de N, destaque para cultura da soja que contribui com 3,2 Tg ano⁻¹ de N desse total (FILOSO et al., 2006).

A interação entre bactérias do gênero rizóbio e a família de plantas *leguminosae* é uma das interações simbióticas mais eficiente no que se refere a FBN. A fixação de N_2 em algumas das quase 20 mil espécies de leguminosas, difere conforme as espécies de bactérias, fertilidade do solo, variedades de plantas, ano agrícola, etc. Algumas estimativas apontam que a interação rizóbio-planta pode promover por meio da FBN ganhos de até 300 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N em espécies de leguminosas forrageiras, mais de 200 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N em soja e também em outras leguminosas (GRAHAM, 2000). No Brasil é notório o sucesso da interação de *Bradyrhizobium* com soja, sendo desnecessária a adubação nitrogenada para essa leguminosa em condição adequadas de cultivo, uma vez que, bactérias daquele gênero podem suprir a necessidade de N da cultura (HUNGRIA et al., 2006).

Além das dicotiledôneas, são muitas as evidências de que ha o processo de fixação de N_2 em monocotiledôneas como a cana-de-açúcar, os cereais e as forrageiras (BODDEY & DOBEREINER, 1988; URQUIAGA et al., 1992; BODDEY et al., 2003; YEOH et al., 2015; SOUZA et al., 2016). As bactérias fixadoras de N_2 atuam em associação com as gramíneas,

colonizando os tecidos internos do vegetal, como por exemplo, o sistema radicular, sem formar nódulos, sendo os gêneros: *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Paenibacillus* os mais comumente citados (MOREIRA et al., 2010).

2.4 Bactérias Diazotróficas

De acordo Paul & Clark (1996) o termo diazotrofos (diazó = nitrogênio, trofos = nutrição) é conferido aos microrganismos que possuem o complexo enzimático nitrogenase e são capazes de reduzir N_2 atmosférico à amônia (NH_3^+). A NH_3^+ pode ser incorporada ao seu metabolismo para produção de aminoácidos e síntese de proteínas. Dessa forma, as bactérias diazotróficas são responsáveis por incorporarem anualmente mais de 60% do nitrogênio no solo e na água (BELLONE & BELLONE, 2006). Depois do processo de fotossíntese, a FBN é considerada o segundo processo biológico mais importante para vida na terra (FALEIRO et al., 2011). Diversos microrganismos têm a capacidade de realizarem a FBN. Bases de dados filogenéticos mostram diferentes grupos de procarióticos diazotróficos relacionados entre si, sugerindo que a capacidade de fixar N_2 atmosférico tenha como pioneiro os primeiros seres vivos (KENNEDY & ISLAM, 2001).

Entre os diazotróficos de vida livre há uma diversidade de nichos ecológicos, podendo destacar os anaeróbicos obrigatórios; anaeróbicos facultativos, fixando nitrogênio também em condições aeróbicas; microaeróbios e aeróbios obrigatórios. Esses microrganismos carecem de condições ideais, temperatura ambiente e pressão normal, para operação do complexo nitrogenase, uma vez que, esse é sensível a alta concentração de O_2 . No entanto, diversos mecanismos fisiológicos e bioquímicos são usados para evitar a inativação da enzima nitrogenase. Para que a FBN ocorra há necessidade de energia proveniente de processos fotoquímicos ou a partir de carboidratos via fermentação ou respiração, gerando ATP (BELLONE & BELLONE, 2006). Quimicamente a reação para reduzir 1 mol de N_2 demanda no mínimo 16 mols de ATP mais 4 pares de elétrons para gerar 1 mol de NH_4^+ . Para diazotróficas aeróbicas o gasto energético é de 28 ATP por mol de amônia produzido. Dessa forma, a fixação aeróbica de nitrogênio requer o equivalente a 750 kg de açúcar para fixar 100 kg de amônia (CASSÁN & SALAMONE, 2008).

2.5 Fixação Biológica de Nitrogênio em Cana-de-açúcar

Devido à importância econômica da cana-de-açúcar, existe enorme interesse na interação associativa da cultura com as bactérias diazotróficas endofíticas. Alguns resultados mostram que a mineralização da matéria orgânica possa suprir em parte a alta demanda de nitrogenado exigido pela planta de cana. Diversos autores mostraram, utilizando metodologias diretas e indiretas, que ocorre o processo de FBN em cana-de-açúcar (SAMPAIO et al., 1988; URQUIAGA et al., 1992; BODDEY et al., 2001; POLIDORO et al., 2001; OLIVEIRA, et al., 2006; SCHULTZ et al., 2012; LIMA, 2016). Estudos feitos por Urquiaga et al. (1992) mostraram uma contribuição de até $210 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de N por meio da FBN em cana. Dependendo do genótipo da planta, do conjunto de estirpes fixadoras de nitrogênio e das condições edafoclimáticas 60% do N requerido pela cultura pode ser derivado da FBN (BODDEY et al., 2001; POLIDORO et al., 2001). Oliveira et al. (2006) e Schultz (2012) mostram que quase 50% do N acumulado na cultura de cana-de-açúcar foi proveniente da FBN. É importante ressaltar também que a quantidade de N na forma orgânica exportado pelos colmos é maior ou igual à quantidade de N-fertilizante aplicado durante o ciclo, sem considerar as perdas de N no sistema. Dessa forma, de acordo com Boddey et al. (2003) o fato da cana-de-açúcar no Brasil produzir grande quantidade de colmos, em cultivos contínuos,

com baixa aplicação de N fertilizante, é um indicativo indireto de que há atuação do processo de FBN no sistema. No entanto, resultados de experimentos realizados na África do Sul e Austrália mostram que, mesmo com evidências da promoção de crescimento vegetal por parte da associação com bactérias diazotróficas, não houve contribuição significativa do processo de FBN para o acúmulo de N no campo (BIGGS et al., 2002; HOEFSLOOT et al., 2005).

O processo de melhoramento é fundamental para obtenção de genótipos mais responsivos à inoculação, no caso do Brasil a maioria dos genótipos foram melhorados para o cultivo em solos com deficiência de N (BODDEY, 1995), o que pode ter contribuído para seleção de cultivares com maior resposta à inoculação. No entanto, nem todas as variedades de cana-de-açúcar são favorecidas com aporte de N pelo processo de FBN (COELHO et al., 2003). De acordo com Schutz et al. (2012) a variedade RB867515 apresentou ganhos significativos de produção, quando inoculadas com bactérias diazotróficas endofíticas, sendo equivalente a aplicação de 120 kg ha⁻¹ de N, enquanto a variedade RB72454, sob as mesmas condições, não apresentou respostas. Pereira et al. (2013) observaram que dentre os genótipos comerciais de cana: RB72454, RB867515, RB92579, RB918639, RB92606 e RB855536 inoculados com bactérias fixadoras de nitrogênio, a variedade RB867515 foi a mais responsiva. A inoculação, em conjunto ou isoladamente, dos gêneros bacterianos *Burkholdeira* sp., *Pantoea* sp. e *Stenotrophomonas* sp. promove o crescimento vegetal de forma similar para as variedades RB867515 e RB92579 (LIMA, 2016). Além do efeito do genótipo de cana-de-açúcar, a adubação da cultura com o micronutriente molibdênio e o emprego da irrigação pode melhorar o desempenho do processo de FBN possibilitando a obtenção de produtividade próxima ao dobro da média nacional (URQUIAGA et al., 1998; BODDEY et al., 2003).

Os benefícios das bactérias diazotróficas endofíticas se estendem além do processo de FBN, como a produção de hormônios de crescimento vegetal, tais como giberelina, auxina e citoquininas (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; HARTMANN & ZIMMER, 1994; BASHAN; HOLGUIN, 1997; BASTIÁN et al., 1998; RADWAN et al., 2002; REIS JUNIOR et al., 2004a), além de promover a solubilização de fósforo inorgânico e orgânico, o sequestro de ferro por meio de sideróforos e a redução dos níveis do etileno (LUCY et al., 2004).

2.5.1 O inoculante para cana-de-açúcar

Os estudos com bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a planta de cana-de-açúcar são realizados desde a década de 50, a primeira bactéria diazotrófica a ser isolada da cultura foi a *Beijerinckia fluminensis* (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958 Apud: RIBEIRO et al., 2009). Desde então, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos com bactérias endofíticas diazotróficas isoladas das espécies de *Saccharum* spp. para o seu uso como inoculante a fim de avaliar sua capacidade para a FBN e promoção do crescimento vegetal (URQUIAGA et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006). No ano de 2008 a Embrapa Agrobiologia recomendou um mix de cinco espécies bacterianas isoladas da planta de cana-de-açúcar (Tabela 1), sendo todas fixadoras de nitrogênio. Esse inoculante proporcionou ganhos de produtividade de até 24,7%, aumento de 31,4% na produção de matéria seca e 42,7% de N fixado via o processo de FBN, dependendo do genótipo de cana-de-açúcar e da fertilidade do solo avaliados (OLIVEIRA et al., 2006).

Tabela 1. Bactérias fixadoras de N₂ que compõem o inoculante para cana-de-açúcar com os respectivos tecidos da planta de onde foram isoladas (OLIVEIRA et al., 2003).

Espécie	Estirpe	Cana-de-açúcar	Tecido
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	BR11281 ^T (PAL5 ^T)	<i>Saccharum</i> spp.	Raízes
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	BR11504(HCC103)	SP701284	Colmos
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	BR11335 (HRC54)	SP701143	Raízes
<i>Azospirillum amazonense</i>	BR11145 (CbAmc)	CB453	Colmos
<i>Burkholderia tropica</i>	BR11366 ^T (Ppe8 ^T)	SP711406	Perfilhos

Para o preparo do inoculante as bactérias são crescidas individualmente em meio de cultivo específico, em seguida a suspensão bacteriana de cada espécie é colocada em 250 g de turfa estéreo, o produto final (1.250 g) é composto por cinco pacotes de turfa, cada um contendo uma das 5 estirpes, que deve ser misturados com 200 L de água para inoculação da cana-de-açúcar, minutos antes do plantio (REIS, et al., 2009). O inoculante ainda permanece em fases de testes em diversas instituições, incluindo várias universidades distribuídas pelo país (REIS et al., 2009; BOA SORTE, 2009, 2013; JÚNIOR, 2010; FIGUEIREDO, 2012; OLIVEIRA, 2012; SCHULTZ, 2012). O principal atributo visado com essa tecnologia para a planta de cana-de-açúcar é a FBN, visto que, todas as bactérias utilizadas são fixadoras de nitrogênio atmosférico (REIS et al., 2009). Os resultados desses experimentos têm mostrado que o uso do inoculante pode complementar a aplicação de insumos nitrogenados e fornecer até 30 kg ha⁻¹ano⁻¹ no primeiro ano de plantio da cana-de-açúcar (REIS, et al., 2009). Outros trabalhos mostram que o inoculante para cana-de-açúcar também pode ser usado para melhorar a formação de mudas de cana, contribuindo na germinação de sementes, maior velocidade de brotação e acúmulo de matéria seca na parte aérea e raiz (FIGUEIREDO, 2012; GÍRIO et al., 2015).

2.5.2 As espécies de bactérias do inoculante para cana-de-açúcar

A espécie *Saccharobacter nitrocaptans* (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988) ou *Acetobacter diazotrophicus* (GILLIS, 1989) atual *Gluconacetobacter diazotrophicus* (YAMADA et al., 1997) foi inicialmente isolada da parte aérea e raízes de cana em 1988 por Cavalcante & Döbereiner. A *G. diazotrophicus* é espécie com maior número de estudos em associação com a cana-de-açúcar, muitos trabalhos mostram essa bactéria presente em grande número em plantas de cana-de-açúcar cultivada em diversas regiões do país (PERIN, 2003). Além do processo de FNB, a *G. diazotrophicus* também pode produzir hormônios vegetais como AIA e giberelina (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; BASTIÁN et al., 1998), bem como, atuar no controle biológico, como por exemplo, com ação antagônica a *Xantomonas albilinea*, bactéria patogênica em plantas de cana-de-açúcar (PIÑON et al., 2001). Apesar da *G. diazotrophicus* possui um baixo potencial de sobrevivência no solo (BALDANI et al., 1997), foi possível sua detecção em amostras de DNA extraídas de solos coletados em canaviais por meio da técnica de PCR. No entanto, nesse mesmo solo, plantas “iscas” de cana-de-açúcar micro propagadas não foram colonizadas pela bactéria (ARCANJO et al., 2000).

As espécies de bactérias *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* foram as primeiras do gênero *Herbaspirillum* fixadoras de nitrogênio atmosférico a serem isoladas, além destas, há também a *H. frisingense*, outra diazotrófica endofítica associada a forrageiras (RIBEIRO et al., 2009). Bactérias do gênero *Herbaspirillum* possuem baixa sobrevivência no solo, isso, reforça a hipótese de que essas bactérias possam ser estritamente endofíticas (OLIVARES et al., 1996; ARCANJO et al., 2000).

Inicialmente, após o isolamento a *H. seropedicae* foi denominada *Azospirillum seropedicae* por ter características morfofisiológicas parecidas com as do gênero *Azospirillum*, porém, análises de hibridação DNA:DNA mostraram que se tratava de outro grupo de bactérias, sendo então, denominado *Herbaspirillum* (BELLONE & BELLONE, 2006). A espécie *H. seropedicae* foi a primeira do gênero a ser isolada da rizosfera e das raízes esterilizadas de arroz, sorgo, milho, forrageira e cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1986; BALDANI et al., 1997; BODDEY et al., 1998). A espécie *H. rubrisubalbicans* foi isolada da cana-de-açúcar e raízes de *Digitaria insularis*, planta espontânea em canaviais (OLIVARES et al., 1996), também foi encontrada em associação com capim elefante (REIS et al., 2000), abacaxi e banana (CRUZ et al., 2001). No entanto, essa bactéria associa-se a um menor número de plantas se comparada a *H. seropedicae*. Além disso, a *H. rubrisubalbicans* pode causar a doença conhecida como “estria mosqueada”, na variedade B3462 de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1993).

O gênero *Paraburkholderia* foi recentemente criado para acomodar as bactérias, anteriormente pertencentes ao gênero *Burkholderia*, que não causam patogenicidade em humanos ou vegetais (DOBRITSA & SAMADPOUR, 2016). O gênero *Burkholderia* era bem amplo, sendo compostas por bactérias com diversas características incluindo espécies potencialmente patogênicas em humanos e vegetais, biorremediadoras, fixadoras de nitrogênio, solubilizadoras de fosfato ou agentes de biocontrole (BELLONE & BELLONE; ARTUSSON et al., 2006). No gênero *Burkholderia* há uma ampla distribuição ecológica e de metabolismo variado, com suas espécies podendo ser encontradas em ambientes aquáticos e terrestres (PARKE & GURIAN-SHERMAN, 2001), em associação com plantas de milho, sorgo e arroz (BALDANI et al., 1999), banana e abacaxi (CRUZ et al., 2001) e em solos de canaviais e plantas de cana-de-açúcar da Austrália (REIS et al., 2004). Das 58 espécies listadas por Dobritsa & Samadpour (2016), 20 foram reclassificadas como sendo *Paraburkholderia* spp., inclusive a *Burkholderia tropica*. A espécie *P. tropica* é uma das 8 bactérias desse gênero fixadoras de N₂, e foi isolada de plantas de cana-de-açúcar por Reis et al., (2004).

Dentre as bactérias diazotróficas endofíticas que compõem o inoculante para cana-de-açúcar a da espécie *Nitrospirillum amazonense* (LIN et al., 2014), antiga *Azospirillum amazonense*, é a mais promiscua (MOREIRA et al., 2010). Essa bactéria está associada, principalmente, as espécies de plantas monocotiledôneas, tais como, arroz, milho, forrageiras, sorgo, cana-de-açúcar, como também, as eudicotiledôneas palmeiras e frutíferas (BALDANI et al., 2002; REIS JUNIOR et al., 2004; BRASIL et al., 2005; RODRIGUES et al. 2006). De acordo com Patriquin et al. (1983) espécies do gênero *Nitrospirillum* fornecem quantidades significativas de N via FBN, além da produção de hormônio de crescimento vegetal (HASSAN et al., 1996). A espécie *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983) está entre as sete diazotróficas, das quatorze que compõem esse gênero (MOREIRA et al., 2010). As bactérias da espécie *A. amazonense* são detectadas em elevado número nas plantas de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1999).

2.6 Ferramentas Moleculares no Estudo das Bactérias que Compõem o Inoculante para Cana-de-açúcar

Diversos autores têm utilizado ferramentas de biologia molecular para o estudo das espécies bacterianas que compõem o inoculante para cana-de-açúcar (FRANKE-WHITTLE et al., 2005; ROUWS et al., 2006). Esses trabalhos possibilitam a obtenção de informações moleculares dessas bactérias a partir da utilização de proteínas e DNA para distinguir as estirpes do inoculante (BERTALAN et al., 2009; BOA SORTE, 2009; BALDANI et al., 2011; REIS et al., 2011; BOA SORTE, 2013). Um dos métodos utilizados e a técnica de

BOX-PCR que tem como alvo uma sequência repetitiva chamada BOX (154 pb) naturalmente recorrente no genoma da maioria das bactérias. Os primers desenhados para a região BOX amplificam um padrão de fragmentos múltiplos, a quantidade e as posições das bandas variam entre as linhagens de uma espécie, que se distinguiram na sequência genômica (MADIGAN et al., 2016), o que permitiu gerar perfis de bandas com identidade característica de cada bactéria (RADEMAKER & DE BRUIJIN, apud REIS JUNIOR et al., 2002). Portanto, perfis de banda das regiões repetitivas amplificadas são originais para cada espécie, ou mesmo entre espécies. A técnica de BOX-PCR foi usada para as cinco espécies bacterianas do biofertilizante para cana-de-açúcar, e gerou um perfil único de fragmentos de DNA para cada uma das cinco estirpes do inoculante (Figura 1). Possibilitando, dessa forma, distinguir as diferentes espécies (REIS et al., 2011).

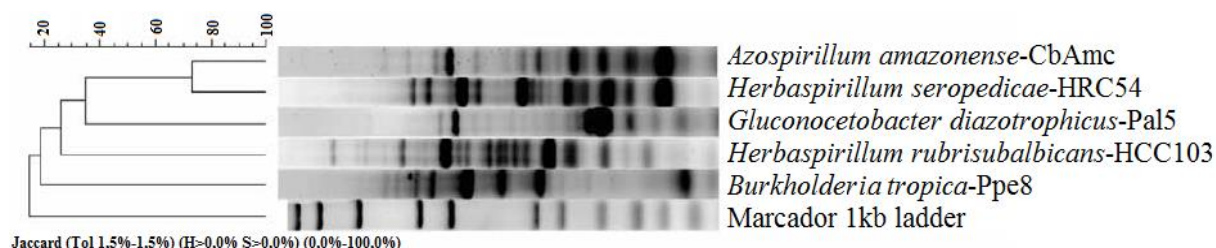


Figura 1. Uso de BOX-PCR para caracterização molecular das bactérias do inoculante para cana-de-açúcar. Adaptado de Reis et al. (2011).

Uma alternativa ao BOX-PCR tem sido a região do DNA que codifica o gene 16S rDNA, por possuir regiões bastante conservadas é possível separar os grupos taxonômicos de maneira rápida e prática a partir do sequenciamento dessa região (STIEGLER et al., 1981). Baseado no 16S rDNA, Carl Woese propôs o sistema de classificação dos três domínios (*Archaea*, *Bacteria* e *Eucarya*) (MADIGAN et al., 2016; TORTORA et al., 2017). Segundo esse autor, o gene 16S rDNA possui inúmeras vantagens para o estudo filogenético uma vez que, i) são distribuídos universalmente (estão presentes em todas as células); ii) possuem funcionamento contínuo; iii) bastante preservado (modifica-se lentamente); e iv) têm tamanho que permite uma boa robustez estatística nas análises (MADIGAN et al., 2016). O gene 16S rDNA das estirpes bacterianas do inoculante para cana-de-açúcar foi sequenciado parcialmente na Embrapa Agrobiologia. As sequências com aproximadamente 1.400 pares de bases foram depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e podem ser acessadas conforme os números de acesso da Tabela 2 (REIS et al., 2011).

Tabela 2. Código para acessar no NCBI as sequências do gene 16S rDNA de cada bactéria que compõe o inoculante para cana-de-açúcar. Adaptação de Reis et al. (2011).

Espécie	Estirpe	Número de acesso NCBI
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Pal5 ^T	NR_027591
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	HCC103	HM485594
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	HRC54	HM485593
<i>Azospirillum amazonense</i>	CbAmc	HM485596
<i>Burkholderia tropica</i>	Ppe8 ^T	NR_028965

Apesar da sequência do gene 16S rDNA fornecer informações relevantes, muitas das vezes não é possível separar as bactérias em nível de estirpe, sendo necessárias informações adicionais do genoma. O sequenciamento do genoma de qualquer organismo requer um trabalho cuidadoso na montagem e na anotação dos genes para determinar suas funções. Uma melhor anotação facilita o trabalho de pesquisa evitando frustrações e perda de tempo na

utilização dos dados (FORMIGHIERI, 2017). Dentre as bactérias que fazem parte do inoculante para cana-de-açúcar a primeira a ter o seu genoma sequenciado foi a *G. diazotrophicus* estirpe Pal5^T utilizando o sequenciamento do tipo Sanger (BERTALAN et al. 2009). As outras quatro estirpes tiveram seus genomas sequenciados por Baldani et al. (2011), Tabela 3. Há uma grande diferença no tamanho do genoma das bactérias que compõem o inoculante, variando de aproximadamente 4 milhões de bases para a *G. diazotrophicus* (Pal5^T) até 8,7 milhões de bases no caso de *P. tropica* (Ppe8^T). Essas discrepâncias podem ser consequências das diferentes estratégias utilizadas por cada bactéria para seu crescimento e interação com a planta hospedeira. Os dados genômicos das bactérias *G. diazotrophicus* estirpe Pal5^T e *P. tropica* estirpe Ppe8^T podem ser acessados no banco de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_011365.1) (BERTALAN et al., 2009) e (DDBJ/ENA/GenBank_MSDZ00000000.1) (DA SILVA et al., 2018), respectivamente. Enquanto para as estirpes das espécies *H. rubrisubalbicans* (HCC103), *H. seropedicae* (HRC54) e *N. amazonense* (CbAmc) sequenciados por Baldani et al. (2011) estão disponíveis no banco de dados GAAT (*Genome Assembly and Annotation Tool*).

Tabela 3. Tamanho dos genomas das bactérias que compõe o inoculante para cana-de-açúcar. Fonte: Baldani et al. (2011), Bertalan et al. (2009).

Espécie Estirpe	Tamanho do Genoma	Referência
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> HCC103	5.628.704 pb	Baldani et al. (2011)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54	5.530.106 pb	Baldani et al. (2011)
<i>Paraburkholderia tropica</i> Ppe8 ^T	8.720.735 pb	Da Silva et al. (2018)
<i>Nitrospirillum amazonense</i> CbAmc	7.256.180 pb	Baldani et al. (2011)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 ^T	3.999.591 pb	Bertalan et al. (2009)

O desenho de primers para amplificar parte do 16S rDNA das bactérias do inoculante para cana-de-açúcar foi anteriormente realizado (BOA SORTE, 2013). No entanto, esse gene pode ser bem similar entre as diferentes estirpes não permitindo a identificação de regiões específicas para cada estirpe. Dessa forma, na grande maioria das vezes, esses iniciadores não permitem a separação entre as diferentes estirpes. A disponibilização dos dados genômicos para as bactérias do inoculante possibilita fazer uma comparação entre os diferentes genomas para selecionar regiões específicas para cada bactéria. Essas regiões podem ser então utilizadas para desenhar primers específicos para cada estirpe.

2.7 Reação na Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi desenvolvida por Kery Banks Mullis em meados da década 1980 e o primeiro trabalho usando a técnica foi publicado na revista *Methods in Enzymology* em 1985 (MULLIS, 1990). A partir de sua invenção a PCR foi bastante difundida, levando Mullis a ganhar o Nobel de Química em 1993. A técnica de PCR se tornou uma metodologia primordial, sendo empregada, em diversas áreas do conhecimento contemporâneos, o que possibilitou que a biologia molecular fosse utilizada em áreas como a agropecuária, a biotecnologia, a medicina, a arqueologia biomolecular, a ecologia molecular, a ciência forense etc. (CAVALCANTI et al., 2008).

A técnica de PCR tem por finalidade a amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA ou gene alvos, a partir de primers (iniciadores) que se anexam ao DNA e determinam que região será utilizada como molde para amplificação (HILL & STWART, 1992). Na reação da PCR o DNA alvo é amplificado exponencialmente e dessa forma, partindo-se de apenas uma cópia de DNA alvo, após 20 ciclos são produzidas $\sim 2^{20}$ cópias do fragmento de DNA alvo inicial na amostra (VOET et al., 2000). Depois de 20 ciclos o número de moléculas do fragmento de

DNA inicial é transformado em 10 milhões de cópias, saindo da massa de picogramas para microgramas (CALLADINE et al., 2004).

Para a reação de PCR possa ocorrer são necessários os reagentes: solução tamponante pH 8,0, a enzima Taq polimerase ou DNA polimerase, o cofator para essa enzima (Mg^{+2}), os nucleosídeos-trifosfatados (dCTP, dGTP, dTTP e dATP) ou dNTPs, água deionizada, oligonucleotídeos iniciadores (primers) e amostra do DNA molde (SPEROTTO, 2014). Além disso, são necessários ciclos de aquecimento e resfriamento, que são repetidos de 30 a 40 vezes (SPEROTTO, 2014). As etapas da PCR descritas por Kill & Stewart (1992) são mostradas na Figura 2 e poder ser resumidas da seguinte maneira, i) Desnaturação – essa é a etapa inicial onde ocorre a elevação da temperatura de 90 a 98°C, nessa temperatura as pontes de hidrogênio que mantem unida a dupla fita de DNA são rompidas e, dessa forma, a molécula de cada fita do DNA é separada; ii) Anelamento – Nessa fase há redução imediata da temperatura, normalmente na faixa de (37-65)°C, isso possibilita o anelamento dos primers na região da extremidade do DNA alvo a ser amplificado. Os primers se anelam em cada fita de DNA com as suas extremidades 3'-OH e iii) Extensão – Essa é a última fase, onde ocorre novamente o aumento da temperatura para 72° C, condição ótima para atividade da enzima Taq polimerase. Essa enzima liga as bases nitrogenadas (dNTPs) no sentido 5'-3' na nova fita que está sendo formada. Todas as etapas de aquecimento e resfriamento são automatizadas por um equipamento chamado termociclador, que permite a programação de temperatura e do tempo necessários para cada etapa da reação.

A Taq polimerase é uma DNA polimerase termoestável, resistente as altas temperaturas que a PCR pode atingir. Essa enzima foi isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus* encontrada em fontes termais (MADIGAN et al., 2016). A extensão dos primers é mais eficiente a 72°C, porque esta é a temperatura ideal para processividade da maioria das Taq polimerases podendo estar polimerizar até ~100 bases por segundo (NORLAN et al., 2014).

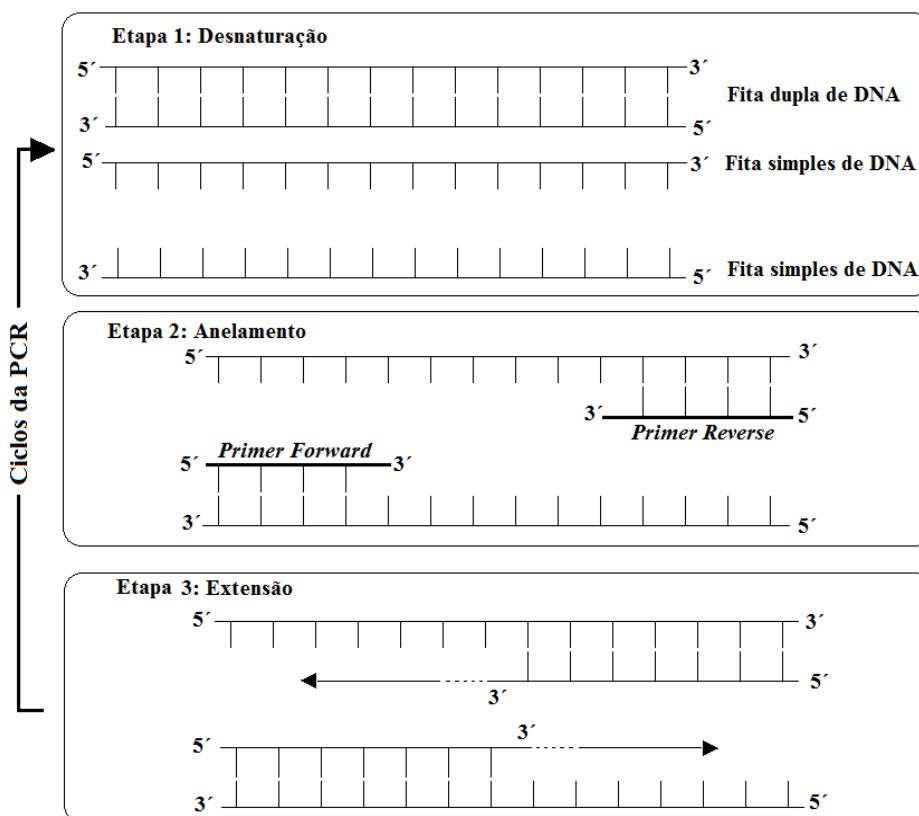


Figura 2. Representação do ciclo da PCR com suas etapas de amplificação (NEVES & LORENA, 2009).

2.7.1 Vantagens e desvantagens da PCR

A PCR tem a sensibilidade e pode amplificar um único fragmento de DNA alvo em uma amostra contendo 10^5 células, sem necessidade de purificação prévia do DNA (VOET et al., 2000). Esse alto poder de detecção permite o uso da PCR na obtenção, prática e rápida, de diagnósticos resultantes da amplificação *in vitro* de DNA (CAVALCANTI et al., 2008). No entanto, pode ser uma técnica mais onerosa do que os tradicionais ensaios laboratoriais. Além disso, necessita de procedimentos pós-reação para averiguação do diagnóstico, tais como, eletroforese em gel de agarose do produto amplificado, coloração com Brometo de Etídeo e uso transluminador para fotodocumentação (Applied Biosystems, 2017). Outras questões que devem ser levadas em conta no uso da PCR referem-se as contaminações e presença de inibidores da enzima DNA-polimerase (RABELLO et al., 2008). As contaminações podem ser prevenidas evitando ambientes cruzados no preparo da solução para a reação da PCR. Quanto aos inibidores, eles podem ser menos comprometedores com a diluição das amostras de DNA, uma vez que, eles também são diluídos. Para a segurança dos resultados oriundos da PCR é necessário que se tenham amostras controle, ou seja, sequências que devem ser obrigatoriamente amplificadas, e pelo menos duas amostras negativas (sem DNA extraído) (RABELLO et al., 2008).

2.8 Desenho de Primers

Primer ou iniciador refere-se a uma sequência de oligonucleótidos que determina a região do DNA alvo que será sintetizado pela DNA polimerase. Para que ocorra amplificação exponencial do DNA alvo há necessidade de dois primers, um complementar à sequência de DNA *sense* (primer direto, *forward* no inglês) e outro complementar à sequência de DNA *anti-sense* (primer reverso, *reverse* no inglês). A região do DNA flanqueada pelos iniciadores é o trecho do DNA que será amplificado. Os primers são desenhados geralmente com 20 nucleotídeos, e com alta temperatura de anelamento para evitar o anelamento inespecífico, uma vez que, qualquer interação dos primers com o DNA da amostra pode originar a extensão de um produto (HILL & STEWART, 1992). Sommer & Tautz (1989) descreveram que iniciadores com homologia em apenas dois pares de bases podem direcionar a síntese de um gene alvo com temperatura de anelamento de 37°C. O alto grau de especificidade na PCR só é requerido durante os ciclos iniciais, tendo em vista que, nos ciclos posteriores a maioria dos modelos são alvos perfeitos, amplificados anteriormente (RUANO et al., 1991).

O produto gerado na PCR pode sofrer influência de diversos fatores, como por exemplo, o preparo e as condições de reação. No entanto, o desenvolvimento de um bom par de primer é um fator crítico. É pré-requisito comum que os primers tenham temperaturas de fusão semelhantes (*T_m*, sigla no inglês para melting temperature) e um conteúdo bases Citosina (C) e Guanina (G) proporcional, evitando-se a auto complementação e formação de grampos “*hairpins*” (YE et al., 2012). A especificidade da região na molécula de DNA por parte do par de primer é o mais importante, devendo se anelar e amplificar o alvo pretendido e nunca quaisquer outras regiões do DNA (YE et al., 2012). Essa questão é muito relevante para as análises da qPCR, tendo em vista que, os resultados gerados nessa técnica são fundamentados para determinar a massa de DNA amplificada (VANGUILDER, et al., 2008).

Para aumentar a eficiência de amplificação alguns arranjos da sequência de bases devem ser evitados no desenvolvimento dos primers. Uma subsequência de nucleotídeos 5'...CGC CGC CGC...3' ou 5'...ATC ATC ATC... 3', e repetições consecutivas de uma única base 5'...TTT TAT TTT...3' ou 5'... GGG GCC CCC 3' podem contribuir para o pareamento entre primers e o DNA molde em posições não desejadas, ocasionando o chamado *misprimer*

(NEVES & LORENA, 2009). Griffiths-Jones et al. (2005) descrevem outros cuidados que devem ser tomados no desenho dos primers, são eles, i) complementaridade entre primers *forward* (F) e *reverse* (R), o que pode levar a um pareamento e a formação de heterodímeros; ii) complementaridade entre o mesmo primer (*self-dimer*); e iii) evitar os primers muito extensos para não haver a formação de regiões de auto anelamento ou grampos (*hairpins*).

A percentagem de bases C e G no primer F ou R podem influenciar na temperatura de anelamento, uma vez que, o pareamento dessas bases forma três ligações químicas do tipo ponte de hidrogênio. No pareamento entre as bases Adenina (A) e Timina (T) ocorre a formação de apenas duas ligações. Portanto, quanto maior o conteúdo CG em um primer, mais estável será a sua ligação com a fita de DNA molde devido o maior o número de pontes de hidrogênio. Um bom primer deve ter entre 40 a 60 % de bases C e G e recomenda-se que os primers sejam desenhados priorizando bases CG na extremidade 3'-OH. Essa região terminal é onde a DNA polimerase inicia a síntese da nova fita, como o pareamento "C ≡ G" é mais forte, em tese, isso contribuirá para o melhor anelamento da extremidade 3' e maior eficiência da enzima (ARRUDA JÚNIOR, 2010).

As fases da PCR ocorrem em temperaturas ideais. A temperatura de pareamento ou anelamento (T_a) é dependente dos primers, como o próprio nome diz, ela facilita o pareamento do primers com a região do DNA alvo. A T_a é determinada a partir da T_m , essa pode ser definida como a temperatura necessária para que metade de um fragmento de DNA esteja desnaturado, 50% dos pares de base não pareados e 50% pareado. As temperaturas T_a e T_m geralmente diferem entre-se de 3 a 5 °C sendo a T_a normalmente menor que a T_m (ARRUDA JÚNIOR, 2010).

Segundo Arruda Júnior (2010), são muitas as fórmulas para o cálculo da T_m , de maneira geral elas pode ser calculada considerando os seguintes requisitos, i) básicas (considera-se apenas a composição nucleotídica); ii) Dependentes de Sais (leva em conta a concentração de sais no meio) e iii) Termodinâmicas, baseia-se na contribuição da entalpia e entropia (BRESLAUER et al. 1986). Para primers com percentagem GC variando de 40 a 60% considerando o número bases ou *oligos* menor que 25, a T_m pode ser calculada usando a Equação 1.

Equação 1.

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$$

Onde, T_m é a temperatura de *Melting* em °C; e A, C, G e T representam a quantidade, das bases Adenina, Citosina, Guanina e Timina nos primers (WALLACE et al., 1979; apud NORLAN et al., 2014).

De acordo com Norlan et al. (2014) o desenho dos primers deve seguir aos seguintes critérios:

- I. Devem ter entre 20-24 nucleotídeos de comprimento T_m com ~ 60 °C (59 ± 2 °C) para qPCR, mas pode variar (55 ± 5 °C) PCR convencional*.
- II. O par de primer deve possuir cerca de 40-60% do conteúdo de GC.
- III. Os primers não devem ser complementares entre si, principalmente na extremidade 3'-OH.
- IV. Evite o travamento da região terminal 3'-OH, de modo a permitir pelo menos duas bases C e/ou G acompanhadas de no máximo três bases A e/ou T nas cinco últimas posições na extremidade 3'-OH.
- V. Evite sequências do mesmo nucleotídeo, maiores do que quatro repetições ou regiões palindrômicas, e.g. ATATA//ATATA.

*Aplicações de gene ou alguma região de interesse no genoma podem exigir modificações no comprimento dos primers e da *T_m*.

2.9 PCR em Tempo Real (qPCR)

A PCR em Tempo Real ou PCR quantitativa (qPCR) é uma técnica de quantificação derivada da PCR convencional e obedece aos mesmos princípios de amplificação, porém, com algumas vantagens. Na PCR convencional após o término da reação há necessidade de outro método para avaliar a amplificação, na qPCR pode haver o acompanhamento em tempo real da quantidade de DNA amplificado. As principais vantagens da qPCR incluem: rapidez e simplicidade para realizar análises, menor risco de contaminações por transferência, e elevado poder de amplificação dinâmica, podendo ter ordem de grandeza superior a 10^8 (HEID et al., 1996). Além de maior confiabilidade dos resultados se comparado aos métodos convencionais de quantificação (RODRÍGUEZ-LÁZARO, et al, 2013).

A estratégia utilizada na qPCR para quantificação do DNA amplificado envolve a utilização de moléculas repórteres fluorescentes que se ligam ao DNA dupla fita recém-sintetizado. Dessa forma, quanto mais DNA é produzido maior será a quantidade de fluorescência observada. Há diversas maneiras de produzir essa fluorescência e as moléculas repórter podem ser classificadas em intercalantes de DNA dupla fita, como o SYBR[®] Green, ou sondas de hidrólise marcadas com fluorescência. As sondas combinam outros níveis de especificidade para detecção do DNA alvo. A mais conhecida é a TaqMan[®] Probe que é desenhada para se anelar com o DNA molde entre os dois primers usados para a amplificação, e necessita da atividade exonuclease nas extremidade 5' e 3' da DNA polimerase (NORLAN et al., 2014). O SYBR[®] Green é o corante intercalante na molécula dupla fita de DNA mais utilizado para a qPCR. Livre na solução e/ou ligado ao DNA de cadeia simples, a quantidade de fluorescência emitida é muito baixa. No decorrer da qPCR a massa de DNA dupla fita aumenta e mais corante se liga a esse DNA aumentando a intensidade da fluorescência (NORLAN et al., 2014).

As características espectrais desse corante são: i) excitação máxima de 497 nm quando intercalado a molécula DNA e ii) fluorescência máxima de 520 nm (SIGMA[®], 2008; NORLAN et al., 2014). Apesar do seu baixo custo e facilidade de aplicação, o SYBR[®] Green é um sistema não específico, não ideal para reações multiplex com também para qPCR qualitativo (EUROGENTEC[®], 2017).

Um parâmetro fundamental na qPCR é o valor de Ct ou ciclo limiar, ou seja, o ponto em que a fluorescência é detectada pela primeira vez, como sendo estatisticamente significativa, acima da linha de base (SIGMA[®], 2008). O valor de Ct tem relação inversamente proporcional ao número inicial de cópias do DNA alvo. (Figura 3). Quanto maior a concentração inicial do DNA molde na amostra, mais cedo uma curva de amplificação é gerada, sendo correspondente a um menor valor de Ct (SIGMA[®], 2008). Após a amplificação atingir o limiar de detecção (linha horizontal tracejada na Figura 3) o curso da qPCR pode ser seguido de forma confiável por meio de uma curva em fase exponencial. Nas etapas finais da reação de qPCR, com a utilização dos reagentes, a reação atinge um estado linear (*plateau*) estando dessa forma, com rendimento máximo (Figura 3).

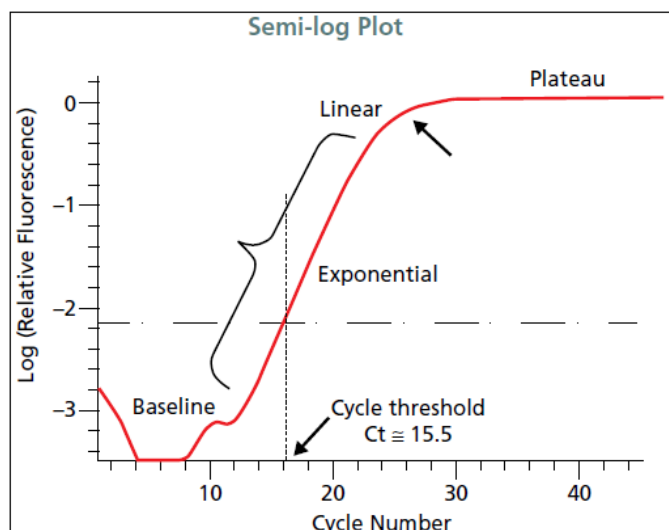


Figura 3. Principais etapas da curva gerada durante os ciclos da PCR em tempo real. Adaptado de SIGMA® (2008).

Para a utilização da qPCR para quantificação do DNA alvo nas amostras de interesse de maneira absoluta, há necessidade definir uma curva padrão, com concentrações de DNA conhecida. Essa curva também pode auxiliar no estabelecimento da especificidade e a eficiência de amplificação dos primers (E) (Figura 4) (KRALIK & RICCHI, 2017). O valor E pode ser obtido conforme a Equação 2.

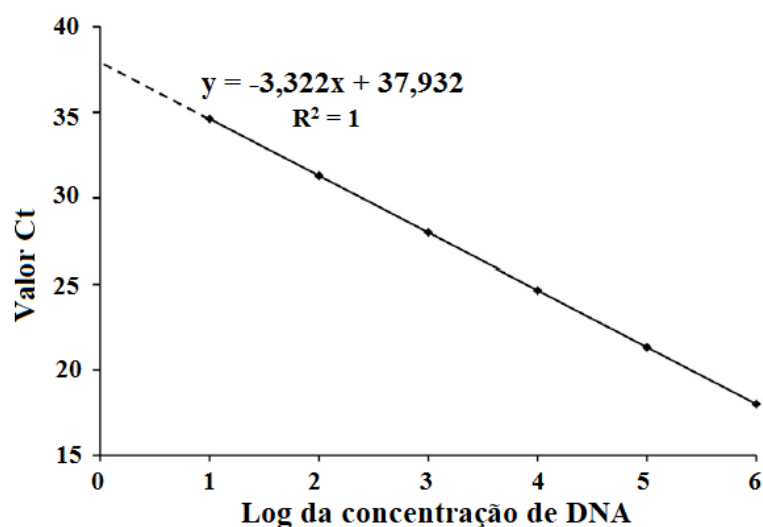


Figura 4. Modelo da curva de calibração com equação linear, formada pelos valores: *Slope* (-3,322) e interceptação da reta (37,932) com o coeficiente de regressão igual a 1. Fonte: Kralik & Ricchi (2017).

Equação 2.

$$E = 10^{-(1/Slope)} - 1$$

Nessa equação, a variável “*Slope*” é o valor da inclinação da reta, formada em um plano cartesiano onde: o eixo y (ordenadas) é representado por valores médios do Ct correlacionados com a diluição do DNA alvo, eixo x (abscissas) Figura 4. Portanto, a E de um

determinado par de iniciadores é obtida em função da equação da reta a seguir (KRALIK & RICCHI, 2017). Essa mesma equação é utilizada para a quantificação do DNA nas amostras de interesse.

Equação 3.

$$y = ax+b$$

Logo, **a** é o valor do *Slope* e **b** (intercepção da curva com o eixo *y*) representa em teoria, o momento que uma cópia do DNA alvo é detectada (JOHNSON et al., 2013). Portanto, a concentração ou quantidade de cópias do DNA alvo inicial em amostras desconhecidas, é calculada com base no valor *Ct* por meio da Equação 4 (KRALIK & RICCHI, 2017). Essa equação pode ser utilizada para a obtenção do valor R^2 , coeficiente de determinação, que pode variar de 0 a 1 (KRALIK & RICCHI, 2017). Se o R^2 for menor que 0,95 há possibilidades das amostras não terem sido pipetadas com exatidão ou não existe relação linear entre o *Ct* e o \log_{10} da concentração de DNA molde diluído em série (EUROGENTEC[®], 2017).

Tomando como exemplo a Figura 4, em qPCR, as concentrações são dadas em logaritmo (\log), e as diferenças *Ct* entre as diluições seriadas (10^{n-1}) são em tese sempre 3,322 (valor do *Slope*) ciclos. Dessa forma, embora a diferença numérica entre duas médias de *Ct* sejam significante, em números reais (cópias ou concentração de dado fragmento de DNA) a discrepância pode ocorrer em ordens de grandeza (10x). Portanto, deve-se ter atenção para evitar erros nas operações subsequentes como análise de variância, testes de médias, etc. (KRALIK & RICCHI, 2017).

A especificidade do ensaio da qPCR é determinada pelos primers e as condições estabelecidas para a reação. No entanto, existe sempre a possibilidade de que iniciadores bem concebidos amplifiquem estruturas secundárias inespecíficas ou os chamados dímeros de primers (LIFE[®], 2012). Ensaios de qPCR utilizando corantes como SYBR[®] Green são menos específicos que os da PCR convencional, que usa gel de detecção, onde a especificidade da reação é determinada inteiramente pelos primers. A especificidade dos primers na qPCR pode ser avaliada por meio de uma análise das curvas de fusão ou dissociação, também conhecidas como curva de Melting (Figura 5) (SIGMA[®], 2008; LIFE[®], 2012). Caso haja mais de um pico na curva de Melting é um indicativo de que pode ter havido amplificação de mais de um fragmento, sendo importante fazer uma análise em gel de agarose corado com brometo etídeo para verificar se houve amplificações inespecíficas (SIGMA[®], 2008).

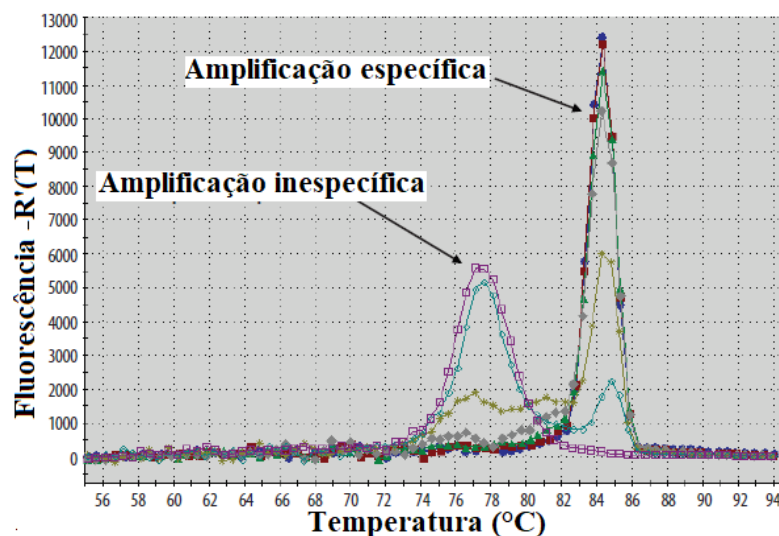


Figura 5. Curva de Melting de uma qPCR mostrando amplificações específicas e inespecíficas. Fonte: Norlan et al. (2014).

Assim como a técnica de PCR, a de qPCR ganhou espaço em diversas áreas do conhecimento tais como: medicina veterinária (RODENBUSCH, 2006) medicina (ERALI et al., 2008) controle de qualidade de biofertilizantes (STROPA, 2009) segurança alimentar (ARAÚJO, 2010; RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2013) saneamento básico (MONLLOR, 2013) laticínios (ILHA et al., 2016) fitopatologia (LUCHI et al. 2016) dentre outras. As aplicações mais comuns da qPCR são para as análises de expressão de genes, a detecção e quantificação de agentes patogênicos e, a quantificação de DNA e microRNA (SCHMITTGEN TD et al., 2008; DINON et al., 2011; LUCHI et al., 2016; PESSOA et al., 2016). Adicionalmente, há um grande número de trabalhos mostrando a utilização da qPCR para quantificar organismos que atuam em associação patogênicas ou benéfica com as plantas. Couillerot et al. (2010) utilizou a qPCR para quantificar a bactéria *Azospirillum lipoferum* (estirpe CRT1) na rizosfera de plantas jovens de milho. A espécie bacteriana *G. diazotrophicus* Pal5^T foi quantificada por qPCR a partir de amostras de DNA extraídas de tecidos de cana-de-açúcar (BOA SORTE, 2013; BOA SORTE et al., 2014). A população da bactéria *Azospirillum brasilense* (estirpe FP2) em tecidos de trigo foi quantificada por qPCR e mostrou-se mais sensível do que a técnica de contagem em placa para tal propósito. (STETS et al., 2015). De acordo com Faleiro et al. (2013), a qPCR mostrou ser sensível para quantificação da bactéria *Azospirillum brasilense* estirpe FP2 inoculada em plântulas de milho, a partir de primers desenhados da região do gene *nifA*. O par de iniciadores HERBAS1 foi utilizado para amplificar um fragmento de DNA de 76 pb para a quantificação na qPCR da bactéria *Herbapirillum seropedicae* estirpe SmR1 em raízes de milho (PEREIRA et al., 2014). Esses trabalhos mostram que a PCR em Tempo Real é uma ferramenta precisa e sensível para quantificação de microrganismos no interior de tecidos vegetais e na rizosfera de plantas a partir de amostras de DNA isoladas desses materiais.

2.10 Extração do DNA de Tecido Vegetal

Encontrar metodologias eficientes para extração de DNA com boa qualidade e rendimento pode ser um fator limitante para realização da PCR (DEMEKE & JENKINS, 2010). Uma boa extração deve assegurar: i) a lise de todas as células; ii) o fornecimento de material genômico suficiente; e iii) a remoção das substâncias químicas (inibidoras ou não da PCR) produzidas pela planta, e.g., polissacarídeos, compostos polifenólicos e metabólitos secundários, além de enzimas como as RNases e Proteinases (DEMEKE & JENKINS, 2010).

Durante a extração de DNA, os polifenóis são prontamente oxidados formando quinonas que se ligam covalentemente de forma irreversível com as moléculas de ácidos nucleicos (LOOMIS, 1974). Quanto aos polissacarídeos, esses tendem a co-precipitar juntamente aos ácidos nucleicos com baixa força iônica no tampão (CHANG et al., 1993; MOSER et al., 2004). As substâncias húmicas também são frequentemente citadas como contaminantes nas amostras de DNA vegetal. Segundo Torvik (1995) elas também possuem caráter ácido podendo precipitar na mesma faixa de pH que os ácidos nucleicos. De acordo Tsay & Olson (1991) as substâncias húmicas podem interferir na PCR impedindo a ação da DNA polimerase o que provoca redução na eficiência da técnica. Muitos protocolos de rápida extração de DNA estão disponíveis (KOTCHONI & GACHOMO, 2009; WANG et al., 2011; AZMAT et al., 2012) no entanto, eles não são eficientes para o isolamento de DNA, em quantidade e com qualidade suficientes para a PCR para todos os tipos de amostras (SIKA et al., 2015). A quantidade de metabólitos secundários (quinonas, flavonoides, terpenos, polifenóis e alcaloides) produzidos por diversas plantas, impossibilita o desenvolvimento de um protocolo de extração universal (KHANUJA et al., 1999). Há também os kits comerciais para extração de DNA, que geralmente propicia o isolamento de DNA com boa qualidade em curto período, mas, com baixo rendimento e elevado custo (HUAQIANG et al., 2013; HEALEY et al., 2014). Os protocolos para isolamento de DNA vegetal têm como objetivo fornecer material genético para o uso em diversas técnicas, incluindo a PCR. Segundo Kralik & Ricchi (2017) de acordo com o tipo de amostras utilizadas para extração, como por exemplo, leite e fezes, apenas 30% ou menos do DNA total pode ser recuperado. Uma boa extração de DNA a partir do tecido vegetal depende da forma de coleta, condições de armazenamento e de características fisiológicas da espécie estudada (SIKA et al., 2015). São muitos os protocolos descritos na literatura para extração de DNA a partir de diferentes tecidos vegetais como: raízes, folhas, caule, sementes, endosperma e cultura de células em suspensão (HUAQIANG et al., 2013; RAMOS et al., 2014; SIKA et al., 2015; BERMÚDEZ-GUZMÁN et al., 2016; BORGES, 2016). A maioria dos protocolos utilizados tem como base o método CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) descrita por Doyle e Doyle (1987). Os tampões CTAB geralmente são complementados com substâncias que podem proporcionar uma extração de melhor qualidade, os mais utilizados para tal finalidade são: o 2-β-mercaptoethanol e a Polivinilpirrolidona (PVP), que auxiliam na remoção de polifenóis, o Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) responsável pela precipitação de proteínas, a Proteinase K, que tem a função de digerir proteínas; o Polietilenoglicol (PEG), que promove a remoção de polissacarídeos e compostos fenólicos juntamente com moléculas de RNA (GEHRIG et al., 2000) e a RNase, que degrada moléculas de RNA (ROMANO & BRASILEIRO, 1999). A qualidade de do DNA é avaliada pela relação entre a absorbância a 260 nm e 280 nm (A260/A280). Valores próximos a 1,8 sugerem que o DNA tem uma boa qualidade (HEALEY et al., 2014). O extrato também deve ser avaliado em gel de agarose por meio de eletroforese, o qual permitirá a visualização de possíveis debris celulares, bem como, o estado fragmentado ou intacto da molécula de DNA (HEALEY et al., 2014). Dessa forma, esses procedimentos permitem avaliar o rendimento, pureza e integridade do DNA extraído, parâmetros importantes para utilizações posteriores das amostras de DNA.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Quantificar as bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar usando a técnica de PCR em Tempo Real com primers estirpe-específicos.

3.2 Objetivos específicos

- I. Desenvolver primers estirpes-específicos a partir do genoma das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar.
- II. Avaliar a especificidade, sensibilidade e eficiência de amplificação dos primers desenhados.
- III. Estabelecer um método para extração de DNA de raízes de cana-de-açúcar com qualidade e quantidade suficientes para a realização das reações de qPCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho dos Primers

Os primers foram desenhados a partir da sequência dos genomas das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar, com informações disponíveis nos trabalhos de Bertlan et al. (2009), Baldani et al. (2011) e Da Silva et al. (2018). O genoma de cada estirpe foi fragmentado *in silico* em “contigs” com 500 pares de base. Esses contigs foram submetidos a uma análise de similaridade utilizando o programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com genomas de outros organismos depositado no banco NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Os primers foram desenhados utilizando os programas *Primer3plus* (UNTERGASSER et al., 2012) e *Oligo explorer1. 1.0* (<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Oligo-Explorer.shtml>) a partir dos contigs exclusivos do genoma de cada uma das bactérias (HCC103, HRC54, Ppe8^T, Pal5^T e CbAmc). A Tabela 23 do Anexo A mostra as sequências nucleotídicas para cada primer desenhado e o tamanho do fragmento amplificado em pares de base (pb). A maioria dos primers foi desenhada com tamanhos de 19 a 21 nucleotídeos, conteúdo CG entre 40 a 60%, *Tm* entre 55 a 63°C e para amplificar fragmentos de DNA entre 100 a 200 pb.

Os primers para a estirpe CbAmc da espécie *N. amazonense* foram desenhados seguindo esses mesmos critérios e gentilmente cedidos por Leonardo Araújo Terra, doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária-PPGCTIA da UFRRJ.

Os códigos Hr103, Hs54, Pt8, Gd5 e NaCb na nomenclatura dos primers desenhados nesse trabalho representam, respectivamente, as estirpes HCC103, HRC54, Ppe8^T e Pal5^T e CbAmc.

4.2 Cultivo das Bactérias

As bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar foram cultivadas em meio líquido DYGS (*Dextrose Yeast Glucose Sucrose*) modificado, com a seguinte composição (g:L): 2,0 g de glicose; 2,0 g de ácido málico; 1,5 g de peptona; 2,0 g de extrato de levedura; 0,5 g de K₂HPO₄; 0,5 g de MgSO₄.7H₂O e 1,5 g de ácido glutâmico com pH ajustado para 6,0 (BALDANI et al., 2014). Utilizaram-se inóculos individuais das estirpes: HCC103, HRC54, Ppe8^T, Pal5^T e CbAmc, conservado em meio líquido DYGS contendo 15 % de Glicerol. Foi adicionado 500 µL de cada inoculo em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio DYGS. Esses foram acomodados em triplicatas biológicas das bactérias para crescerem em *shaker* com rotação de 200 rpm a 30°C por 24 horas, com exceção da Pal5^T que teve seu crescimento estendido até 36 horas nas mesmas condições de rotação e temperatura das demais.

4.3 Contagem em Câmara de Neubauer

A câmara consiste de uma lâmina de vidro contendo uma região de quartzo chamada retículo de Neubauer, que é um quadrado com 3 mm de lado com divisões e subdivisões (perpendiculares e paralelas) (Figura 6). A capacidade volumétrica dos quadrantes é possível ser calculada a partir das dimensões e profundidade do mesmo. Dessa forma, é feita uma relação entre o número de células no volume em mm³ para cm³ ou mL (LUCARINI et al., 2004).

Para contagem em Câmara de Neubauer foram coletadas alíquotas de 100 µL do meio de cultivo DYGS contendo as bactérias crescidas com três repetições biológicas isoladamente,

para cada estirpe, e adicionadas separadamente em 900 μL de solução salina 0,85% (m:v) NaCl (m:v). Em seguida foi feita mais uma diluição com as mesmas proporções anteriores, obtendo amostra 100x diluída. Para reduzir a motilidade das bactérias a serem contadas foi adicionado 2 μL de formaldeído na amostra diluída e 5 μL da amostra 100x diluída foram aplicados na lâmina precisamente no retículo de Neubauer sendo posteriormente coberta com uma lamínula de vidro. As bactérias em cada amostra foram contadas em quintuplicatas, conforme a região C nas posições 1, 2, 3,4 e 5 destacados na Figura 6. A média aritmética das quatro observações foi usada na Equação 4 para determinar o número de células por mL^{-1} nos cultivos do **Item 4.2**.

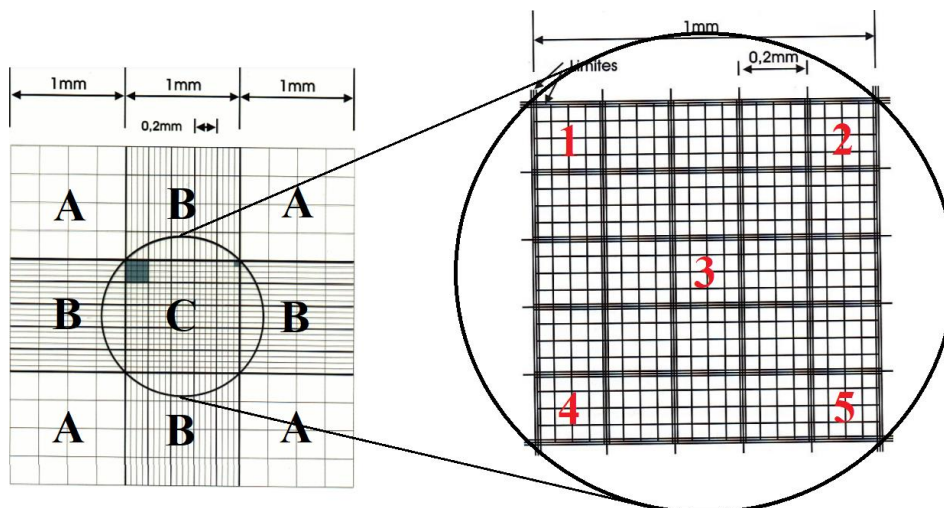


Figura 6. Representação dos quadrantes na região chamada retículo de Neubauer. Fonte: Angelis & Valsechi (2008).

Equação 4.

$$\text{N}^\circ \text{ Células} = M \times \text{FD} \times 2,5 \cdot 10^5$$

Onde, $\text{N}^\circ \text{ Células}$ é o número de células bacterianas por mL, M é a média aritmética do número de células das contagens, FD é o fator diluição e $2,5 \cdot 10^5$ é uma constante usada para transformas mm^3 e cm^3 ou mL.

4.4 Contagem por Microgota

Para esse método de contagem foi preparado o meio DYGS sólido, conforme as especificações do **Item 4.2** com a adição de agar (15 g/L). O meio foi vertido em placas de Petri. Adicionou-se em série de 10^{-1} a 10^{-8} , 100 μL da suspensão bacteriana inicial em microtubos de 1,5 mL contendo 900 μL de solução salina 0,85% NaCl (m:v). Três gotas (10 μL) de cada diluição foram aplicadas no meio sólido DYGS nas placas de Petri com auxílio de uma pipeta manual. Para cada uma das três repetições biológicas foram feitas três repetições técnicas. As placas foram acomodadas em estufas com temperatura de 30 $^\circ\text{C}$ por 24 horas. A contagem foi realizada a partir da diluição que era possível observar de 3 a 30 colônias (Figura 43, Anexo C). O número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado pela Equação 5 seguinte %.

Equação 5.

$$N^{\circ} \text{ UFC} = C \times 10^d \times 10^2$$

Onde, $N^{\circ} \text{ UFC}$ é o número de unidades formadoras de colônia por mL, C é a média aritmética do número de colônias observadas nas três replicas técnicas, d é o valor em modulo da diluição onde as colônias foram contadas e 10^2 é uma constante usada para a conversão de μL para mL.

Complementar a essa técnica, foi realizado o teste de *Life and Dead* que por meio de corantes fluorescentes e microscopia confocal, permitindo a visualização de células bacterianas vivas e mortas (Figura 44, Anexo D). Para tal, utilizou-se 1 mL da mesma suspensão bacteriana submetida a técnica de contagem por Microgota em placa. Foi adicionado 1,5 μL de cada um dos dois corantes (para células vivas e mortas) diretamente no volume de 1 mL, a mistura foi vortexada e deixada em repouso por 15 min. Uma alíquota de 10 μL foi aplicada na lâmina e sobreposta com lamínula para visualização em microscopia confocal.

4.5 Extração do DNA Genômico de Bactéria

Para o isolamento do DNA genômico a partir da suspensão bacteriana em meio DYGS líquido foram usadas duas metodologias, com o kit comercial *Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit* (Promega[®], USA) e o tampão CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Antes de serem submetidas ao processo de extração, 1 mL da suspensão bacteriana foi sedimentado em micro tubos de 2 mL por centrifugação a 10.000 rpm por 3 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado formado (pellet) foi utilizado para extração de DNA. O kit comercial foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante (Promega[®], USA). Para a extração de DNA com CTAB foram utilizados 600 μL do tampão [2% CTAB; 1,42 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH = 8,0; 20 mM EDTA pH = 8,0; 2% PVP; 5 mM ácido ascórbico e 4 mM DIECA] pré-aquecido a 80° C, o sedimento bacteriano foi dissolvido suavemente por pipetagem. As amostras foram colocadas em Banho Maira por 10 min e foram misturadas suavemente duas vezes nesse período. Em seguida, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente em bancada, e adicionou-se 3 μL de RNase (20 mg mL⁻¹) e 5 μL de Proteinase K (1 mg mL⁻¹) com posterior incubação a 37° C por 30 min. Após esse período, adicionou-se 600 μL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi coletado e foi adicionado 70% de Isopropanol correspondente ao volume recuperado. As amostras foram invertidas suavemente por 10 vezes e colocadas no gelo por 15 min, depois centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao pellet formado foi adicionado 500 μL de álcool 70% com posterior centrifugação a 10.000 rpm por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi colocado para secar por 2 h em capela de exaustão com fluxo de ar ligado. O DNA foi reidratado com 50 μL de TE pH = 8,0.

O rendimento em ng μL^{-1} e a pureza A260/A280 nm das amostras de DNA foram avaliados em espectrofotômetro utilizando o equipamento NanoDrop[®]. A integridade do DNA genômico extraído foi observada em gel de agarose 1% (m:v) em tampão TAE 1x, submetido a eletroforese (70 V/90 min), corado com brometo de etídeo, foto-documentado e registrado pelo programa KODAK[®].

4.6 PCR Convencional

O DNA genômico isolado das cinco bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar foi utilizado para testar os iniciadores desenhados nesse trabalho. As reações para todos os pares de iniciadores foram realizadas nas seguintes condições: 2,5 µL de tampão (10x); 1,25 µL MgCl₂ (50 mM); 0,5 µL dNTP (10 mM); 1,0 µL de cada primer (10 µM); 0,2 µL da enzima Taq Polimerase (5 U); 17,55 µL de água para PCR e 1 µL amostras de DNA bacteriano (10 ng.µL⁻¹). As condições utilizadas para amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida por 40 ciclos, com temperatura de anelamento de 60°C por 45 segundos, depois a 72°C por 1 min e extensão final de 72°C por 5 min. Utilizou-se 13 µL do produto da PCR para eletroforese (90 V/90 min) em gel de agarose 2%, em seguida corado com brometo de etídio e visualizado em fotodocumentador. Para aumentar a eficiência de amplificação e/ou especificidade foram realizados alguns ajustes na concentração de MgCl₂, quantidade dos primers, adição de Tween 20, bem como, variações na temperatura e tempo de anelamento.

4.7 Teste Estirpe-Específico dos Primers Selecionados

Para testar a especificidade dos primers desenhados em nível estirpe-específicos o DNA genômico de cinco estirpes pertencentes a cada uma das espécies bacterianas componentes do inoculante foi utilizado como molde na PCR. No caso da *P. tropica* foi utilizado apenas o DNA de quatro estirpes e o DNA de outra espécie do mesmo gênero. O DNA dessas bactérias (Tabela 4) foi cordialmente cedido pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) do Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (CNPAB).

Tabela 4. Estirpes das espécies de bactérias diazotróficas utilizadas para avaliar a especificidade dos primers.

Espécie	Estirpe	Código CNPAB	Cultura de Origem	Referência
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	M1	BR11191	Cana-de-açúcar	Olivares et al. (1997)
	M4 ^T	BR11192	Cana-de-açúcar	Olivares et al. (1997)
	M5	BR11193	Cana-de-açúcar	Olivares et al. (1997)
	M6	BR11194	Cana-de-açúcar	Olivares et al. (1997)
	HRC52	BR11511	Cana-de-açúcar	Olivares et al. (1997)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	ZAE67 ¹	BR11175	Arroz	Baldani et al. (1986)
	HRC80	BR11198	Cana-de-açúcar	Olivares et al. (1997)
	HCC102	BR11336	Cana-de-açúcar	Olivares et al. (1997)
	HS4	BR11382	Coqueiro	CNPAB
	ZAE94	BR11417	Arroz	Baldani et al. (1986)
<i>Paraburkholderia tropica</i>	Ppe5	BR11363	Cana-de-açúcar	Reis et al. (2004)
	Ppe7	BR11365	Cana-de-açúcar	Reis et al. (2004)
	117	BR11820	Arroz	Rodrigues et al. (2006)
	141	BR11827	Arroz	Rodrigues et al. (2006)
<i>Paraburkholderia vietnaminensis</i>	139	BR11826	Arroz	Rodrigues et al. (2006)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	PR-1	BR11199	Cana-de-açúcar	CNPAB
	PR34	BR11228	Cana-de-açúcar	CNPAB
	PRC1	BR11237	Capim-camerum	Reis et al. (1994)
	PSP19	BR11251	Cana-de-açúcar	CNPAB
	17R ⁻²	BR11952	Cana-de-açúcar	Guedes et al. (2008)
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	Ym6	BR11147	Milho	Azevedo et al. (2005)
	YA95	BR11160	Arroz	Azevedo et al. (2005)
	YS58	BR11162	Sorgo	Azevedo et al. (2005)
	YA14	BR11171	Arroz	Azevedo et al. (2005)
	Aam15	BR11929	Arroz	Magalhães et al. (1983)

4.8 BOX-PCR

Foram feitas reações de BOX-PCR usando as amostras de DNA das estirpes da Tabela 4, como também para as estirpes do inoculante para cana. As reações foram preparadas com o primer BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC et al., 1994) e: 2,5 µL de tampão (10x); 1,5 µL MgCl₂ (50 mM); 0,75 µL dNTP (10 mM); 2,5 µL de primer (10 µM); 0,25 µL da enzima Taq Polimerase (5 U); 2,0 µL de Tween 20 (2%); 14,25 µL de água para PCR e 1 µL amostras de DNA bacteriano (10 ng µL⁻¹). As condições utilizadas para amplificação foram: desnaturação inicial a 95° C por 5 min, seguida por 35 ciclos (94° C por 1 min), temperatura de 53 °C por 1 min, depois a 65° C por 8 min e extensão final de 65° C por 16 min. Utilizou-se 13 µL do produto da BOX-PCR na eletroforese (70 V/300 min) por meio de um gel de agarose 2%, em seguida corado com brometo de etídio, descorado por 180 min e visualizado em foto-documentador Kodak Logic 100 KODAK®. Utilizou-se como referência o marcador molecular 1 kb Plus Invitrogen®. O perfil de bandas amplificadas por BOX-PCR foi utilizado para uma análise da relação genética dentro e entre as espécies utilizando o programa *BioNumerics* v.7.6 (APPLIED MATHS, BÉLGICA). As matrizes de similaridade para a construção do dendrograma foram calculadas pelo coeficiente de correlação de *Jaccard* e o agrupamento de matrizes de

similaridade foi realizado pelo algoritmo *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean* (UPGMA) sendo os níveis de otimização e tolerâncias ajustados para 1,0.

4.9 Análise de Similaridade e Filogenia

As sequências do gene 16S rDNA das bactérias que compõem o inoculante e as bactérias da Tabela 4, exceto o da estirpe YS58 (BR11162), foram utilizadas para análise de similaridade e construção de árvore filogenética por meio do software MEGA v.7 (KUMAR et al., 2016). As sequências foram alinhadas e editadas manualmente para o tamanho de 1363 pb e utilizadas para construção das árvores usando o método *Neighbor-Joining*. A distância evolucionária foi computada usando o método *Kimura 2-parameter* (KIMURA, 1980). E as topologias das árvores filogenéticas foram avaliadas utilizando o método de *Bootstrap* com 1.000 repetições (FELSENSTEIN, 1985).

4.10 Testes por PCR em Tempo Real (qPCR)

Para avaliar os primers selecionados para qPCR utilizou-se uma alíquota de DNA genômico extraída de cada uma das estirpes HCC103, HRC54, Ppe8^T, Pal5^T e CbAmc. A alíquota inicial foi diluída em série de 200 a 0,0002 ng μL^{-1} . As reações foram preparadas para o volume final de 15 μL , contendo: 7,5 μL SYBR Green (Promega[®] ou Qiagen[®]); 0,3 μL de cada primer 10 μM , 1,9 μL de água ultrapura e 5 μL do DNA genômico. As concentrações finais de DNA variaram de 1000 a 0,0001 ng $15 \mu\text{L}^{-1}$ e cada diluição foi pipetada em triplicatas em placas com 96 poços. As condições da reação da qPCR foram: desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, de 40 ciclos, com temperatura de 60 °C e 30 segundos seguido de 72 °C por 1 min e extensão final de 72 °C por 5 min. Também para aumentar a eficiência de amplificação e/ou especificidade foram realizados alguns ajustes na concentração dos primers e adição de Tween 20 2% (v:v).

4.11 Cálculo do Número de Cópias do Fragmento de DNA

Os valores de Ct obtidos da qPCR com as diluições de DNA conforme descrito no item 4.10 foram utilizados para construção de uma curva para calcular o número de cópias do fragmento de DNA alvo de cada bactéria. A massa de DNA e o tamanho do genoma de cada uma das estirpes (Tabela 3) foram utilizados na Equação 6 para calcular o número de do DNA alvo amplificado. Como cada par de primers só se anela a uma única região do genoma e espera-se que cada célula tenha um genoma, esse valor foi considerado como o número de células bacterianas em cada amostra.

Equação 6.

$$\text{N}^\circ \text{ Células} = \frac{X \text{ (ng)} \times 6,0221 \cdot 10^{23} \text{ (moléculas} \cdot \text{mol}^{-1})}{N \text{ (pb)} \times 660 \text{ (g} \cdot \text{mol}^{-1}) \times 1,10^9 \text{ (ng} \cdot \text{g}^{-1})}$$

Onde, **N° Células** é o número de células ou cópias do fragmento de DNA alvo amplificado, **X** é a quantidade de DNA genômico usado na reação em nanograma (ng); **6,0221.10²³** é a constante de Avogadro; **N** representa o tamanho do DNA genômico em pares de base (pb); **660** é a massa média em ng de 1 pb de DNA dupla fita; e **1.10⁹** é a constante usada para transformar a massa do fragmento de DNA amplificado, de grama (g) para nanograma (ng).

4.11.1 Sensibilidade da qPCR usando primers específico

A sensibilidade de cada par de primer foi avaliada a partir da amostra contendo DNA genômico bacteriano mais diluída da qual foi possível observar amplificação por parte dos primers na qPCR. Essas amostras foram utilizadas na qPCR em 10 repetições técnicas.

4.11.2 Eficiência de amplificação dos primers selecionados para qPCR

A eficiência dos primers foi calculada pela Equação 2. Para isso, utilizou-se o valor da inclinação da reta (*Slope*), gerado pela equação de cada par de primer. Foram plotados gráficos usando os resultados gerados pelas médias do valor Ct correlacionadas ao \log_{10} do número de cópias do DNA alvo, ambos, encontrados por meio das amostras diluídas em série (Equação 6). Foram feitas pelo menos 5 testes da qPCR para cada par de primer.

4.12 Experimentos com Plantas de Cana-de-açúcar

Os experimentos foram montados nas áreas experimentais da Embrapa Agrobiologia, BR 465 km 7, Seropédica-RJ (22°44'38"S, 43°42'28"W e 26 m de altitude).

4.12.1 Experimento I: plantas cultivadas em solo

O experimento foi iniciado em setembro de 2015 na área experimental da Embrapa Agrobiologia utilizando vasos com 0,40 m de diâmetro e 0,80 m de altura e volume de 100 L. Os vasos foram preparados com uma camada de 10 cm de brita grossa, forrada com sombrite e preenchidos com 100 kg de solo (50 kg da camada 0-20 e 50 kg da cama de 20-40 cm). As duas camadas de solo foram homogeneizada e, feita a correção e adubação, com doses equivalentes a 1.500 kg ha⁻¹ calcário, 500 kg ha⁻¹ gesso, 250 kg ha⁻¹ K₂O, 250 kg ha⁻¹ P₂O₅ e 100 kg ha⁻¹ FTE conforme a necessidade verificada na análise de solo. Os vasos foram acomodados ao ar livre em uma área nivelada e sem sombreamento, com aproximadamente 180 m².

As variedades de cana-de-açúcar utilizadas foram RB867515 e RB92579. As mudas foram obtidas na forma de minirrebolos (segmentos de colmos com gemas individualizadas) com tratamento térmico a 52 °C por 30 min (LANDELL et al., 2013) e fúngico por 3 min em solução 0,1% (v:v) contendo o fungicida Comet[®], utilizando o sistema de multiplicação de mudas pré-brotadas (MPB). Um total de 128 mudas foram utilizadas no experimento com desenho experimental em blocos casualizados com delineamento em parcelas subdivididas, e épocas de coleta na parcela com fatorial 2 x 2 x 2 (2³). Esse arranjo é resultado das combinações entre variedades (RB867515 e RB92579), condições (inoculado e não inoculado) e dose (0 e 45 kg ha⁻¹), ou seja, igual a 8 tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5. Tratamentos utilizados no Experimento I.

Variedades	Condições	Doses de N	Tratamentos
RB867515	Não inoculado	0 kg ha ⁻¹	RB867515 Não inoculado 0 kg.ha ⁻¹
		45 kg ha ⁻¹	RB867515 Não inoculado 45 kg.ha ⁻¹
	Inoculado	0 kg ha ⁻¹	RB867515 Inoculado 0 kg.ha ⁻¹
		45 kg ha ⁻¹	RB867515 Inoculado 45 kg.ha ⁻¹
RB92579	Não inoculado	0 kg ha ⁻¹	RB92579 Não inoculado 0 kg.ha ⁻¹
		45 kg ha ⁻¹	RB92579 Não inoculado 45 kg.ha ⁻¹
	Inoculado	0 kg ha ⁻¹	RB92579 Inoculado 0 kg.ha ⁻¹
		45 kg ha ⁻¹	RB92579 Inoculado 45 kg.ha ⁻¹

Foram realizadas quatro coletas aos 90, 180, 270 dias após o plantio (DAP), no período de um ano, acompanhando o ciclo da cultura. A Figura 7 mostra as fases de desenvolvimento das plantas até os 270 DAP.



Figura 7. Fases do crescimento e desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar utilizados no Experimento I. Da esquerda para direita: Plantio, 90 DAP, 180 DAP e 270 DAP.

4.12.2 Experimento II: plantas cultivadas em areia mais vermiculita (2:1)

Esse experimento foi conduzido em casa de vegetação com gemas das mesmas variedades utilizadas no Experimento I. As gemas foram submetidas a um tratamento térmico de 52° C por 30 min (LANDELL et al., 2013), seguido por um tratamento com o fungicida 1% (v:v) Comet[®] por 3 min. Metade das gemas tratadas foi submersa durante 1 hora em calda contendo o inoculante para cana-de-açúcar. A calda para inoculação foi preparada usando 5 g do inoculante turfoso com concentração aproximada de 10⁹ UFC g⁻¹ das estirpes (HCC103, HRC54, Ppe8^T, Pal5^T e CbAmc) em 2 L de água destilada. Em seguida os tratamentos controle e inoculado foram acomodados separadamente em caixas plásticas (15 L) contendo areia e vermiculita (2:1) esterilizadas. Após 10 dias as mudas pré-brotadas e com raízes emitidas foram transferidas para vasos de 1 L contendo areia e vermiculita (2:1) estéril. Os tratamentos da Tabela 6 foram acomodados conforme o desenho experimental: delineamento em blocos casualizado (DBC), sendo os tecidos raiz e parte aérea tratados como subparcelas. As amostras foram coletadas aos 15, 30 e 45 dias após o transplante (DAT) (Figura 8).

Tabela 6. Tratamentos utilizados no Experimento II.

Variedades	Condição	Tratamentos
RB867515	Inoculado	RB867515 Inoculado
	Não Inoculado	RB867515 Não inoculado
RB92579	Inoculado	RB92579 Inoculado
	Não Inoculado	RB92579 Não inoculado

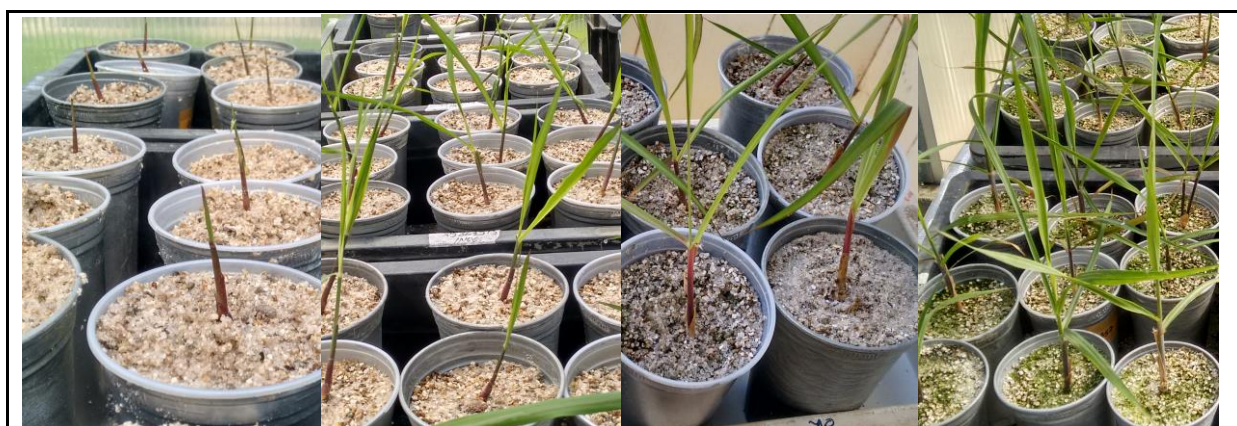


Figura 8. Fases do crescimento e desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar utilizadas no Experimento II. Da esquerda para direita: transplante, 15 DAT, 30 DAT e 45 DAT.

Durante o experimento foi aplicada no substrato, a cada dois dias, solução nutritiva para plantas (HOAGLANDS & ARNON, 1950) (Tabela 26, Anexo F). Com 30 DAT todos os tratamentos apresentaram sinal de deficiência de nitrogênio, para minimizar a carência, foi aplicada via foliar e no substrato a solução de nitrato de amônia a 1% (m:v), no mesmo turno de aplicação da solução nutritiva. Os tecidos coletados foram divididos em parte aérea e raiz, lavados com água destilada, secados com papel toalha, imediatamente congelados em nitrogênio líquido (-196° C) e armazenadas a -70° C.

4.13 Extração de DNA de Tecidos de Cana-de-açúcar

4.13.1 Colmos

A extração de DNA total dos colmos de cana-de-açúcar foi realizada utilizando o tampão CTAB [CTAB a 2% (p:v); NaCl a 1,42 M; Tris-HCl a 100 mM, pH 8,0; EDTA a 20 mM pH 8,0; PVP a 2%, ácido ascórbico a 5,0 mM e 3 μ L de RNase a 20 mg mL⁻¹] preaquecido a 65°C. Em um microtubo de 2 mL contendo cerca de 200-300 mg de colmo previamente macerados em nitrogênio líquido foram adicionados 850 μ L de tampão. Depois de homogeneizada, a mistura (CTAB/tecido vegetal), foi incubada por mais 30 min a 65°C. Em seguida foram adicionados 750 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e novamente foi realizada outra homogeneização e posterior centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foram adicionados 0,7 de Isopropanol correspondente ao volume recuperado, a amostra foi então homogeneizada suavemente por 8 vezes e submetida novamente a centrifugação por 5 min. a 14.000 rpm em temperatura ambiente. Logo após, o sobrenadante foi descartado e ao DNA precipitado adicionou-se 500 μ L de etanol 70%, sendo submetido às mesmas condições de centrifugação anterior. Na etapa final o sobrenadante foi descartado e o precipitado colocado para secar a temperatura ambiente em câmara de exaustão com fluxo de ar ligado por 120 min. Em seguida o pellet foi resuspendido com 50 μ L de TE pH 8,0.

4.13.2 Raízes

A raiz foi macerada com o auxílio de nitrogênio líquido em gral e pistilo e 200-300 mg foram utilizados para extração de DNA total. Os seguintes **tampões** foram testados para o isolamento do DNA de raízes: **I-** [2,0% de CTAB (m:v); 1,42 M de NaCl; 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0); 20 mM de EDTA (pH 8,0); 4 % de PVP 40 (m:v); 5,0 mM de ácido ascórbico; 4,0 mM de DIECA ou DTT; 5,0 μL de RNase ($20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$); 5% 2- β -Mercaptoethanol (v:v)] e **II-** [25 mM de Tris-HCl; 50 mM de Glicose; 10 mM de EDTA; 25 mg mL^{-1} de Lisozima]. O protocolo testado para extrair o DNA de raiz (Anexo G) foi estabelecido com base nos trabalhos de Romano & Brasileiro (1999), Muoki et al. (2012), Holmes et al. (2014) e Ramos et al. (2014).

4.14 Quantidade e Qualidade do DNA Total Extraído

Após extração, uma alíquota de DNA foi utilizada para quantificação por espectrometria em NanoDrop[®] *Spectrophotometer* ND 1000c. A concentração de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) foi mensurada por absorbância (A) no comprimento de onda de 260 nm. A relação entre os valores de absorbância a 260 e 280 nm ($260_{\text{nm}}/280_{\text{nm}}$) foi utilizada como indicador da qualidade do DNA extraído. Essa relação deve estar entre 1,8-2,0 (SAMBROOK & RUSSELL, 2001; AZEVEDO et al., 2003). Além disso, utilizou-se 1 μL da amostra de DNA isolada para a análise por eletroforese em gel de agarose 1%. O gel foi submetido a 70 V por 90 min e em seguida corado com brometo de etídeo, lavado em água destilada por 15 min, e foto-documentado para avaliar a integridade do DNA extraído.

4.15 PCR Utilizando primers para o 16S rDNA

Para avaliar a qualidade do DNA extraído dos tecidos vegetais foram realizadas PCRs convencionais com os primers para o gene 16s rDNA. Os primers utilizados foram 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (FURUSHITA et al., 2003) e Amp2 (5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3') (WANG et al., 1993) para amplificação de um fragmento de ~1.500 pb do gene 16S rDNA. A PCR utilizando esses iniciadores foi preparada utilizando: 2,0 μL de cada iniciador 5 μM ; 2,5 μL de tampão 10x; 2,0 μL de MgCl_2 50 mM; e 0,2 μL Taq polimerase 5 U; 0,5 μL de dNTP 10 mM; 1 μL da amostra de DNA extraída do tecido de cana ($20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), e água ultrapura até completar o volume final de 25 μL por reação. As condições para as reações de PCR foram: desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguida de 39 ciclos com 1 min a 95°C, 60° C por 90 s e 72° C por 1 min, seguidos de uma extensão final de 72°C por 5 min.

4.16 Uso da PCR em Tempo Real (qPCR)

Para as reações de qPCR usou-se os kits Promega[®] e Qiagen[®] SYBR Green. As reações foram realizadas em triplicatas técnicas em placas contendo 96 poços usado o equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). As amostras de DNA total das bactérias crescidas no meio de cultivo DYGS e das plantas de cana foram todas padronizadas para a concentração de 10 e 20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, respectivamente, e utilizadas nas reações de qPCR de acordo com as seguintes reagentes condições: 5 μL da amostra de DNA; 7,5 μL de SYBR Green; 0,30 - 1,0 μL dos primers F e R 10 μM , e 0,5 - 1,3 μL de água para PCR completando o volume final de 15 μL . As modificações nas condições da qPCR, necessárias para aumentar a eficiência de amplificação de cada primers são mostradas na Tabela 10.

4.16.1 Quantificação das bactérias crescidas em meio DYGS

As bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar foram quantificadas em número de células mL⁻¹. Para tal, utilizou-se como molde para a qPCR o DNA bacteriano extraído de cultivos realizados em meio DYGS modificado e primers específicos. Os valores de Ct da qPCR foram usados na Equação 7 (ILHA et al., 2016) para a quantificação.

Equação 7.

$$\text{N}^{\circ} \text{ Células} = \frac{\text{A} \times \text{B} \times \text{C}}{\text{D} \times \text{E}}$$

Onde, **A** é a quantidade de fragmentos alvo ou células obtidas por meio do valor Ct da qPCR; **B** é a concentração de DNA genômico isolado em ng µL⁻¹; **C** é o volume de DNA extraído em µL; **D** é a massa de DNA total usado na reação em ng; e **E** é o volume do meio DYGS usado para extração em mL.

4.16.2 Determinação do número de células por grama de tecido vegetal

Após as reações de qPCR o Ct médio das triplicatas, gerado a partir das amostras de DNA isoladas dos tecidos da planta de cana-de-açúcar, foram usados para quantificação das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar. Para isso, utilizou-se a equação da reta específica para cada bactéria (Figura 21). Como o fragmento alvo a ser amplificado tem apenas uma cópia no genoma, pode-se usar o valor do número de cópias do fragmento calculado por meio da qPCR para estimar o número total de células presentes em cada amostra. A massa em grama (g) do tecido utilizado para a extração de DNA e o rendimento (ng µL⁻¹) foram utilizados para o cálculo final do número de células por grama de tecido nas amostras de DNA isoladas dos tratamentos, conforme adaptações na Equação 7, o volume (mL) no numerador foi substituído para massa (g).

4.17 Estatística

Os dados gerados das quantificações realizadas por meio das técnicas da Câmara de Neubauer, Microgota em placa e qPCR foram submetidos, ao teste de normalidade Shapiro-Wilk W, análises de variância, teste de comparação de média Tukey, e regressão, todos com $P < 0,05$ de significância, utilizando o programa estatístico SISVAR5.6[®] (Lavras, Brasil) (FERREIRA, 2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente os resultados gerados nesse trabalho mostram as análises dos primers desenhados, que justificam a seleção dos primers específicos para a amplificação do DNA das estirpes bacterianas de interesse. Em seguida, os resultados obtidos com a quantificação do número de bactérias por qPCR, utilizando os primers selecionados, foi comparado a quantificação utilizando Câmara de Neubauer e contagem por Microgotas em placa.

Posteriormente, os primers foram utilizados na qPCR para a quantificação das bactérias do inoculante a partir do DNA total extraído dos tecidos de cana-de-açúcar, de plantas cultivadas em duas condições diferentes, em solo e areia mais vermiculita (2:1) (**Subitens 14.3.1 e 14.3.2**). Os resultados mostraram que o DNA extraído da raiz de plantas cultivadas em solo, a partir de 180 dias após o plantio, não tinha qualidade suficiente para ser utilizado nas reações de PCR e qPCR. No entanto, para amostras de DNA extraídas de colmo (plantas cultivadas em solo), parte aérea e raízes (plantas cultivadas em areia com vermiculita) das variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579) foi possível estimar a população de bactéria do inoculante por meio da qPCR com primers espécie-específico.

5.1 Seleção dos Primers em Nível de Espécie

De um total de 39 pares de primer desenhados para amplificar por PCR e qPCR o DNA alvo das bactérias do inoculante para cana-de-açúcar, 10 foram selecionados (Tabela 9/Figura 19) para serem utilizados nas análises de quantificação. Mesmo utilizando a informação do genoma, para busca regiões de DNA exclusivas de cada estirpe, e ferramentas computacionais, para ajudar a desenhar bons primers, as avaliações por PCR mostraram que apenas 25% do total de primers desenhados puderam ser selecionados e somente três mostraram-se provavelmente estirpe-específicos. Para todos os primers foram necessários ajustes nas concentrações de $MgCl_2$ 50 mM, primers, temperatura e tempo de anelamento, e em alguns dos casos a adição de Tween 20, para aumentar a eficiência das reação de PCR e qPCR, Tabela 10.

Para a *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 (BR11504) foi selecionado um maior número de primers espécie-específicos entre as bactérias avaliadas. Dos 10 pares de primers desenhados para HCC103, 4 (Hr103C1870, Hr103C3867, Hr103C3868 e Hr103C4062) foram espécie-específicos (Figura 9).

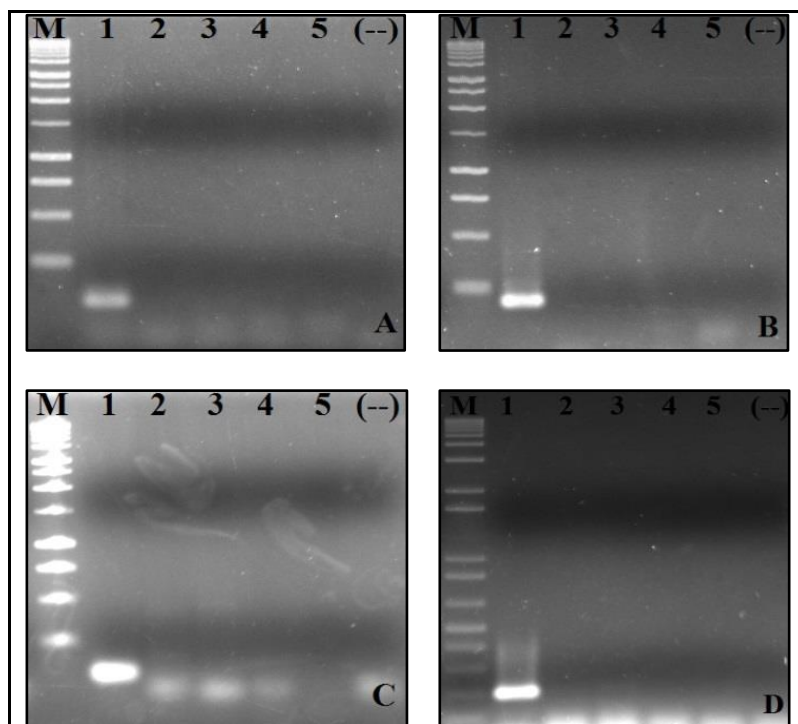


Figura 9. Gel de agarose 2% com o produto da amplificação por PCR convencional utilizando os primers Hr103C1870 (A), Hr103C3867 (B), Hr103C3868 (C) e Hr103C4062 (D) a partir do DNA genômico das 5 estirpes de bactérias do inoculante: 1) **HCC103**; 2) HRC54; 3) Ppe8^T; 4) Pal5^T; 5) CbAmc e (--) controle negativo. M- marcador de peso molecular

Apesar das inúmeras tentativas para o desenho de primers para a estirpe HRC54 de *H. seropedicae*, a grande maioria foi inespecífica. A partir do genoma de HRC54 foram desenhados 13 pares primers. No entanto, só foi obtido um produto de PCR específico para essa estirpe com a utilização dos primers desenhados a partir da sequência do gene *phageEndo* presente no genoma da estirpe HRC54 (Figura 10). Um fator importante para a ocorrência da amplificação foi a adição de Tween 20 no preparo da reação de PCR. O Tween 20 é um detergente frequentemente utilizado como otimizador da PCR (HILL & STEWART, 1992).

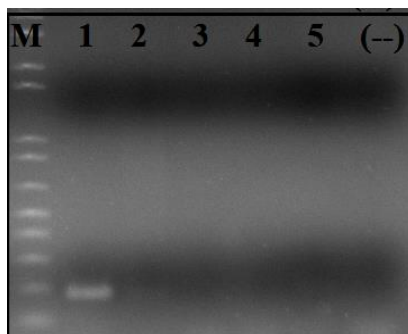


Figura 10. Gel de agarose 2% com o produto da amplificação por PCR convencional utilizando o primer Hs54CphageEndo a partir do DNA das estirpes: 1) **HRC54**; 2) HCC103; 3) Ppe8^T; 4) Pal5^T; 5) CbAmc e (-) controle negativo. M- marcador de peso molecular.

No caso da estirpe Pal5^T de *G. diazotrophicus* foi possível obter amplificação dos fragmentos do DNA alvo para dois (Gd5C70 e Gd5C4525) dos 4 pares de primers desenhados (Figura 11).

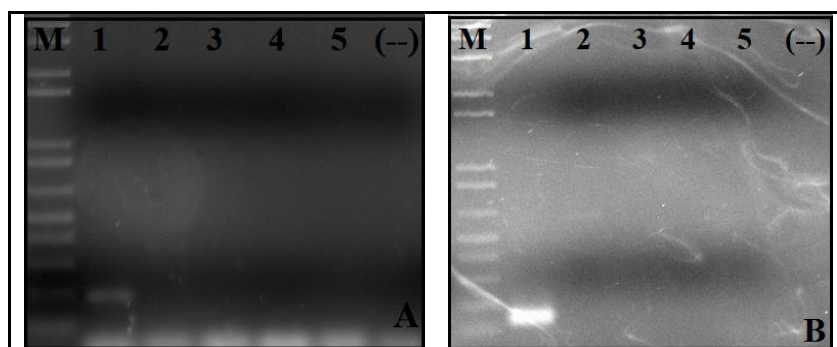


Figura 11. Gel de agarose 2% com o produto da amplificação por PCR convencional utilizando os primers Gd5C70 (A) e Gd5C4525 (B) a partir do DNA genômico das 5 estirpes de bactérias do inoculante: 1) **Pal5^T** 2) HCC103; 3) HRC54; 4) Ppe8^T; 5) CbAmc e (-) controle negativo. M- marcador de peso molecular.

Para estirpe Ppe8^T de *P. tropica* foram obtidos dois pares de primers espécie-específicos, Pt8C14 e Pt8C3641, a partir da avaliação dos 4 pares desenhados para essa bactéria Figura 12.

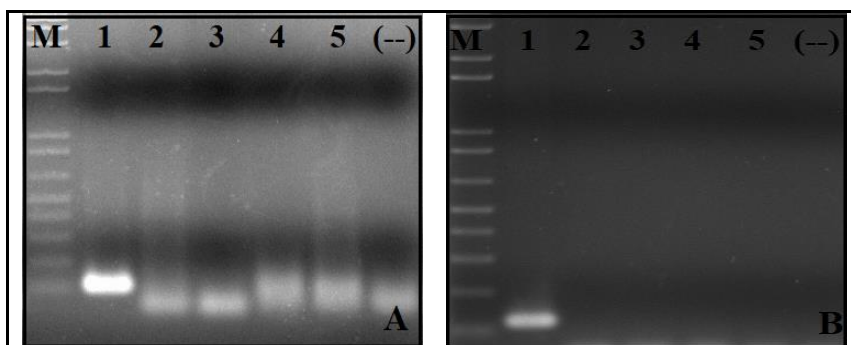


Figura 12. Gel de agarose 2% com o produto da amplificação por PCR convencional utilizando os primers Pt8C14 (A) e Pt8C 3641 (B) a partir do DNA genômico das 5 estirpes

de bactérias do inoculante: 1) **Ppe8^T** 2) HCC103; 3) HRC54; 4) Pal5^T; 5) CbAmc e (--) controle negativo. M- marcador de peso molecular.

Os primers desenhados para amplificar o DNA da estirpe CbAmc de *N. amazonense* foram feitos a partir das regiões de genes conhecidos no genoma da espécie. Embora todos os pares de primers terem amplificado os fragmentos alvos dos genes da CbAmc, ocorreram outras amplificações cruzadas e inespecíficas com o DNA genômico das outras espécies que compõem o inoculante para cana-de-açúcar. Exceto, quando utilizado os primers desenhados para a região do gene *gyrA* (Figura 13).

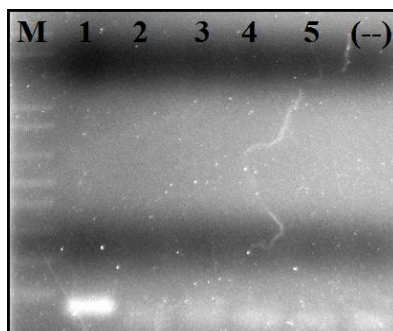


Figura 13. Gel de agarose 2% com o produto da amplificação por PCR convencional utilizando os primers NaCbCgyrA a partir do DNA genômico das 5 estirpes de bactérias do inoculante: 1) **CbAmc** 2) HCC103; 3) HRC54; 4) Ppe8^T; 5) Pal5^T e (--) controle negativo. M- marcador de peso molecular.

5.2 Avaliação dos Primers em Nível de Estirpe

Os pares de primers selecionados como sendo espécie-específico, foram avaliados quanto a especificidade em nível de estirpe utilizando o DNA de 30 espécies de bactérias filogeneticamente relacionadas, sendo 5 estirpes diferentes além das estirpes alvo para cada espécie (Tabela 4).

Para as 6 estirpes de *H. rubrisubalbicans* foi possível observar amplificação de um fragmento de DNA no tamanho esperado para a M6 e M4, além da HCC103. Para as outras três estirpes (M1, M5 e HRC52) não houve amplificação específica, apesar de podermos observar alguma reação de fundo (background) para as estirpes M1 e M4 (Figura 14). Os pares de primers Hr103C1870, Hr103C3867 (197 pb) e Hr103C3868 (117 pb) não foram estirpe específicos. Entretanto, o par de primer Hr103C4062 (188 pb) amplificou o fragmento de tamanho esperado apenas para a HCC103, sendo estirpe-específico (Figura 14D). A estirpe M6 mostrou amplificação para a maioria dos primers testados, seguida pela estirpe M4^T. As estirpes HCC103, M4^T e M6 foram todas isoladas da planta de cana-de-açúcar e o dendograma gerado a partir das análises de BOX-PCR (Figura 45A e 46, Anexo I), a árvore filogenética (Figura 47 e 48A, Anexo J) e as análises de similaridade (Tabela 7) das sequências do gene 16S rDNA mostraram que as essas estirpes são muito próximas filogeneticamente.

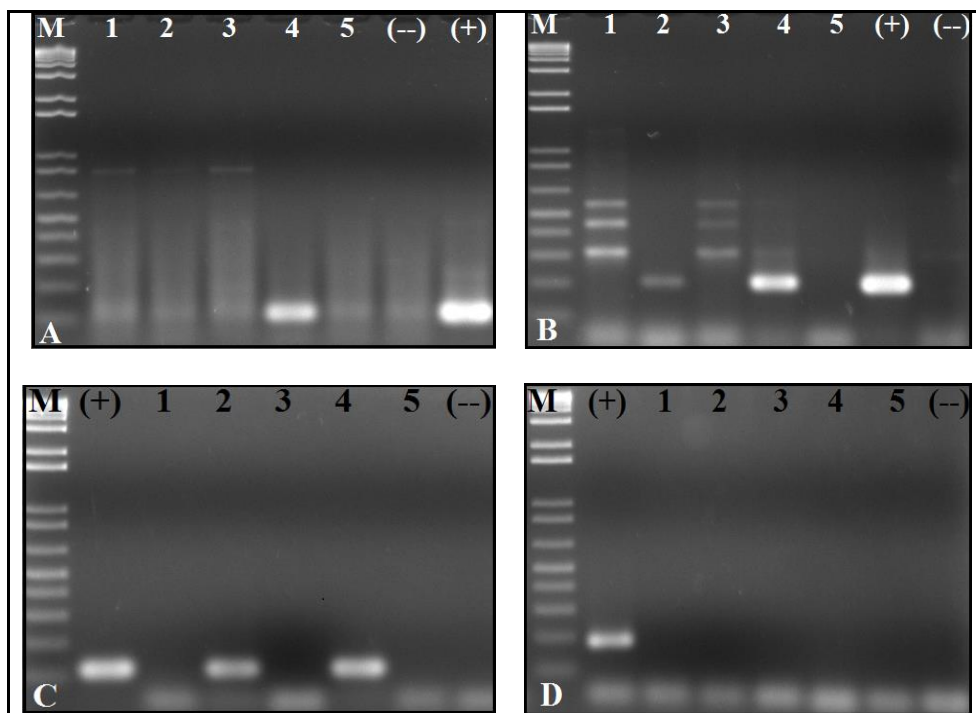


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 2% para avaliação da especificidade dos primers desenhados para estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans* utilizando o DNA genômico de 6 estirpes: 1) M1; 2) M4^T; 3) M5; 4) M6; 5) HRC52; (+) **HCC103** e (--) controle negativo, e 4 pares de primers A) Hr103C1870; B) 103C3867; C) Hr103C3868; e D) Hr103C4062.

Para a bactéria *H. seropedicae* foi avaliado apenas um par de primer, o Hs54CphageEndo, uma vez que não foi possível obter mais primers espécies-específico. No entanto, a reações de PCR com o DNA das estirpes **HRC54**, HRC80, HS4, ZAE67^T, HCC102 e ZAE94 utilizando esses primers amplificou um fragmento de tamanho esperado para 5 das 6 estirpes (Figura 15). A estirpe HS4 foi isolada do coqueiro, enquanto as estirpes ZAE67^T e ZAE94 foram isoladas de plantas de arroz (BALDANI et al., 1986) a HRC80 e HCC102 foram isoladas da cana-de-açúcar (OLIVARES et al. 1997). A estirpe HCC102 foi a única para a qual não foi observado amplificação com os primers Hs54CphageEndo. É interessante notar que as análises de similaridade do 16S (Tabela 7 e Figura 47 e 48B, Anexo J) e os resultados da BOX-PCR (Figura 45B e 46, Anexo I) sugerem que essa estirpe é a mais distante dentre as avaliadas, provavelmente em função disso, não foi observado amplificação.

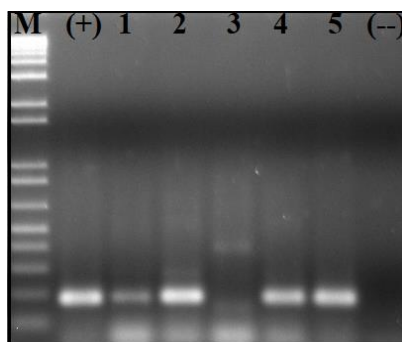


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 2% para avaliação da especificidade dos primers desenhados para estirpe HRC54 de *H. seropedicae* utilizando o DNA genômico de 6 estirpes: 1) ZAE67^T; 2) HRC80; 3) HCC102; 4) HS4; 5) ZAE94; (+) **HRC54** e (-) controle negativo, e o primer Hs54CphageEndo.

Para o gênero *Paraburkholderia* foi utilizado o DNA de 5 estirpes da espécie *P. tropica* (Ppe5, Ppe7, **Ppe8** e 117) e uma estirpe da espécie *P. vietnaminesis* (estirpe 141), Para essas bactérias foram avaliados 2 pares de primers (Pt8C14 e Pt8C3641) e foi observado amplificação apenas para as estirpes Ppe5, Ppe7, Ppe8 (Figura 16 A e B) que apresentaram 100% de similaridade de sequência de 16S e estão reunidas no mesmo grupo tanto no dendrograma, gerado pelos dados da BOX-PCR, quanto na árvore filogenética, construída a partir das sequência do 16S. Além disso, todas essas estirpes foram isoladas de cana-de-açúcar, sugerindo que são filogeneticamente muito próximo. No entanto, há necessidade do sequenciamento completo do genoma das estirpes Ppe5, Ppe7 para poder verificar o quanto essas estirpes são semelhantes e se os primers desenhados são estirpe-específicos.

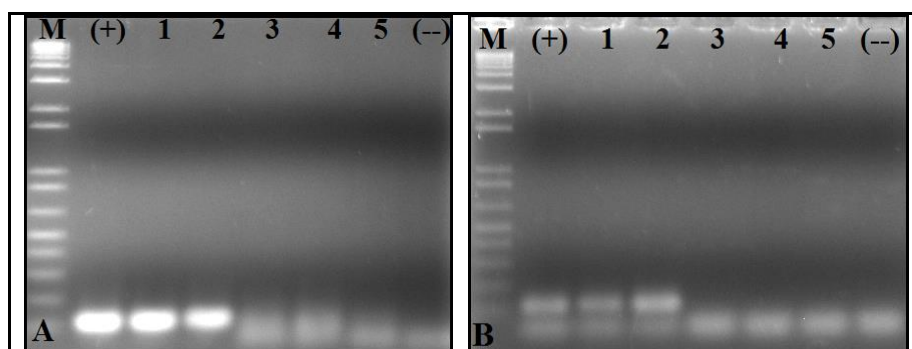


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose 2% para avaliação da especificidade dos primers desenhados para o gênero *Paraburkholderia* utilizando o DNA genômico de 6 estirpes: 1) Ppe5; 2) Ppe7; 3) 1172; 4) 141; 5) 139; (+) **Ppe8^T** e (-) controle negativo, e os primers A) Pt8C14 e B) C3641.

Para as estirpes de *G. diazotrophicus* foram testados os seguintes pares de primers Gd5C4525 (143 pb) e Gd5C70 (188 pb) desenhados a partir do genoma da estirpe **Pal5^T**. Além da Pal5^T foi utilizado o DNA das estirpes PR-1, PR34, PRC1, PSP19 e 17R⁻² nas reações de PCR. A Figura 17 mostra que houve amplificação de um fragmento de tamanho esperado para todas as estirpes quando foi utilizado os primers Gd5C4525. O par de primer Gd5C70 se mostrou mais específico, uma vez que, não amplificou o fragmento de DNA das estirpes PR34, PSP19, 17R⁻². A estirpe PRC1 foi isolada do Capim-camerum (REIS et al., 1994) e todas as outras foram isoladas de cana-de-açúcar. Embora a análise de similaridade do gene 16S e árvore filogenética mostrem que as estirpes Pal5^T, PR-1, PR34 e PSP19 são

próximas entre si (Figura 47 e 48D, Anexo J) o dendograma gerado pelo perfil BOX-PCR, mostra que podem ser um pouco mais distante filogeneticamente (Figura 45D e 46, Anexo I).

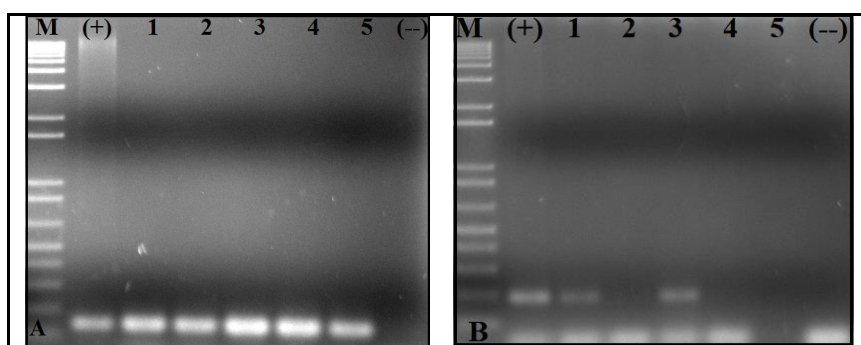


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose 2% para avaliação da especificidade dos primers desenhados para a estirpe Pal5^T *G. diazotrophicus* utilizando o DNA genômico de 6 estirpes: 1) PR-1; 2) PR34; 3) PRC1; 4) PSP19; 5) 17R⁻²; (+) Pal5^T e (-) controle negativo, e os primers A) Gd5C4525 e B) Gd5C70.

No caso dos primers selecionados em nível de espécie para a estirpe CbAmc ocorreu ampliações específicas para as estirpes Ym6, YA95, YS58, YA14 e Aam da espécie *N. amazonense* testadas (Figura 18). No entanto, nenhuma dessas estirpes foi isolada da planta de cana-de-açúcar (Tabela 4). O dendogramada (Figura 45E e 46, Anexo I) a partir da BOX-PCR mostrou a Ym6 e a YA14 bem próximas a CbAmc, o que também pode ser observado na árvore filogenética (Figura 47 e 48E, Anexo J) construída com a sequência do gene 16S rDNA dessas estirpes.

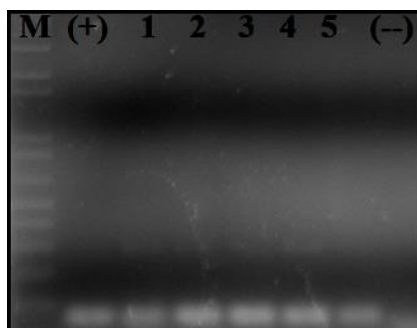


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 2% para avaliação da especificidade dos primers desenhados para estirpe CbAmc de *N. amazonense* utilizando o DNA genômico de 6 estirpes: 1) Ym6; 2) YA95; 3) YS58; 4) YA14; 5) Aam15; (+) CbAmc e (-) controle negativo, e os primers NaCbCgyrA.

Diversos autores têm buscado a validação de primers desenhados em nível de estirpe, no entanto, grande parte dos primers desenhados e testados não foi realmente estirpe-específico (BOA SORTE, 2013; STETS, 2013) isso mostra que uma análise de seleção utilizando o DNA de diferentes estirpes além da estirpe alvo é sempre necessária. Para selecionar um par de primer, para quantificar a população da bactéria *Azospirillum lipoferum* estirpe CRT1 na rizosfera de plantas de milho, Couillerot et al. (2010) testaram o DNA de 35 bactérias sendo 15 estirpes da mesma espécie *A. lipoferum*, 10 espécies dentro do gênero *Azospirillum* spp. e outras 10 bactérias das espécies *Pseudomonas fluorescens*, *Agrobacterium tumefaciens* e *Rhizobium etli*. Faleiro et al. (2013) desenharam primers para quantificação por qPCR da estirpe FP2 de *A. brasilense* em raízes de milho e utilizaram o valor Ct, acima, e a temperatura de Melting (*Tm*), abaixo, do encontrado para a estirpe alvo, como pré-requisitos

para validação dos primers. Os testes foram realizados utilizando o DNA genômico de 13 espécies bacterianas, a maioria pertencente ao gênero *Herbaspirillum* spp. Pereira et al. (2014) também selecionaram um entre os dois pares de primers desenhados para a *H. seropedicae* estirpe SmR1, diretamente por meio de valores de Ct e da Tm resultantes das reações de qPCR, com o DNA de 13 espécies bacterianas incluindo a estirpe alvo. Stets et al. (2015) desenhou primers para a quantificação da estirpe FP2 de *A. brasilense* em raízes de trigo, e dos 10 primers desenhados foram selecionados apenas 5 após o teste com 14 bactérias, 10 da mesma espécie e 4 do mesmo gênero da estirpe alvo, dentre os primers selecionados, três foram estirpe-específicos, um espécie-específico e o outro global (desenhado com base na sequência do gene 16S rDNA).

Todos esses autores utilizaram estratégias diferentes para seleção e validação de primers. No entanto, no presente estudo ficaria inviável utilizar um número maior de bactérias e/ou até mesmo avaliação dos primers diretamente por qPCR, uma vez que, foram desenhados mais de um par de primer para cada uma das cinco estirpes do inoculante. Um resumo dos resultados para as avaliações dos primers em nível de estirpe e espécie podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 7. Similaridade na sequência do gene 16S rDNA das estirpes do inoculante para cana-de-açúcar com outras estirpes dentro da mesma espécie.

<i>H.r.</i>	<i>S</i> (%)	<i>H.s.</i>	<i>S</i> (%)	<i>P.t.</i>	<i>S</i> (%)	<i>G.d.</i>	<i>S</i> (%)	<i>N.a.</i>	<i>S</i> (%)
HCC103	-	HRC54	-	Ppe8^T	-	Pal5^T	-	CbAmc	-
M1	100,00	ZAE67 ^T	99,92	Ppe5	100,00	PR-1	100,00	Ym6	99,69
M4 ^T	100,00	HRC80	100,00	Ppe7	100,00	PR34	100,00	YA95	99,61
M5	100,00	HCC102	99,39	117	95,77	PRC1	99,92	YA14	99,69
M6	100,00	HS4	100,00	141	95,62	PSP19	100,00	Aam15	98,76
HRC52	99,48	ZAE94	99,92	139**	95,38	17R ⁻²	99,85	HCC103*	77,49
CbAmc*	77,45	Pal5 ^T *	77,16			HRC54*	77,24		

H.r.) *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; *H.s.*) *H. seropedicae*; *P.t.*) *Paraburkholderia tropica*; *G.d.*) *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *N.a.*) *Nitrospirillum amazonense*. *Estirpe de bactéria de outra espécie usada como outgroup. **Estirpe pertencente a espécie *Paraburkholderia vietnamensis*. *S*- Similaridade.

5.3 Primers Selecionados

Os primers considerados mais específicos para amplificar o DNA alvo das espécies bacterianas que compõem o inoculante para cana-de-açúcar estão listados na Tabela 9 e o tamanho do fragmento amplificado na Figura 19. A quantidade dos reagentes e condições determinantes para o êxito da amplificação por PCR e qPCR são mostrados na Tabela 10.

A concentração do íon Mg²⁺ nas reações de PCR é um fator que frequentemente precisa de ajustes (HILL & STEWART, 1992; AZEVEDO et al., 2003). O íon Mg²⁺ é fundamental para a atuação da DNA polimerase, no entanto, ele pode ligar-se a moléculas de ácidos nucleicos, aos primers, a dNTPs e/ou ao EDTA, e dessa forma, não atuar como cofator da enzima DNA polimerase (HILL & STEWART, 1992). Hill & Stewart (1992) mostraram que o aumento na concentração do Mg²⁺ pode melhorar a eficiência de amplificação por parte da DNA polimerase, porém, em excesso o Mg²⁺ pode ocasionar a formação de *dímeros de primers*. Recomenda-se que a concentração de MgCl₂ na reação de PCR esteja entre 0,5-3,0 mM (AZEVEDO et al., 2003). Para os primers desenhados nesse trabalho a quantidade utilizada nas reações de PCR ficou entre 2-3 mM (Tabela 10).

Para aumentar a eficiência de amplificação da reação de PCR podem ser utilizados solventes orgânicos tais como: formamida, glicerol, polietileno glicol (PEG) ou sulfóxido de dimetilo (DMSO). Esses reagentes melhoram a especificidade dos primers na PCR auxiliando na amplificação de produtos específicos (HILL & STEWART, 1992; MCPHERSON &

MØLLER, 2006). Hill & Stewart (1992) sugerem que esses reagentes não devem ultrapassar 5% (v:v) do volume final da reação, uma vez que, acima dessa concentração eles também podem inibir a ação da DNA polimerase. No entanto, McPherson & Møller (2006) mostram que, de acordo com o reagente, uma maior concentração pode ser utilizada e no caso do glicerol e do PEG as concentrações podem chegar até 15% sem inibir a PCR.

O Tween[®] 20 (detergente não iônico) foi usado como solvente orgânico para aumentar a eficiência de amplificação para os pares de primers nesse trabalho, e no caso do par de primers Hs54CphageEndo desenhado para *H. seropedicae* estirpe HRC54, a concentração de 0,16% (v:v) foi a maior utilizada dentre os iniciadores testados. De acordo Bachmann et al. (1990) o Tween[®] 20 pode ser usado nas amostras de 0,1 a 2,5% (v:v) sem causar inibição na PCR. O DMSO também foi utilizado para alguns primers, no entanto, a amplificação usando Tween[®] 20 mostrou que as bandas no gel de agarose ficaram mais definidas, provavelmente devido a melhor amplificação nessa condição.

Apenas dois pares primers selecionados, uma para a estirpe HCC103 (Hr103C4062) e outro para a Pal5^T (Gd5C4525) têm temperatura de anelamento acima de 60° C (Tabela 10). De acordo Norlan et al. (2014) a temperatura de anelamento para PCR deve ser de 55±5 °C, e 59±2 °C para qPCR, essa condição combinada com a amplificações de fragmentos de DNA menores que 200 pares de base pode melhorar a eficiência de quantificação. No presente trabalho o tamanho dos fragmentos amplificados para os primers selecionados variou de 68 a 197 pb, em sua maioria acima de 100 pb. Para qPCR é ideal que os primers desenhados amplifiquem fragmentos de tamanhos de 50 a 150 pb (SIGMA[®], 2008; LIFE[®], 2012). No entanto, McPherson & Møller (2006) destacam que esse tamanho pode variar de 200 a 300 pb.

A estratégia utilizada nesse trabalho para desenhar os primers para as estirpes que compõem o inoculante para cana-de-açúcar possibilitou a obtenção de pares de primers espécie-específicos, e três pares se mostraram provavelmente ser estirpe-específicos, são eles: o Hr103C4062 para a estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans*, Figura 14D, e os Pt8C14 e Pt8C3641 para a estirpe Ppe8^T de *P. tropica*, Figura 16A. No entanto, apesar de alguns pares de primers mostrarem amplificação para várias estirpes, como por exemplo, Ppe5, Ppe7 e Ppe8^T, uma breve análise dos resultados do perfil BOX-PCR, da árvore filogenética e similaridade das sequências 16S rDNA sugere que essas estirpes são muito próximas filogeneticamente e podem ser a mesma.

No geral cada par de primer desenhado foi testado com 30 amostras do DNA de diferentes bactérias, incluindo a estirpe alvo, sendo cinco pertencentes às bactérias do inoculante com mais 25 fornecidas pelo CRB-JD (Figuras 33-39, Anexos). Esse total de amostras permitiu fazer uma boa avaliação da especificidade dos primers desenhados em nível de espécie e estirpe.

Tabela 8. Resultados dos testes de especificidade dos primers desenhados para as estirpes de bactérias do inoculante para cana-de-açúcar.

Espécies	Estirpes	Primers			
		Hr103C1870	Hr103C3867	Hr103C3868	Hr103C4062
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	HCC103*	+	+	+	+
	M1	-	-	-	-
	M4 ^T	-	+	+	-
	M5	-	-	-	-
	M6	+	+	+	-
	HRC52	-	-	-	-
<i>Paraburkholderia tropica</i>	Estirpes	Pt8C14		Pt8C3641	
	Ppe8^{T*}	+		+	
	Ppe5	+		+	
	Ppe7	+		+	
	117	-		-	
	141	-		-	
<i>Paraburkholderia vietnaminensis</i>	139	-		-	
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Estirpes	Gd5C4525		Gd5C70	
	Pal5^{T*}	+		+	
	PR-1	+		+	
	PR34	+		+	
	PRC1	+		+	
	PSP19	+		-	
	17R ⁻²	+		-	
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	Estirpes	NaCbCgyrA			
	CbAmc*	+			
	Ym6	+			
	YA95	+			
	YS58	+			
	YA14	+			
Aam15	+				
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Estirpes	Hs54CphageEndo			
	HRC54*	+			
	ZAE67 ^T	+			
	HRC80	+			
	HCC102	-			
	HS4	+			
ZAE94	+				

(+) amplifica, (-) não amplifica.* estirpe alvo.

Vale destacar que muitas das estirpes bacterianas testadas, cujo DNA genômico gerou um fragmento amplificado pelos primers selecionados, não foram isoladas da planta de cana-de-açúcar, como pode ser observado na Tabela 4. Assim, o monitoramento das bactérias do inoculante a partir de amostras de DNA extraídas dos tecidos de cana-de-açúcar, utilizando esses primers na PCR convencional ou qPCR poderá estar quantificando exclusivamente as estirpes alvo. No entanto, é tamanha a diversidade de bactérias associadas às plantas de *Saccharum* ssp. (YEOH et al., 2015; SOUZA et al., 2016) pertencentes aos gêneros estudados nesse trabalho, que foram ou não isoladas, e não tiveram o DNA genômico testado para com os primers aqui selecionados.

Tabela 9. Primers selecionados para PCR utilizando DNA das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar.

Espécies	Primers	Sequências (5'-3')	Amplicon (pb)
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	Hr103C1870F	CATCACGACCTTCGTTGGCG	112
	Hr103C1870R	GCCGAGTCCGTTGATCTGGT	
	Hr103C3867F	TGGATGTCATGCTGCCTCGC	197
	Hr103C3867R	GATTTGCCGGTGCTTGACGG	
	Hr103C3868F	TGGAGCTTGAGTACGCGACG	117
	Hr103C3868R	GCAGCAGTTCGTAAGTGGCG	
	Hr103C4062 F	TCCATCGCATCCTCCACTGC	188
Hr103C4062 R	ACGGGCGGTACAGTTTGCGC		
<i>Paraburkholderia tropica</i>	Pt8C14F2	GATGCCTTTGCTTCCGGTGC	111
	Pt8C14R2	CCGCTAGGGCTCCCTAATCC	
	Pt8C3641F	ATCGAATATCGCCGGGTCGG	125
	Pt8C3641R	AGACCGAGACGTTTCGCAGAG	
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Gd5C70F2	CACCGGGACAGGATTGGACC	188
	Gd5C70R2	TATGATGCGCCCGTCTACCC	
	Gd5C4525F2	GCCTTCCCCAAGGTGCTA	143
	Gd5C4525R2	TGGTCCCAGTCGAAACCGC	
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	54CphageEndoF	ATTCACGCTCCCTCGACGAC	186
	54CphageEndoR	CGGGCTTGCGGTTGGTGACG	
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NaCbCgyrAF	GCTGTCTGGATTTACCAAC	68
	NaCbCgyrAR	ATTCACCCTCTTCCTCCAG	

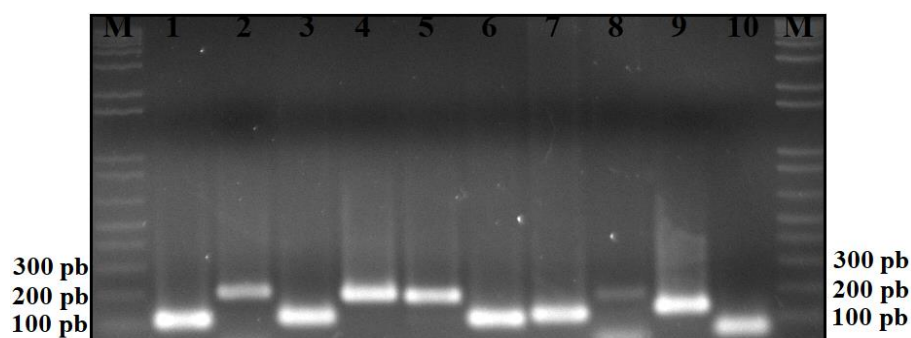


Figura 19. Gel de agarose 2% com os produtos de PCR amplificados a partir dos primers selecionados. M- marcador molecular; 1) **Hr103C1870**, 112 pb; 2) **Hr103C3768**, 197 pb; 3) **Hr103C3868**, 117 pb; 4) **Hr103C4062**, 188 pb; 5) **Hs54CphageEndo**, 186 pb; 6) **Pt8C14**, 111 pb; 7) **Pt8C3641**, 125 pb; 8) **Gd5C70**, 188 pb; 9) **Gd5C4525**, 143 pb; e 10) **NaCbCgyrA** 68 pb.

Tabela 10. Condições ajustadas para a amplificação por PCR e qPCR utilizando os primers selecionados. Volume final da PCR e qPCR, respectivamente igual a, 25 e 15 µL.

Espécies	Iniciadores	PCR			qPCR				Condições Anelamento	
		Primer (10µM)	MgCl ₂ (50mM)	Tween 20 (2%)	Primer (10µM)	H ₂ O PCR	Tween 20 (2%)	Sybr Green	Temperatura (°C)	Tempo (s)
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	Hr103C1870F Hr103C1870R	1,00	1,25	-	0,30	1,90	-	7,50	60	45
	Hr103C3867F Hr103C3867R	1,00	1,25	-	-	-	-	7,50	60	45
	Hr103C3868F Hr103C3868R	0,50	1,25	1,00	0,30	1,30	0,60	7,50	60	45
	Hr103C4062 F Hr103C4062 R	0,50	1,00	0,50	0,25	1,70	0,30	7,50	63	45
	Pt8C14F2 Pt8C14R2	1,00	1,50	-	0,30	1,90	-	7,50	60	45
	Pt8C3641F Pt8C3641R	0,50	1,25	0,50	0,30	1,90	-	7,50	60	45
	Gd5C70F2 Gd5C70R2	1,00	1,25	-	0,30	1,90	-	7,50	60	45
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Gd5C4525F2 Gd5C4525R2	0,50	1,00	0,50	0,50	1,20	0,30	7,50	63	45
	NaCbCgyrAF NaCbCgyrAR	1,00	1,25	-	0,90	0,70	-	7,50	60	45
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	54CphageEndoF 54CphageEndoR	0,50	1,25	2,00	0,30	0,80	1,20	7,50	60	45

5.4 Primers selecionados para qPCR

Após os testes de especificidade em nível de espécie e estirpe, feitos por meio das reações de PCR, foram selecionados 5 pares de primers para serem utilizados nas reações de qPCR (Tabela 11). Para tal, todos esses primers foram avaliados quanto a sensibilidade, eficiência de amplificação e curva de dissipação (Melting). Os principais critérios para escolher os melhores primers foram quanto a temperatura de anelamento e a sensibilidade para amplificação do fragmento de DNA alvo. Embora o par de primer Hr103C4062 seja estirpe-específico para a estirpe HCC103 ele não foi escolhido, pois, a temperatura de anelamento foi de 63 °C e nos testes de qPCR ele possui eficiência de amplificação maiores que 100% (resultados não mostrados), enquanto que para a mesma estirpe, os primers Hr103C1870, ainda que não estirpe-específico em razão de amplificar o DNA alvo no genoma da estirpe M6, funciona com temperatura de anelamento a 60 °C, além de possuir eficiência de amplificação próxima a 100% em todos os ensaios (Tabela 13). Quanto à escolha do par de primer Gd5C4525, que funciona com temperatura de anelamento a 63 °C, ocorreu em função de ter melhor sensibilidade do que os primers Gd5C70, que possuem temperatura de anelamento de 60 °C, porém com baixíssima sensibilidade (Figura 42, Anexos B).

Tabela 11. Primers selecionados para a quantificação das bactérias do inoculante para cana-de-açúcar utilizando por meio das reações de qPCR.

Espécie	Primers	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	Hr103C1870F Hr103C1870R	CATCACGACCTTCGTTGGCG GCCGAGTCCGTTGATCTGGT	112
<i>Paraburkholderia tropica</i>	Pt8C14F2 Pt8C14R2	GATGCCTTTGCTTCCGGTGC CCGCTAGGGCTCCCTAATCC	111
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Gd5C4525F2 Gd5C4525R2	GCCTTCCCCAAGGTCGCTA TGGTCCCAGTCGAAACCGC	143
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	54CphageEndoF 54CphageEndoR	ATTCACGCTCCCTCGACGAC CGGGCTTGGCGTTGGTGACG	186
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	NaCbCgyrAF NaCbCgyrAR	GCTGTCGGATTTCACCAAC ATTCACCCTCTTCCTCCAG	68

5.4.1 Sensibilidade

A sensibilidade refere-se à capacidade que cada par de iniciador tem para amplificar o DNA alvo. De acordo com Nutz et al. (2011) o limite de detecção ou sensibilidade é a concentração mínima de DNA ou número de células que sempre gera resultados positivos em pelo menos 95% das réplicas avaliadas. A quantidade de DNA genômico utilizado na qPCR variou de 10^3 a 10^{-4} ng $15 \mu\text{L}^{-1}$ de amostras, ou seja, de 67 a $0,0000067 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Para a qPCR é recomendado que no volume final da reação tenha entre 10 a 50 ng de DNA, sendo que a concentração máxima não deve ultrapassar $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (SIGMA®, 2008; EUROGENTEC®, 2017). Maiores quantidades de DNA podem subestimar a quantificação do fragmento alvo, bem como, trazer contaminantes inibidores para reação (LIFE®, 2012). Os primers Hs54CphageEndo e NaCbCgyrA, desenhados para as estirpes HRC54 e CbAmc, tiveram os seus valores de Ct indeterminados ao final de 40 ciclos na qPCR, quando foram utilizadas amostras na concentração de $67 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Os primers Hr103C1870, Hs54CphageEndo, Pt8C14 e Gd5C4525 tiveram sensibilidade para amplificar até $0,000067 \text{ ng}$ de DNA por μL (Tabela

12 e Figura 18). O par de primer de maior sensibilidade foi o NaCbCgyrA para estirpe CbAmc, que mostrou amplificação para uma quantidade de DNA de 0,0000067 ng μL^{-1} .

A sensibilidade de cada par de primer pode ser afetada por diversos fatores, como por exemplo, o número de cópias do gene alvo ou da região do genoma a ser amplificado. Diversos autores também têm mostrado que poder haver uma grande variação quanto à sensibilidade de acordo com a região a ser amplificar. Boa Sorte (2013), utilizando iniciadores para o gene 16 rDNA, mostrou que ocorreu amplificação mesmo quando foi utilizado 5.10^{-10} ng μL^{-1} de DNA genômico da bactéria de interesse. Geralmente o gene 16S rDNA tem várias cópias no genoma o que facilita a amplificação mesmo utilizando baixas quantidade de DNA alvo. De acordo Couillerot et al. (2010) os primers que amplificam o DNA da *Azospirillum lipoferum* CRT1 tem sensibilidade de até 60 fg o equivalente a 19 cópias ou células dessas bactérias em amostras desconhecidas. Segundo Pereira et al. (2014) os melhores primers para quantificar a bactéria *H. seropedicae* estirpe SmR1 tiveram sensibilidade de até 60,3 fg ou $6,03.10^{-5}$ ng μL^{-1} correspondentes a 10^1 cópias do genoma alvo em solução.

Os primers desenvolvidos para o presente trabalho foram todos desenhados a partir de uma região única no genoma das estirpes que compõem o inoculante para cana-de-açúcar, o número de cópias amplificadas pode ser convertido para número de genomas ou células bacterianas. Conforme Anonymous (2015) o valor Ct encontrado para a massa de DNA empregada na reação de qPCR deve ser transformada em cópias ou ng do DNA alvo amplificado, não podendo ser inferior ao limite de detecção. Kralik & Ricchi (2017) propõem que deva ser adotado para o limite de quantificação um coeficiente de variação (CV) menor que 25% para as amostras de maior diluição usadas em triplicatas. Como podem ser observados na Tabela 12, os limites de quantificação por qPCR para as bactérias que compõem o inoculante são maiores que os limites de detecção ou sensibilidade, por exemplo, para a estirpe CbAmc a concentração de DNA utilizada na qPCR, 10^{-4} ng $15\mu\text{L}^{-1}$, é menor que $1,3.10^1$ cópias do fragmento alvo amplificados.

Tabela 12. Número de cópias do fragmento alvo detectado por qPCR usando primers espécie-específicos e o DNA genômico das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar.

DNA (ng/ μL)	Número de cópias do fragmento de DNA alvo				
	HCC103	HRC54	Ppe8 ^T	Pal5 ^T	CbAmc
$6,7.10^1$	$2,005.10^8$	-	$1,0462.10^8$	$2,2813.10^8$	-
$6,7.10^0$	$2,005.10^7$	$1,6499.10^7$	$1,0462.10^7$	$2,2813.10^7$	$1,2574.10^7$
$6,7.10^{-1}$	$2,005.10^6$	$1,6499.10^6$	$1,0462.10^6$	$2,2813.10^6$	$1,2574.10^6$
$6,7.10^{-2}$	$2,005.10^5$	$1,6499.10^5$	$1,0462.10^5$	$2,2813.10^5$	$1,2574.10^5$
$6,7.10^{-3}$	$2,005.10^4$	$1,6499.10^4$	$1,0463.10^4$	$2,2813.10^4$	$1,2575.10^4$
$6,7.10^{-4}$	$2,006.10^3$	$1,6500.10^3$	$1,0460.10^3$	$2,2810.10^3$	$1,2570.10^3$
$6,7.10^{-5}$	$2,006.10^2$	$1,6500.10^2$	$1,0500.10^2$	$2,2800.10^2$	$1,2600.10^2$
$6,7.10^{-6}$	-	-	-	-	$1,3000.10^1$

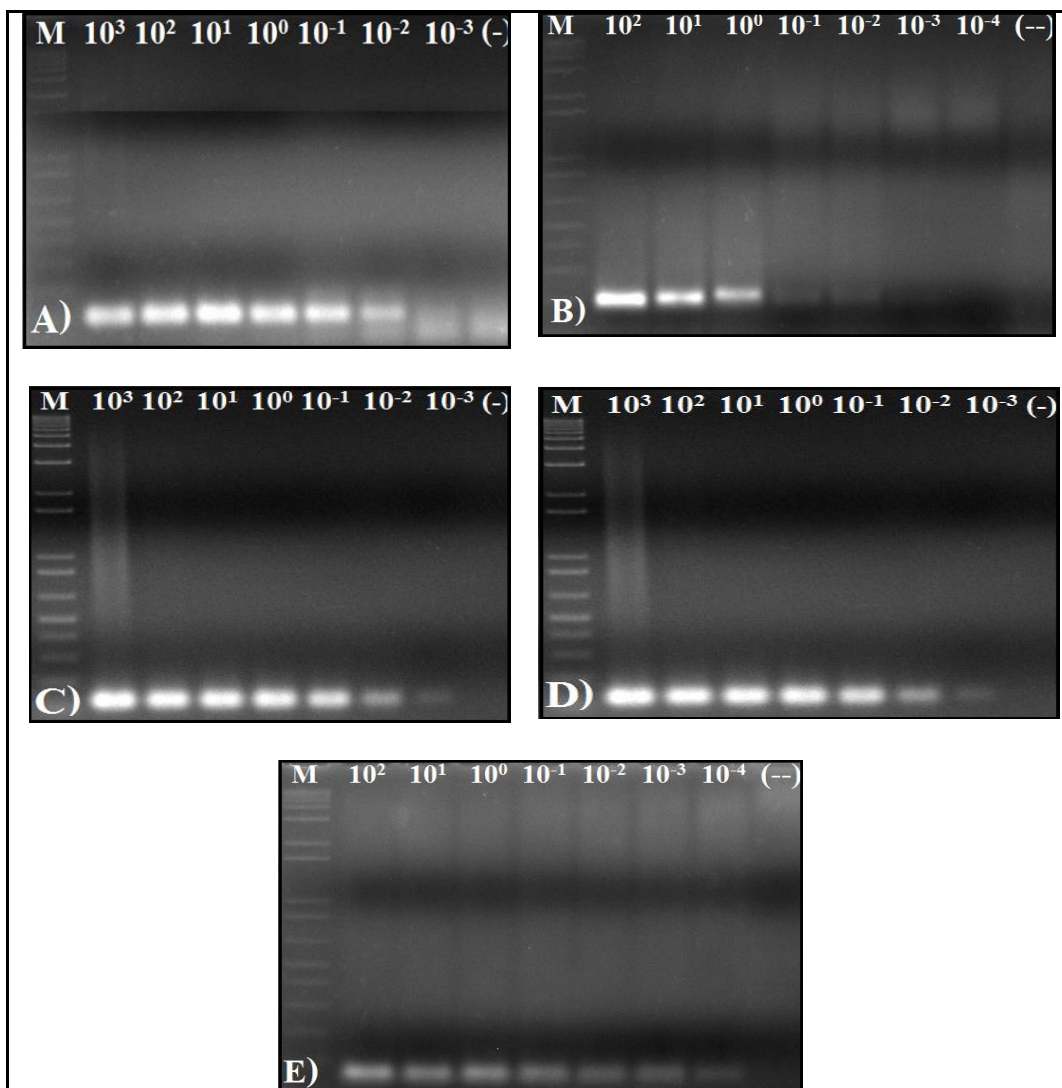


Figura 20. Gel de agarose 2% com o produto da qPCR para as curvas com diluições seriadas do DNA genômico das bactérias do inoculante para cana-de-açúcar. Primers utilizados: A) Hr103C1870 para estirpe HCC103, B) Hs54CphageEndo para a estirpe HRC54, C) Pt8C14 para estirpe Ppe8^T, D) Gd5C4525 para estirpe Pal5^T e E) NaCbCgyrA para a estirpe CbAmc.

5.4.2 Eficiência de amplificação e coeficiente de determinação

A eficiência de amplificação (E) na qPCR deve estar na faixa de 0 a 1 ou, de 0 a 100%, quando o valor E é igual a 1, o número de fragmentos do DNA alvo amplificados é duplicado a cada ciclo (KRALIK & RICCHI, 2017). Segundo esses autores a máxima eficiência é difícil de ser alcançada durante toda a PCR. Existem faixas aceitáveis para os valores da E e para o coeficiente de determinação (R^2), os valores satisfatórios para E estão entre 90 e 110% com o *Slope* (inclinação da reta), entre 3,10-3,58 e o R^2 com valores maiores que 0,985 (JOHNSON et al., 2013; NORLAN et al., 2014).

Os valores da E dos primers selecionados para qPCR nesse trabalho são mostrados na Tabela 13. Nos testes realizados houve primers que apresentaram valores da E e do R^2 dentro da margem de aceitação, o par de primer Hr103C1870 foi o que apresentou melhor valor de eficiência de amplificação e do coeficiente de determinação em todos os testes. Os outros primers Hs54CphageEndo, Pt8C14, Gd5C4525 e NaCbCgyrA apresentaram os parâmetros da E e R^2 excelentes em pelo menos um dos ensaios (Tabela 13).

5.4.3 Curvas Melting

A curva de Melting na qPCR pode ser utilizada como um indicador da especificidade dos primers, uma vez que, a presença de um único pico com temperatura maior que 80 °C em todas as reações sugere que foi amplificado apenas um fragmento de DNA (NORLAN et al., 2014). Estruturas secundárias indesejáveis ou *dímeros de primers*, geralmente podem ser detectadas quando o valor E da qPCR são maiores do que 120% (NORLAN et al., 2014).

Para avaliar a especificidade dos primers testados por qPCR, no presente trabalho foram observadas as curvas de Melting geradas a partir do DNA das amostras diluídas em série de 67 a $6,7 \cdot 10^{-6}$ ng μL^{-1} . Todas as curvas para os pares de primer testados mostram apenas único pico principal, o que determina a especificidade dos primers selecionados nesse trabalho (Figura 22). A formação de dímeros de primers no final da amplificação para as amostras mais diluídas poder levar o surgimento de alguns pequenos picos adicionais na curva de Melting, no entanto, de maneira geral, no caso dos primers testados, isso não foi significativo a ponto de inviabilizar a utilização do primers para a quantificação das bactérias do inoculante.

Tabela 13. Eficiência de amplificação dos primers para qPCR avaliada por meio de dois kits comerciais de SYBR® Green.

Primers (F/R)	Kit comercial	Ensaios qPCR	Ct médio para os pontos das curvas padrão								R ²	Slope	Eficiência (%)
			1	2	3	4	5	6	7	8			
Hr103C1870	I	1°	12,7	15,2	18,6	22,3	25,4	28,9	32,1	-	0,996	3,2459	103
		*2°	12,8	16,0	19,6	23,4	26,2	29,3	31,6	-	0,998	3,3382	99
		3°	12,6	16,7	20,2	25,4	27,3	30,6	32,6	-	0,983	3,3729	97
		Média	12,7	15,9	19,4	23,7	26,3	29,6	32,1	-	0,992	3,3190	100
	II	1°	-	15,7	17,7	21,4	24,9	27,9	31,2	33,7	0,996	3,1864	105
		2°	-	22,7	25,9	29,4	32,8	36,3	39,5	-	0,999	3,3960	97
Média		-	19,2	21,8	25,4	28,8	32,1	35,3	-	0,997	3,2912	101	
Hs54CphageEndo	I	1°	11,9	15,0	18,6	21,4	24,7	-	-	-	0,999	3,1942	106
		*2°	13,7	16,5	22,3	24,5	28,37	30,67	30,8	-	0,983	3,5073	92
		3°	-	21,3	25,5	30,9	36,9	37,8	39,4	-	0,928	3,2855	101
		Média	12,8	17,6	22,1	25,6	29,9	34,2	35,1	-	0,970	3,3290	99
	II	1°	-	25,6	27,2	30,8	34,2	36,2	38,3	-	0,987	2,6817	135
		2°	-	22,6	24,65	28,6	32,7	34,3	36,9	-	0,984	2,9918	115
Média		-	24,1	25,9	29,7	33,4	35,2	37,6	-	0,985	2,8368	125	
Pt8C14	I	1°	-	27,8	31,8	35,5	36,37	37,8	-	-	0,941	2,9289	120
		*2°	-	15,9	18,9	22,6	25,9	28,7	32,2	-	0,999	3,2566	102
		Média	-	21,8	25,35	29,0	31,25	33,25	-	-	0,970	3,0928	111
	II	1°	-	23,8	25,3	28,5	32,8	36,5	39,3	-	0,986	3,2998	100
		2°	-	21,7	24,6	27,8	31,6	34,6	38,1	-	0,999	3,3038	100
		Média	-	22,75	24,9	28,1	32,2	35,5	38,7	-	0,992	3,3018	100
Gd5C4525	I	1°	-	20,7	25,5	30,0	35,4	36,6	39,2	39,4	0,928	3,2157	104
		*2°	15,5	19,4	23,6	29,0	31,0	34,1	36,5	-	0,973	3,3930	97
		3°	-	22,8	28,0	32,5	36,9	38,3	39,4	-	0,936	3,3864	97
		4°	-	18,4	23,3	28,8	31,9	33,9	36,0	39,1	0,961	3,3066	100
		Média	15,5	20,3	25,1	30,0	33,8	35,7	37,7	39,2	0,949	3,3254	99
	II	1°	-	23,7	23,7	27,2	31,4	35,0	39,4	-	0,960	3,3246	100
2°		-	25,3	28,7	31,8	35,1	37,8	-	-	0,998	3,1467	107	

		Média	-	24,5	26,2	29,5	33,2	36,4	39,4	-	0,979	3,2357	103	
NaCbgyrA	I	1°	4,8	14,0	18,9	23,6	27,2	31,1	36,2	-	0,997	4,3228	70	
		2°	-	15,8	19,9	23,3	29,1	30,7	33,8	37,3	0,986	3,5539	91	
		*3°	-	14,9	17,7	21,4	26,0	29,2	31,5	34,1	0,990	3,3193	100	
			Média	4,8	14,9	18,8	22,7	27,4	30,3	33,8	35,7	0,991	3,7320	87
	II	1°	-	20,0	20,9	24,1	26,9	30,8	34,9	37,4	0,996	3,4022	96	
		2°	-	22,7	25,0	28,1	30,8	34,1	36,9	38,9	0,998	2,8865	122	
		3°	-	29,2	31,2	35,1	37,7	39,2	39,5	-	0,980	2,6585	137	
		Média	-	23,9	25,7	29,1	31,8	34,7	37,1	38,1	0,991	2,9824	118	

I- Promega GoTaq[®]qPCR Master Mix.

II- Qiagen QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Kit.

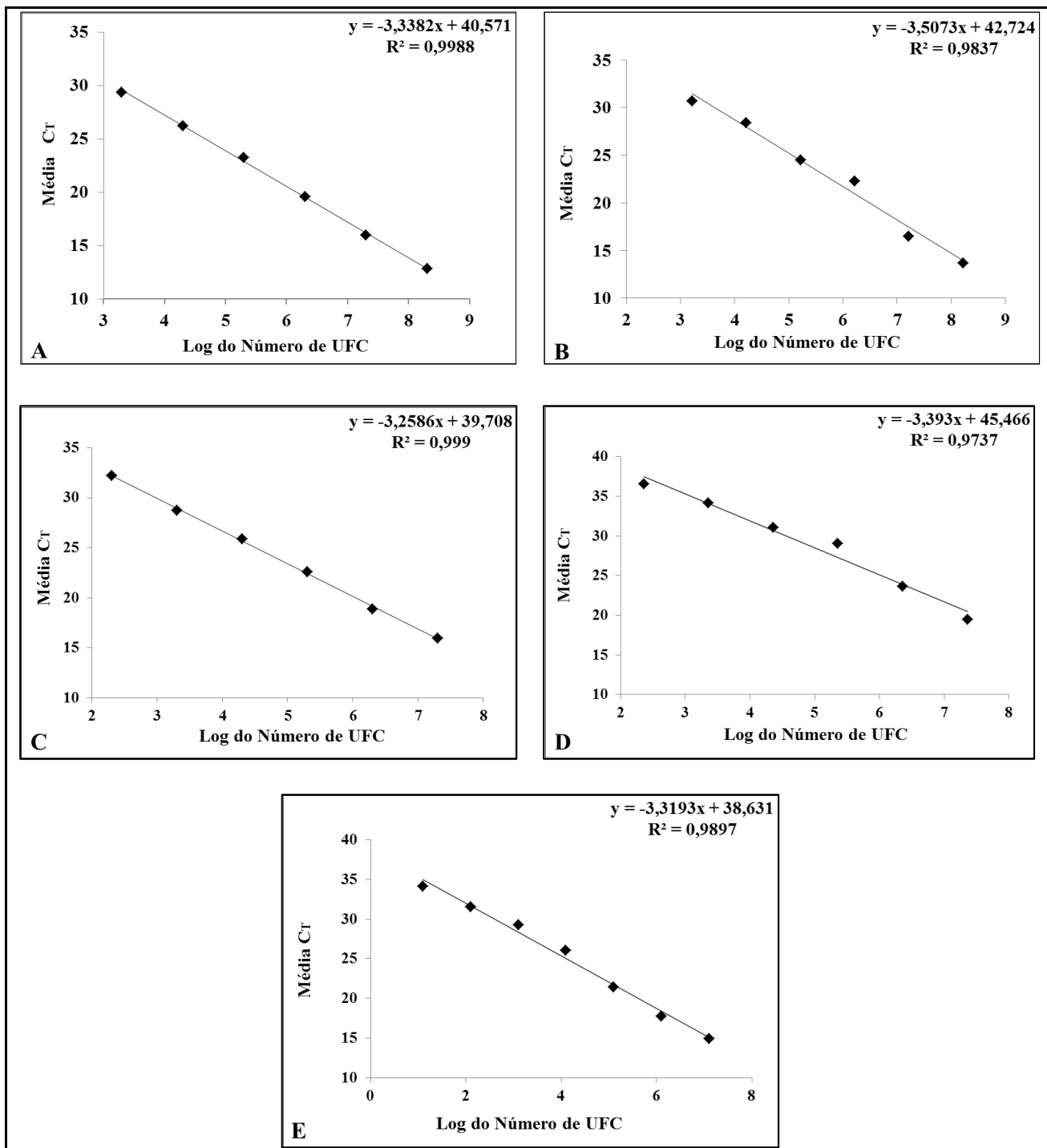


Figura 21. Curvas padrão dos primers: A) Hr103C1870, B) Hs54phageEndo, C) Pt8C14, D) Gd5C4525 e E) NaCbCgyrA.

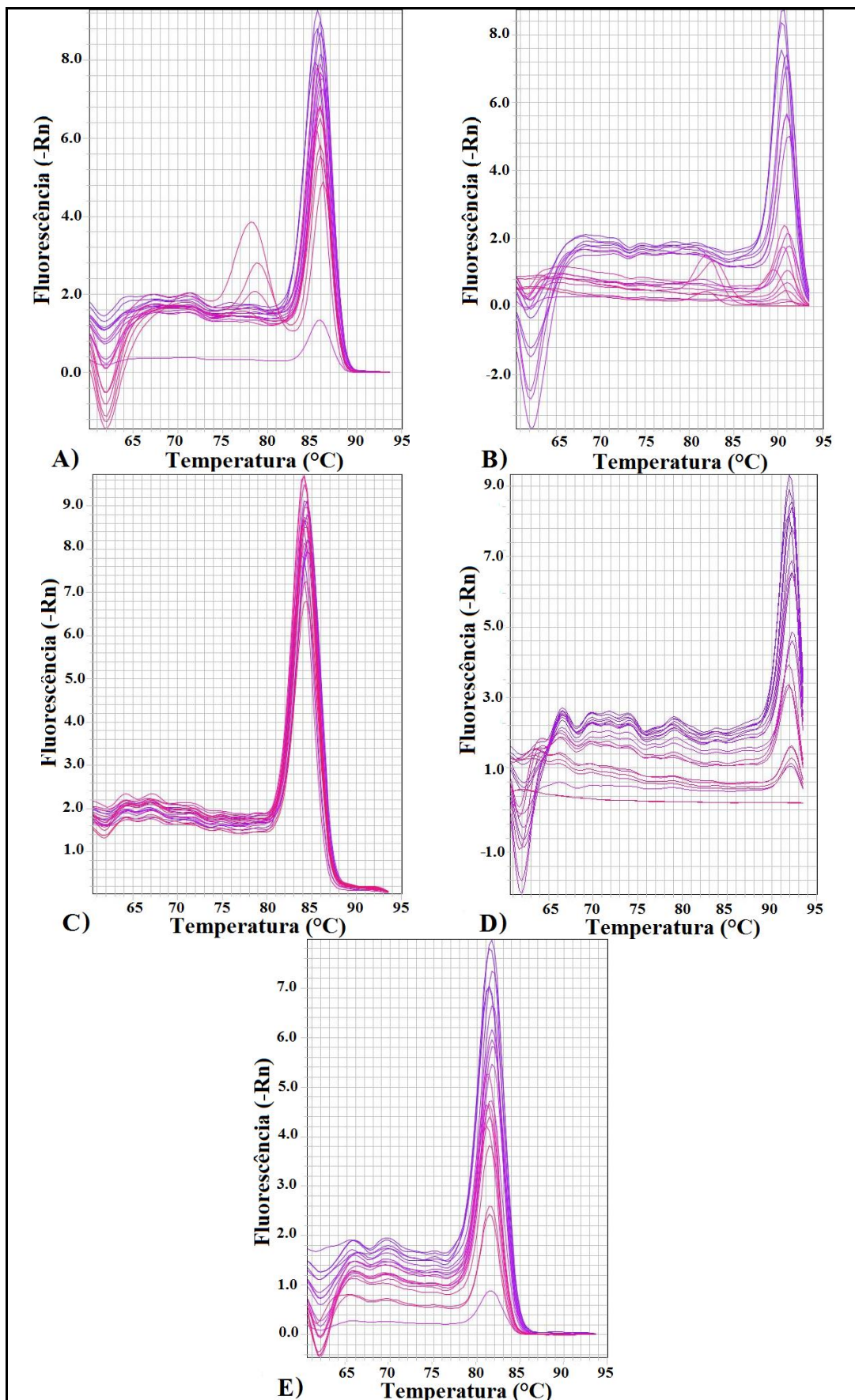


Figura 22. Curvas de Melting dos primers: A) Hr103C1870, B) Hs54phageEndo, C) Pt8C14, D) Gd5C4525 e E) NaCbCgyrA.

5.5 Contagem em Câmara de Neubauer Versus PCR em Tempo Real

A Câmara de Neubauer ou Câmara de contagem tem sido frequentemente utilizada para contagem de células por mL em amostras contendo bactérias diazotróficas para inoculação em diversas culturas, como por exemplo, sorgo (SANTOS, 2010), mamão (LIMA, 2010), milho (SPOLOAR et al., 2016). A capacidade de quantificação da técnica de qPCR usando os primers específicos para cada espécie bacteriana do inoculante foi comparada com a contagem de células utilizando a Câmara de Neubauer. Para tal, o DNA genômico das estirpes HCC103, HRC54, Ppe8^T, Pal5^T e CbAmc foi utilizado nas reações de qPCR. Os dados em log₁₀ n° células mL⁻¹ tanto das quantificações por qPCR como da contagem em Câmara de Neubauer (Tabela 24, Anexos E) foram submetidos a análise de variância (Tabela 14).

Tabela 14. ANOVA para os dados das quantificações pelo método da qPCR e Câmara de Neubauer.

Fatores	Gl	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Estirpes	4	2,1660	0,5415	8,526	0,0003*
Método	1	0,9257	0,9257	14,576	0,0011*
Estirpe*Método	4	4,1607	1,0401	16,377	0,0000*
Erro	20	1,2702	0,0635		
Total corrigido	29	8,52283			

CV% = 2,84
Média geral = 9,073
Número de observações = 30

**Existe significância dentro dos fatores observados.

A média geral das quantificações em log₁₀ do número de células mL⁻¹ mostrou que as contagens realizadas para as estirpes do inoculante foi maior por meio da Câmara de Neubauer do que pela PCR em Tempo Real (Tabela 15). No entanto, para as estirpes HRC54, Pal5^T e CbAmc não houve diferenças estatísticas entre os métodos de quantificação. Para a estirpe HCC103 observou-se maior número de células quantificadas via qPCR, estatisticamente diferente da observada por meio da Câmara de Neubauer. No caso da estirpe Ppe8^T a quantificação por qPCR mostrou menor número do que pela Câmara de Neubauer.

Tabela 15. Comparação entre as quantificações (log₁₀ do número células mL⁻¹) realizadas por meio da Câmara de Neubauer e PCR em Tempo Real.

Estirpe	Câmara de Neubauer	PCR em Tempo Real
HCC103	9,22± 0,11 Ba	9,74 ± 0,33 Aa
HRC54	9,41± 0,10 Aa	9,07 ± 0,61 Ab
Ppe8^T	9,55 ± 0,09 Aa	7,85 ± 0,09 Bc
Pal5^T	9,07 ± 0,18 Aa	8,75 ± 0,22 Ab
CbAmc	8,97 ± 0,10 Aa	9,07± 0,10 Ab
Média Geral	9,24 ± 0,24 A	8,89 ± 0,69 B

Letras maiúsculas e minúsculas diferentes representam diferenças significativas das médias entre e dentro dos métodos, respectivamente, conforme o teste de média Tukey ($P<0,05$).

Sabe-se que impurezas no material genômico pode inibir a eficiência da técnica de PCR (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). No processo de extração de DNA das estirpes Ppe8^T e Pal5^T com o kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega®, USA) observou-se

formação de viscosidade na amostra o que resultou em uma baixa relação A_{260nm}/A_{280nm} (resultados não mostrados). Lodhi et al. (1994) destacam que os polissacarídeos são bem visíveis no processo de extração do DNA pelo seu aspecto viscoso e pegajoso. Esse material possivelmente interferiu nas reações de qPCR, uma vez que, para as bactérias Ppe8^T e Pal5^T a quantificação por qPCR foi menor do que pela técnica Câmara de Neubauer. A contaminação das amostras de DNA por polissacarídeos é tema recorrente na literatura (FANG et al., 1992; BAUDRACCO-ARNAS, 1995; HAN et al., 2010; NUNES et al., 2011) e a presença de polissacarídeos nas amostras de DNA pode inibir a reação de PCR, supostamente da mesma forma a qPCR (SEGUNDO LODHI et al., 1994).

Segundo Abelho (2013) a contagem por meio da Câmara de Neubauer é rápida e pode fornecer informações quanto ao tamanho e morfologia dos microrganismos, no entanto, pode haver erros, principalmente, em decorrência da reprodutibilidade da aplicação de cada amostra na câmara de contagem, e da adsorção de bactérias às superfícies do vidro. Além disso, no caso de bactérias, há necessidade de usar amostras com concentração de células superior a 10^6 , e não é possível diferenciar as células vivas das mortas, o que poder ser um problema para quantificação. De acordo Lucarini et al. (2004) mesmo sem aglomeração de células bacterianas e excesso de ampliação do foco (microscópio) deve-se adotar um erro médio percentual de $5,2 \pm 0,4576$ para a contagem em Câmara de Neubauer.

Rodenbusch (2006) utilizou a contagem Câmara de Neubauer e a qPCR para quantificar o número de células/dose e unidades formadoras de placa/dose de três tipos comerciais de vacinas vivas contra a doença Marekem em aves, e não houve diferença estatística entre os métodos, embora esses parâmetros estivessem conforme aos indicados pelos fabricantes, a técnica de qPCR apresentou maior correlação com os valores fornecido pelas empresas.

5.6 Contagem por Microgota em Placa Versus PCR em Tempo Real

A contagem por Microgota em placa foi outro método utilizado para comparação com a quantificação por qPCR das bactérias do inoculante para cana-de-açúcar. Os resultados obtidos (Tabela 25, Anexos E) em \log_{10} do número de células mL^{-1} do meio cultivo comparando esses dois métodos foram submetidos a análise de variância (Tabela 16), e teste de comparação de médias Tukey (Tabela 17), ambos com $P < 0,05$.

Tabela 16. ANOVA para os dados das quantificações realizadas pelas técnicas de qPCR e contagem por Microgota em placa.

Fatores	GI	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Estirpes	4	7,2953	1,8238	10,542	0,0001**
Método	1	2,4083	2,4083	13,921	0,0013**
Estirpe*Método	4	8,6833	2,1708	12,548	0,0000**
Erro	20	3,4600	0,1730		
Total corrigido	29	21,8470			
CV% = 4,72					
Média geral = 8,81			Número de observações = 30		

**Existe significância dentro dos fatores observados.

Na comparação entre as técnicas de quantificação por qPCR e Microgota em placa a média geral mostrou um maior número de bactérias quantificadas pela qPCR. As estirpes HCC103 e HRC54 foram quantificadas em maior número pela qPCR, enquanto para a contagem das estirpes Ppe8^T e CbAmc não houve diferença significativa pelas duas formas de quantificação comparadas. A bactéria Pal5^T teve um menor número de células mL^{-1}

quantificadas pela qPCR do que a contagem por Microgota em placa, Tabela 17, significativo a 5%.

Tabela 17. Quantificações (\log_{10} do número células mL^{-1}) realizadas pelas técnicas contagem por Microgota em placa e qPCR

Estirpe	Microgota em placa	PCR em Tempo Real
HCC103	8,30 ± 0,07 Ba	9,46 ± 0,04 Ab
HRC54	8,60 ± 0,44 Ba	10,63 ± 0,29 Aa
Ppe8^T	8,60 ± 0,10 Aa	9,06 ± 0,50 Ab
Pal5^T	8,70 ± 0,08 Aa	7,46 ± 0,31 Bc
CbAmc	8,43 ± 0,09 Aa	8,83 ± 0,93 Ab
Média Geral	8,52 ± 0,22 B	9,09 ± 1,11 A

Letras maiúsculas e minúsculas diferentes representam diferenças significativas das médias entre e dentro dos métodos, respectivamente, conforme o teste de média Tukey ($P < 0,05$).

Diversos autores têm mostrado que a quantificação por qPCR é mais sensível que a contagem em Placa para diversas bactérias. Stropa (2009) avaliou inoculantes para soja a base de *Bradyrhizobium* com 1, 2 e 4 anos de fabricação, enquanto Monllor (2013) quantificou *Legionella* spp. em amostras de água, e mostraram que a técnica de qPCR foi mais sensível do que a contagem por Placas. Ilha et al. (2016) utilizaram a técnicas de contagem em Placa e qPCR para quantificar o número de UFC mL^{-1} do *Lactobacillus paracasei* em amostras de iogurte aos 7, 14, 21 e 28 dias de fabricação, e mostraram que houve diferença estatística nas contagens apenas aos 28 dias, momento no qual supostamente, a comunidade viável de *L. paracasei* nas amostras de iogurte estava baixa, sugerindo que a qPCR foi mais sensível por detectar células viáveis e mortas. No presente trabalho, a quantificação utilizando a técnica de Microgotas em Placa mostrou uma média do número de células para 80 % das estirpes foi inferior aos valores encontrados pela quantificação por qPCR. A maior sensibilidade da qPCR comparada a técnica de Microgota em placa, pode está relacionada ao fato da qPCR quantificar tanto as bactérias mortas quanto as vivas, e na técnica de Microgota em placa, apenas as bactérias viáveis são quantificadas. Para essas mesmas amostras foram realizados testes de *Life and Death*, que mostraram as bactérias vivas e mortas do meio de cultura. Foi observado que a maior parte das bactérias estava viva (em verde) para todas as amostras, no entanto, havia também bactéria morta (em vermelho) Figura 44 do Anexo D.

5.7 Quantificação das Bactérias do Inoculante a partir de Plantas Crescidas em Solo ao Ar Livre Utilizando qPCR (Experimento I)

Para aumentar a eficiência da extração do DNA total de raízes utilizando tampão de lise foram feitos ajustes na composição do tampão CTAB e durante a extração de acordo com as sugestões recomendadas por Griffiths et al. (2000), incluindo a alguns componentes do kit comercial AllPrep DNA/RNA Mini kit (Qiagen). Além disso, também foram avaliadas as modificações sugeridas por Muoki et al. (2012), Holmes et al. (2014) e Ramos et al. (2014). No entanto, mesmo com o protocolo ajustado de acordo com as sugestões desses autores (**Anexo G**) apenas para as raízes de planta com 90 dias de idade foi possível extrair DNA que permitiu a amplificação por PCR de todas as amostras quando foi utilizado o primer para o gene 16S. Apesar da utilização de diferentes estratégias para a extração de DNA de raízes, como por exemplo, inclusão de proteinase K e lisozima, maior concentração de 2- β -mercaptoethanol no tampão e mais uma etapa de lavagem com fenol equilibrado, a qualidade do DNA extruído ainda não foi suficiente para a amplificação do DNA bacteriano da amostra

sem fazer diluições, mesmo quando foi adicionado DNA bacteriano à extração de DNA total de raízes. Provavelmente ainda há algum tipo de substância que está inibindo a atividade da DNA polimerase (Figura 23). De acordo com Azevedo et al. (2003) a relação de absorvância $260_{nm}/280_{nm}$ ideal para amostras de DNA deve ser de 1,8 a 1,9 o que sugere uma boa qualidade, e todas as amostras de DNA extraídas de raízes nesse trabalho mostram valores nessa faixa.

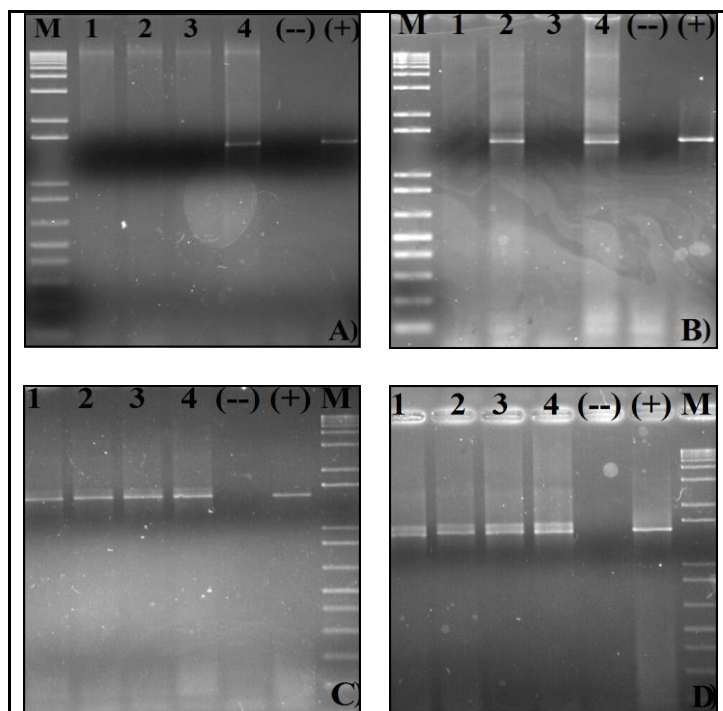


Figura 23. Produto da PCR para o gene 16S rDNA a partir do DNA total extraído de raízes de cana-de-açúcar com 90 DAP. A) Amostras de DNA sem diluir (1- 700, 2- 722, 3- 640, 4- 600) $ng \mu L^{-1}$; B) Amostras DNA diluído 10x; C) Amostras DNA diluído 100x; D) Amostras DNA diluído 1.000x; M) Marcador molecular; (+) Amostras de DNA bacteriano; (--) controle negativo.

Substâncias contaminantes como, por exemplo, os ácidos húmicos podem ser extraídos junto com o DNA das raízes de cana-de-açúcar, além disso, com o aumento da idade da planta pode haver uma maior lignificação e aumento na quantidade de camadas externa de células morta, essas em decomposição formam os ácidos orgânicos que pode dificultar a extração de DNA de boa qualidade. De acordo Jones et al. (2009) na rizosfera são concentrados aproximadamente 11% do carbono fotoassimilado pelas plantas, bem como, 10 a 16% do nitrogênio total das plantas. É provável que essa grande quantidade de elementos em forma de compostos orgânicos produzidos pelas plantas e liberados pelas raízes, facilite a atividade microbiana e a produção de diferentes metabólitos que podem se agregar as raízes dificultando a extração de DNA e influenciando, de forma negativa, o processo da PCR.

Devido às dificuldades encontradas para a extração de DNA com qualidade suficiente para as reações de PCR optou-se por utilizar apenas as amostras de DNA extraídas de colmos. A Figura 24 mostra há diferença entre a amplificação por PCR usando $1 \mu L$ do DNA total extraído da raiz e do colmo, utilizando dois kits comerciais diferentes para PCR.

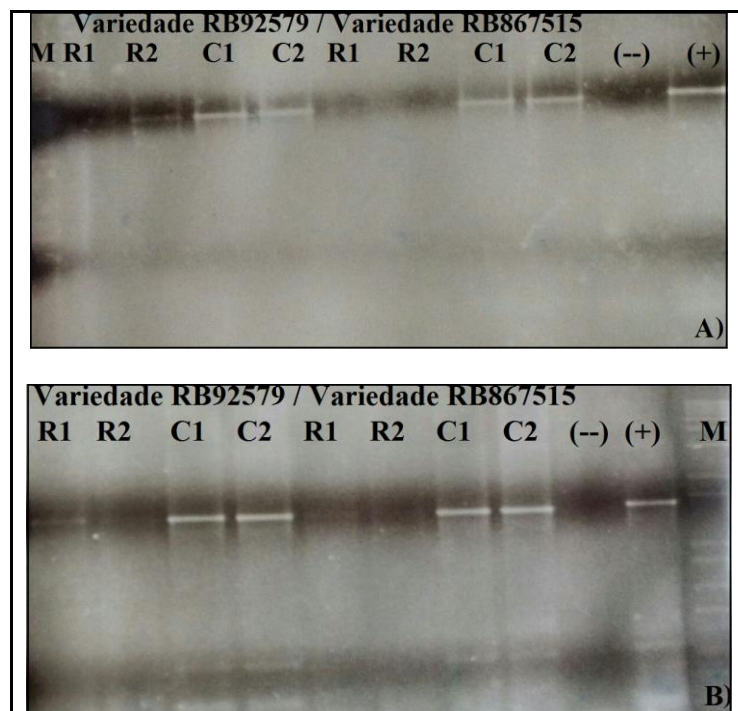


Figura 24. Produto da PCR utilizando dois kits comerciais de DNA-polimerase diferentes e os primers 17f e Amp2 para o gene 16S, com amostras DNA extraído de colmo (C) e raízes (R) de cana-de-açúcar. A) Kit da Qiagen® e B) Kit da Invitrogen®. Concentração do DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$): R1- 205, R2- 231, C1- 950, e C2- 936 (RB867515) e R1- 247, R2- 246, C1- 1634, e C2- 2225 (RB92579). (+) Amostras de DNA bacteriano. (--) controle negativo.

As amostras de DNA extraída dos colmos das variedades RB867515 e RB92579 aos 90, 180 e 270 dias após o plantio foram submetidas a qPCR para quantificação das bactérias do inoculante. Os dados gerados mostraram que a média geral das bactérias foi de $\log_{10} 3,879$, $\log_{10} 3,194$ e $\log_{10} 2,865$ células g^{-1} de tecido fresco aos 90, 180 e 270 DAP, respectivamente (Figura 25). Por meio do teste de regressão foi gerada uma equação com R^2 igual a 96%, Figura 26, que pode representar a população bacteriana do inoculante ao longo das coletas. No entanto, para maioria dos tratamentos não houve diferença significativa, mesmo quando, avaliado a interação entre os diferentes tratamentos (Tabela 27, Anexos H). Apesar da dose de N aplicada não ter interferido na população de bactérias, nem nas condições de inoculação e controle, houve um efeito significativo da variedade RB867515, mostrando maior número médio das bactérias do inoculante para cana-de-açúcar (Tabela 18).

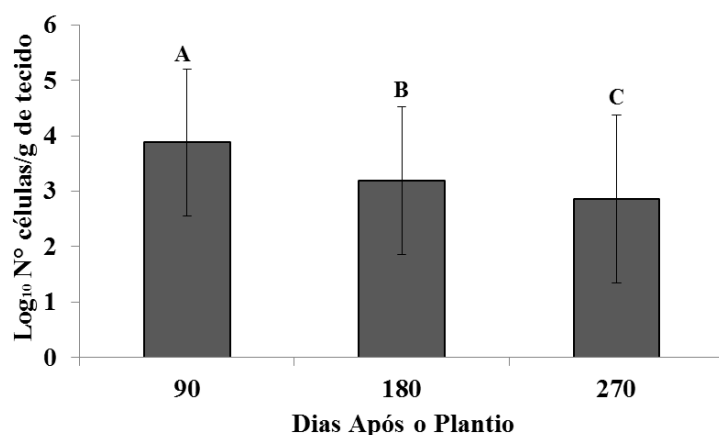


Figura 25. Média geral da população de bactérias (*H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *G. diazotrophicus*, *N. amazonense* e *P. tropica*) nas coletas realizadas aos 90, 180 e 270 DAP. Dados submetidos ao teste de média Tukey a 5% significância. Letras diferentes entre as colunas representam diferença significativa entre as médias.

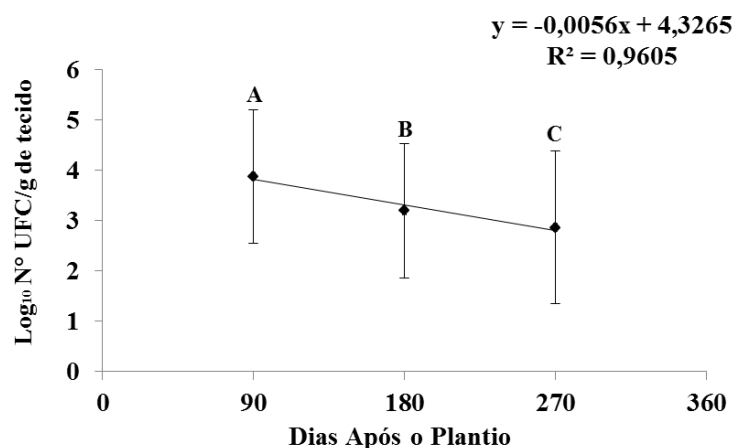


Figura 26. Comportamento populacional das espécies bacterianas do inoculante ao longo das coletas feitas aos 90, 180 e 270 DAP. Dados submetidos ao teste de regressão com 5% significância. As letras diferentes entre os pontos representa a diferença significativa entre as médias nas coletas.

A média das espécies de bactérias do inoculante monitoradas até os 270 DAP pode ser observada na Figura 27. Existiu diferença significativa para a maioria da bactéria e parece haver uma hierarquia entre as espécies. A *H. rubrisubalbicans* e *N. amazonense* mostraram quantidades semelhantes de bactérias em torno de $10^{3,3}$ células g^{-1} de tecido fresco. A espécie com maior número de bactérias durante o período de avaliação foi a *H. seropedicae* com média de $10^{4,54}$, seguida pela *G. diazotrophicus* com $10^{4,32}$ e *P. tropica*, com menor valor, apenas $10^{1,06}$, ou seja, aproximadamente 10 células g^{-1} de tecido fresco.

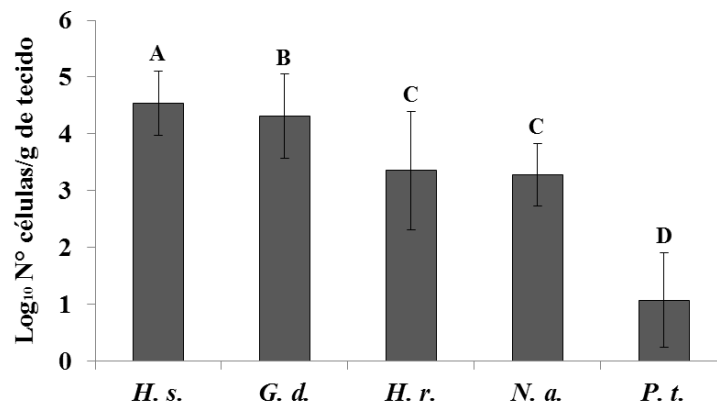


Figura 27. Média populacional de cada espécie bacteriana que compõem o inoculante para cana-de-açúcar durante os 270 DAP (3 coletas). Letras diferentes entre as barras significa que há diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). *H.r.*) *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *N.a.*) *Nitrospirillum amazonense*, *H. s.*) *Herbaspirillum seropedicae*, *G. d.*) *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *P. t.*) *Paraburkholderia tropica*.

Tabela 18. Médias gerais para o fator variedade, dose e condição, fornecidas em \log_{10} do número de células g^{-1} de tecido fresco.

Fatores	Variedades		Doses (kg de N ha^{-1})		Condições	
	RB867515	RB92579	0	45	Não inoculado	Inoculado
Médias	3,371 A	3,254 B	3,338A	3,287A	3,289A	3,336A
DP	$\pm 1,461$	$\pm 1,440$	$\pm 1,444$	$\pm 1,459$	$\pm 1,475$	$\pm 1,436$

DP: desvio padrão.

Um resultado interessante, apesar de não mostra diferença estatística significativa, ANOVA (Tabela 27, Anexos H), foi a ausência do efeito da dose de N e da inoculação, no número total de bactérias quantificadas por qPCR (Tabela 19). O que sugeri que a carga máxima de bactérias para cada variedade pode ter sido atingida mesmo na presença do N e dessa forma não houve acréscimo da inoculação. No entanto, esses resultados ainda precisam ser confirmados com um experimento realizado especificamente para esse fim.

Tabela 19. \log_{10} da média do número de células g^{-1} de tecido fresco das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar.

CONDIÇÃO \ DOSE	45 kg N ha^{-1}	0 kg N ha^{-1}
	Inoculado	3,298 Aa
Não inoculado	3,275 Aa	3,303 Aa

Letras maiúsculas e minúsculas iguais representam a ausência de significância das médias nas linhas e colunas, respectivamente pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

Outro aspecto interesse foi o comportamento populacional de cada espécie dentro das coletas (Figura 28). Foi possível observar que as espécies *H. rubrisubalbicans* e *P. tropica* tiveram suas populações significativamente reduzidas em pelo menos uma das coletas. No caso da *P. tropica* mesmo a qPCR não conseguiu detecta-la na na última coleta.

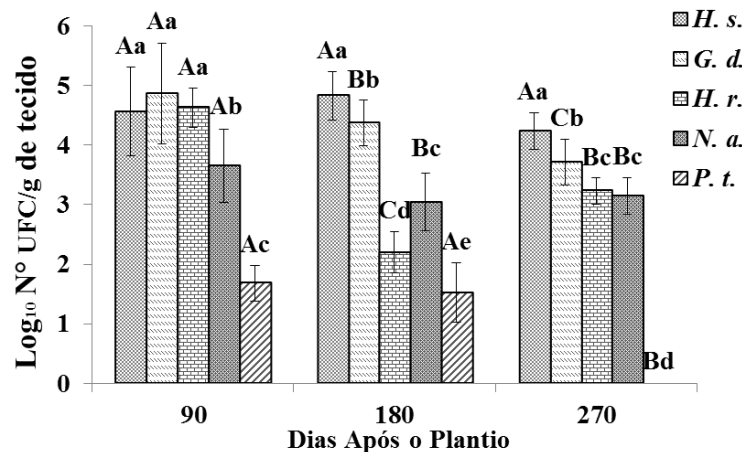


Figura 28. Variação do número de bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar dentro das coletas. Médias submetidas ao teste de média Tukey com $p < 0,05$. As letras maiúsculas e minúsculas iguais representam a ausência de significância entre os tratamentos, respectivamente entre e dentro das coletas. *H. r.*) *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *N. a.*) *Nitrospirillum amazonense*, *H. s.*) *Herbaspirillum seropedicae*, *G. d.*) *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *P. t.*) *Paraburkholderia tropica*.

5.8 Quantificação das Bactérias do Inoculante em Planta Crescidas em Areia e Vermiculita em Casa de Vegetação (Experimento II)

Esse experimento foi conduzido em casa de vegetação, usando areia e vermiculita (2:1) como substrato. Essa mistura é substancialmente pobre em matéria orgânica e permite uma esterilização mais eficiente. A utilização desse substrato para crescimento das plantas possibilitou obter uma extração de DNA de qualidade a partir das raízes de cana-de-açúcar com até 55 dias após a inoculação (DAI). No entanto, a quantificação das bactérias do inoculante utilizando esse DNA nas reações de qPCR mostrou pela ANOVA que não houve diferenças na média total do número de células g^{-1} de tecido para o tratamento controle e inoculado (Tabela 28, Anexos H). O processo de tratamento térmico de $52^{\circ} C$ por 30 min, conforme descrito por Landell et al. (2013), pode não ter sido suficiente para eliminar as espécies que compõem o inoculante para cana-de-açúcar nas matrizes colhidas no campo e utilizadas para retirada das gemas.

O número de bactérias total das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar, quantificado por qPCR para experimento II, alcançou uma média geral de $\log_{10} 5,2$ células g^{-1} de tecido fresco (Figura 29). Esses valores são maiores que os observados para o experimento I. Para verificar o padrão de comportamento da população durante o experimento II os dados da quantificação gerados para todas as coletas foram submetidos à análise de regressão (Figura 30) e mostram que há uma diminuição da população de bactérias ao longo do experimento que durou 55 dias. A média de células bacterianas de cada espécie foi quantificada para cada coleta aos 25, 40 e 55 DAI e ao longo de todo experimento.

Para os tecidos, raiz e parte aérea, nesse experimento, considerados como subparcelas, houve diferença estatística significativa. As raízes apresentaram maior número populacional de células bacterianas do inoculante (Tabela 20). Os tratamentos com inoculação não apresentaram diferença significativa na média geral, no entanto, pode ser observado um pequeno acréscimo do número de células/grama de tecido fresco para maioria dos tratamentos inoculado.

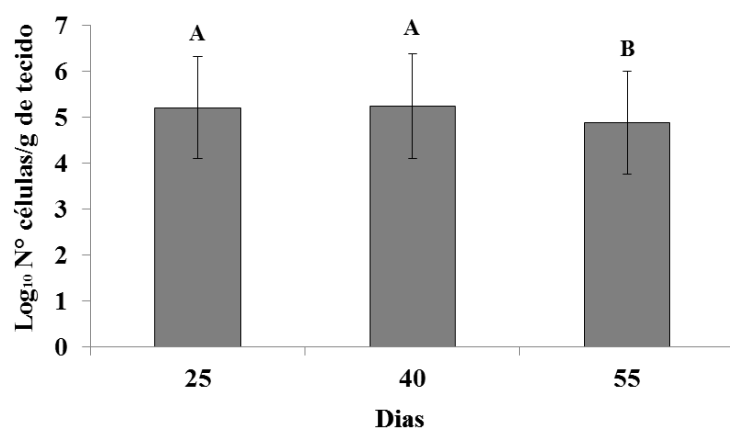


Figura 29. Média geral das bactérias (*H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *G. diazotrophicus*, *N. amazonense* e *P. tropica*) quantificadas aos 25, 40 e 55 DAI. Dados submetidos ao teste de média Tukey a 5% significância. Letras diferentes entre as colunas representam diferença significativa entre as médias.

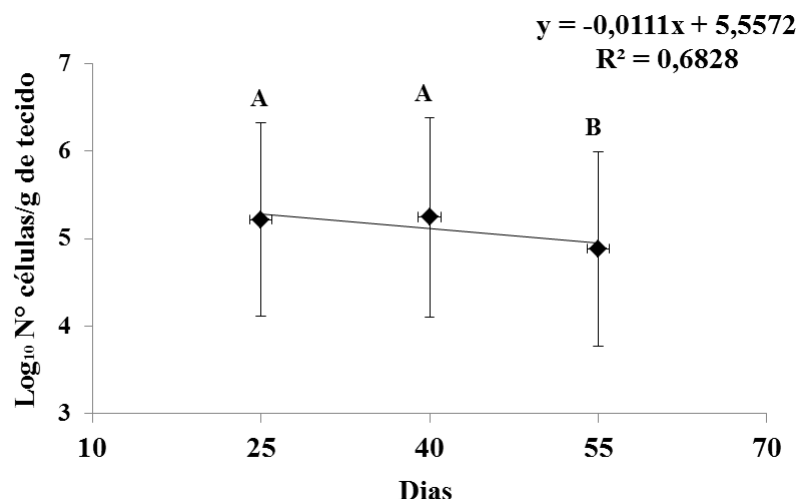


Figura 30. Comportamento do número de bactérias do inoculante ao longo das coletas feitas com 25, 40 e 55 após o plantio quantificadas por qPCR. Dados submetidos ao teste de regressão com 5% significância. As letras diferentes entre os pontos representa a diferença significativa entre as médias nas coletas.

Tabela 20. Média populacional em log₁₀ do número de células g⁻¹ de tecido fresco, para os fatores variedade e condições dentro das subparcelas

Tratamento		Variedades		Condições	
		RB867515	RB92579	Inoculado	Controle
Raiz	Médias	5,496 Aa	5,473 Aa	5.514 Aa	5.455 Aa
	DP	±0,836	±0,922	±0,688	±1,034
Parte aérea	Médias	4.965 Ba	4.523 Bb	4.779 Ba	4.710 Ba
	DP	±1,178	±1,245	±1,144	±1,343

As letras maiúsculas e minúsculas, iguais nas colunas e nas linhas, respectivamente, representam a ausência de diferença significativa entre as suas médias. Dados submetidos ao teste de média Tukey com $P < 0,05$. DP- desvio padrão.

Avaliando a média de cada espécie do inoculante ao logo do experimento mostrou que mais uma vez as espécies *H. seropedicae* e *G. diazotrophicus* se destacaram das demais com médias de $\log_{10} 6$ e $\log_{10} 5,9$ células g^{-1} de tecido fresco, respectivamente. A espécie *P. tropica* foi a que teve a menor população detectada com $\log_{10} 3,6$ células g^{-1} de tecido fresco. As médias populacionais das espécies *N. amazonense* e *H. rubrisubalbicans* foram de $\log_{10} 5,2$ e $\log_{10} 4,8$ células g^{-1} de tecido fresco, respectivamente, estatisticamente diferente entre si e as demais (Figura 31).

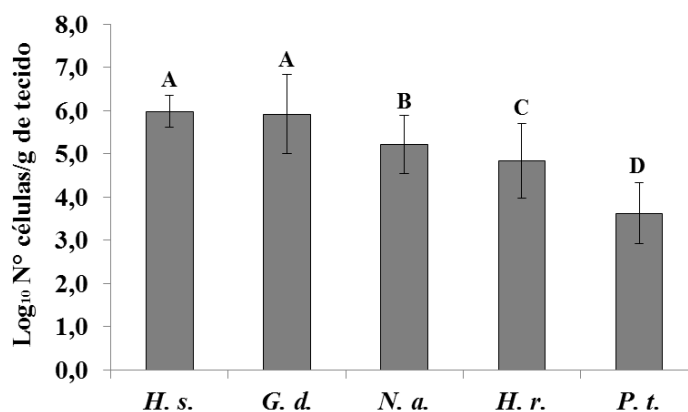


Figura 31. Média do número de células em \log_{10} referente às espécies que compõem o inoculante para cana-de-açúcar, quantificadas até os 55 DAI por qPCR. As diferenças entre as médias foram avaliadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). As letras diferentes entre as espécies representam diferença significativa. *H. r.*) *H. rubrisubalbicans*, *N. a.*) *N. amazonense*, *H. s.*) *H. seropedicae*, *G. d.*) *G. diazotrophicus* e *P. t.*) *P. tropica*.

As populações de cada bactéria durante as 3 coletas se mantem mais estáveis no experimento II do que no Experimento I (Figura 32). No entato, vale destacar que a primeira coleta do experimento I foi realizada aos 90 DAP.

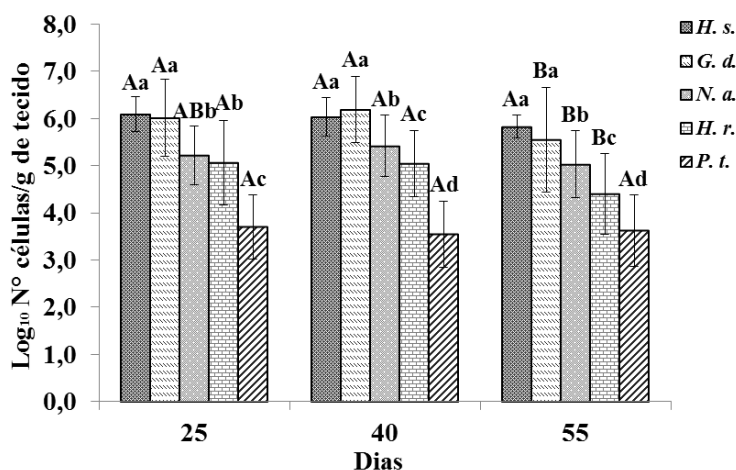


Figura 32. Comportamento do número de células das bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar dentro das coletas. Médias submetidas ao teste de média Tukey com $P < 0,05$. As letras maiúsculas e minúsculas iguais representam a ausência de significância entre os tratamentos, respectivamente entre e dentro das coletas. *H. r.*) *H. rubrisubalbicans*, *N. a.*) *N. amazonense*, *H. s.*) *H. seropedicae*, *G. d.*) *G. diazotrophicus* e *P. t.*) *P. tropica*.

Embora na média geral da população de bactérias que compõem o inoculante tende a reduzir como tempo, quando se avalia cada espécie isoladamente dentro de cada coleta nas subparcelas (raiz e parte aérea) observa-se que as plantas controle e inoculadas, tiveram médias do log₁₀ do número de células/g de tecido fresco estáveis (Tabela 21). Podendo ser observado que a inoculação com as bactérias do inoculante manteve significativamente maior número populacional nas raízes.

Tabela 21. Comportamento populacional em log₁₀ n° células g⁻¹ de tecido de bactérias do inoculante nas subparcelas (tecidos) para cada coleta.

Tecido/tratamento		Dias		
		25	40	55
Raiz	Controle	4,847 Ba	4,991 Ba	4,395 Bb
	Inoculado	5,583 Aa	5,499 Aab	5,371 Ab
Parte aérea	Controle	5,185 Aa	5,229 Aa	4,833 Ab
	Inoculado	5,245 Aa	5,261 Aa	4,934 Ab

As letras iguais minúsculas e maiúsculas, nas linhas e colunas, respectivamente, representam a ausência de diferença significativa entre as médias. Dados submetidos ao teste de média Tukey com $P < 0,05$.

A Tabela 22 mostra a média geral de cada uma das espécies do inoculante quantificadas por qPCR em log₁₀ n° células g⁻¹ tecido, sendo possível observar que a inoculação aumentou significativamente o número das bactérias *N. amazonense* e *P. tropica* nas raízes e na parte aérea, e no caso da *H. rubrisubalbicans* apenas na parte aérea. A *H. seropedicae* foi a mais estável dentre as espécies do inoculante com variação insignificante dentro dos tratamentos. A inoculação teve um efeito negativo na população de *G. diazotrophicus* para os dois tecidos avaliados. Com relação as variedades nota-se que as espécies do inoculante, com exceção da *H. seropedicae*, mostraram acréscimo significativo apenas no tecido parte aérea da RB867515. Novamente, os dados mostram que entre as espécies do inoculante a *P. tropica* está em menor número nos tecidos de cana-de-açúcar.

Tabela 22. Número de células g⁻¹ de tecido resultante da interação nas subparcelas e cada espécie de bactéria do inoculante com as variedades e condições

Tecido/tratamento		Espécie				
		<i>H.s.</i>	<i>G.d.</i>	<i>N.a.</i>	<i>H.r.</i>	<i>P.t.</i>
Raiz		log ₁₀				
Variedade	RB867515	5,695 Ab	6,385 Aa	5,731 Ab	5,416 Bb	4,2518 Ac
	RB92579	5,807 Ab	6,392 Aa	5,549 Ab	5,533 Ab	4,086 Ac
Condição	Controle	5,750 Ab	6,885 Aa	5,325 Bc	5,350 Ac	3,963 Bd
	Inoculado	5,752 Ab	5,892 Bab	5,955 Aab	5,599 Aab	4,374 Ac
Parte aérea		log ₁₀				
Variedade	RB867515	6,221 Aa	5,909 Aa	5,042 Ab	4,351 Ac	3,304 Ad
	RB92579	6,203 Aa	4,971 Bb	4,557 Bb	4,044 Bc	2,842 Bd
Condição	Controle	6,242 Aa	5,712 Ab	4,598 Bc	4,018 Bd	2,979 Ae
	Inoculado	6,181 Aa	5,168 Bb	5,001 Ab	4,378 Ac	3,167 Ad

Letras minúsculas e maiúsculas iguais nas linhas e colunas representam a ausência de diferença significativa entre as médias pelo de Tukey com $P < 0,05$. *H. r.*) *H. rubrisubalbicans*, *N. a.*) *N. amazonense*, *H. s.*) *H. seropedicae*, *G. d.*) *G. diazotrophicus* e *P. t.*) *P. tropica*.

Apesar de não ter sido observado efeito estatisticamente significativo da inoculação e dose de nitrogênio no aumento da população das bactérias do inoculante quando quantificadas por qPCR, a quantidade de bactérias detectadas em cada genótipo de cana foi diferente, sendo os maiores valores observados para a variedade RB867515 (Tabelas 18 e 20). Yeoh et al. (2015) também observaram que o uso de N-fertilizante em pequenas concentrações teve pouca influência sobre a população de diazotróficos associados a raízes de cana-de-açúcar. A quantificação das bactérias do inoculante utilizando o DNA total extraído dos colmos de plantas crescidas em solo (experimento I) mostrou que a população das bactérias *G. diazotrophicus*, *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* alcançou valores de \log_{10} 4,32, \log_{10} 3,35 e \log_{10} 4,54 células g^{-1} de tecido fresco, respectivamente. Essa faixa de valores também foi observada por REIS JUNIOR et al., (2000) para a *Acetobacter diazotrophicuse Herbaspirillum* spp. utilizando a técnica de NMP em cana-de-açúcar. De acordo com Lodewyckx et al. (2002) as bactérias benéficas em plantas têm populações na faixa de 10^3 a 10^5 células/ g^{-1} tecido fresco, sobretudo quando inoculadas. Por outro lado, a quantidade de bactérias fitopatogênicas endófitas são mais expressivas chegando até 10^9 UFC g^{-1} de tecido fresco. Nossos estudos mostram que o número de bactérias tende a diminuir com o tempo de idade das plantas de cana-de-açúcar (Figura 25 e 29).

Boa Sorte (2013), utilizando NMP e qPCR, para quantificar as bactérias do inoculante de cana-de-açúcar cultivadas em duas regiões do Brasil, mostrou que o pico da população ocorreu nas primeiras coletas, aos 8 meses no estado de São Paulo e 7 meses no Rio Grande do Sul com redução populacional nas demais coletas. Essa tendência de diminuição do número de bactérias diazotróficas com a idade da planta também foi observada por Reis Junior et al. (2000) por meio da contagem com a técnica de NMP.

A maior quantidade de bactérias foi detectada quando utilizado o DNA total de plantas crescidas em areia e vermiculita (experimento II), provavelmente esse substrato apresentou efeito na dinâmica da população de bactérias do inoculante, uma vez que, pode ter havido menor competição do que quando foi utilizado o solo como substrato. A vermiculita e areia são substratos de baixíssima fertilidade, além de tudo esterilizado, podem ter favorecido a colonização da planta pelas bactérias inoculadas. Saubidet et al. (2002) e Merten & Hess (1984) mostraram que em solos mais pobres e esterilizados existe uma menor carga microbiana.

Para o experimento I não foi possível quantificar a comunidade bacteriana das espécies que compõem o inoculante para as raízes em função da baixa qualidade do DNA extraído. No experimento II, a média do número de células g^{-1} de tecido fresco foi calculada para parte aérea e raízes, sendo observado maior número significativo de bactérias do inoculante nas raízes. De com Lamb et al. (1996) e Gomes et al. (2005) a raiz é o tecido da planta onde há maior microbiota, sendo essa, decrescente no sentido apical da parte aérea. Além disso, foi observado que bactérias isoladas e inoculadas novamente na mesma planta (espécie, variedades etc.) tendem a estabelecerem-se nas raízes (BALDANI & BALDANI, 2005). Reis et al. (2000) e Milani et al. (2011) também mostram que as populações de bactérias diazotróficas endofíticas estão em maiores quantidades nas raízes em relação as outras partes da planta de cana-de-açúcar. No entato, nossos resultados mostram que pode haver diferenças entre as espécies dependendo do tecido, com excessão da *H. seropedicae*, uma vez que, os valores de sua população não diferiram entre parte aérea e raízes.

Os dois experimentos mostraram que não houve efeito significativo da inoculação quando comparado o conjunto das bactérias do inoculante. Provavelmente as matrizes de cana-de-açúcar utilizadas já carregavam uma considerável carga de microrganismos, principalmente para o experimento em solo. James et al. (1997) destacam que as bactérias endofíticas podem ser disseminadas por sementes ou por propágulos vegetativos como é o caso da cana-de-açúcar.

As espécies de bactéria do inoculante foram isoladas da própria cana-de-açúcar. No entanto, os primers desenhados e testados para a qPCR neste trabalho foram capazes de amplificar o DNA alvo para várias estirpes como, por exemplo, os pares de primers Hs54CphageEndo e Gd5C4525 amplificaram todas as estirpes dentro das espécies de *H. seropedicae* e *G. diazotrophicus*, respectivamente. O primer Hr103C1870 foi o mais específico, amplificando apenas o fragmento de DNA de duas estirpes (M6 e HCC103) dentro da espécie *H. rubrisubalbicans*. No caso de *N. amazonense* os primers NaCbCgyrA também amplificaram um fragmento de tamanho esperado para estirpes isoladas de outras culturas, além da cana-de-açúcar. Dessa forma, as reações de qPCR utilizando esses pares de primers provavelmente não detectaram apenas as estirpes de bactérias do inoculante. No entanto, as análises de similaridade de sequência do gene 16S e BOX-PCR mostraram que grande parte dessas estirpes pode ser filogeneticamente muito próxima, podendo até ser a mesma bactéria isolada em diferentes momentos.

6 CONCLUSÕES

- I. A grande maioria dos primers desenhados nesse trabalho para as bactérias do inoculante para cana-de-açúcar mostrou-se espécie-específico.
- II. Apenas o par de primer Hr103C4062, desenhado para a *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 é estirpe-específicos.
- III. A quantificação por qPCR para maioria das bactérias foi mais sensível ou igual a contagens pelas técnicas Microgotas.
- IV. A quantidade de bactérias do inoculante para cana-de-açúcar em colmos das variedades RB867515 e RB92579 não sofreu influência da dose de 45 kg ha⁻¹ de nitrogênio, nem da inoculação ao longo de 270 após o plantio.
- V. A quantidade de diazotróficos endofíticos diminuiu a medida com a idade da planta.
- VI. O número de bactérias das espécies das bactérias do inoculante para cana-de-açúcar foi maior na variedade RB867515 do que na RB92579.
- VII. Para plantas com até 55 DAI a quantidade de bactérias do inoculante foi maior nas raízes da cultura.
- VIII. A quantidade de bactérias do inoculante para cana-de-açúcar foi maior em plantas inoculadas crescidas em casa de vegetação no substrato areia com vermiculita.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os primers desenhados foram devidamente testados e avaliados em nível de espécies e estirpes, e as análises de similaridade utilizando a sequência do gene 16S e a BOX-PCR (Figuras 46 e 48, Anexos) foi utilizada para estabelecer as relações filogenéticas entre as estirpes testadas. Embora a quantificação por qPCR de bactérias em tecidos de cana-de-açúcar tenha sido considerada em nível de espécie, todos os primers selecionados mostraram alta eficiência e especificidade, bem como, tiveram suas condições para PCR e qPCR seguramente estabelecidas (Tabela 10). Dessa forma, esses primers são potenciais ferramentas para trabalhos futuros envolvendo a quantificação das estirpes HCC103, HRC54, Ppe8^T, Pal5^T e CbAmc pelas técnicas de PCR e qPCR. As análises de similaridade entre as 30 estirpes dentro das 6 espécies mostraram que, muitas são filogeneticamente bem próximas, e até que ponto os primers desenhados podem ser considerado espécie ou estirpe específicos. Dessa maneira, há necessidade de sequenciar o genoma de um maior número de estirpes, para estabelecer uma melhor relação entre elas e poder selecionar primers estirpe específicos.

Além dos primers selecionados, foi estabelecido um protocolo para extração de DNA das raízes de cana-de-açúcar (**Anexo G**). Essa metodologia pode ser utilizada a fim de obter amostras de DNA com alto rendimento e qualidade a partir de plantas cultivadas em solo. No entanto, como o período de avaliação foi de 90 dias, é possível que esse protocolo ainda necessite de ajustes para plantas cultivadas no intervalo entre 90 e 180 dias de idade.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELHO, M. Protocolos de Microbiologia Ambiental. Parte 1- Métodos básicos em microbiologia. Escola Superior Agrária. Instituto Politécnico de Coimbra. p. 12. 2013. Disponível em<http://www.esac.pt/Abelho/MicroAmbiental/Protocolos%5B1%5D_2012_2013> pdf> Acesso em 16/07/2017.
- ALENCAR, K. Análise do balanço entre demanda por etanol e oferta de cana-de-açúcar no Brasil. 2012. 49 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- ALJANABI, S. M.; FORGET, L. And DOOKUN, A. An improved rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Mol. Biol. Reporter*. 17(3):1-8. 1999.
- ANGELIS, D. F. & VALSECHI, O. A. II CURSO DE MONITORAMENTO TEÓRICO E PRÁTICO DA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA. Apostila em PDF. p. 19. Disponível em<http://www.cca.ufscar.br/~vico/2%20monitoramento/apostila_1.pdf>. Rio Claro 2008.
- ANONYMOUS, R. Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feeds, 2nd Edn. Silver Spring, MD:US Food & Drug Administration; Office of Foods and Veterinary Medicine. 2015.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Real-Time PCR Vs. Traditional PCR. Disponível em <http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf> Acesso em: 30/06/2017.
- ARAÚJO, W. L. DESENVOLVIMENTO DE METODO MOLECULAR PARA QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS EM PRODUTOS INDUSTRIALIZADOS. Dissertação (Mestrado) Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes. Mogi das Cruzes, SP. 63 f. 2010.
- ARCANJO, S. S.; SANTOS, S. T.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. Occurrence and dissemination of endophytic diazotrophic bacteria in sugarcane fields. In: PEDROSA, F. L.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E. Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity. Current plant sciences and biotechnology in agriculture, Dordrecht; Kluwer Academic, 2000, v.38, p. 605.
- ARRUDA JÚNIOR, R. G. Temperatura de Melting: um estudo comparativo. Monografia (Bacharelado)- Faculdade de Computação. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande – MS . 51fls. 2010.
- AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; DE-SOUZA, M. T. Técnicas básicas em Biologia Molecular. Brasília: Editora Universidade de Brasília. 212p.:il. ISBN:85-230-0685-0. 2003.
- AZEVEDO, M. S.; TEIXEIRA, K. T. S.; KIRCHHOF, G.; HARTMANN, A.; BALDANI, J. I. Influence of soil and host plant crop on the genetic diversity of *Azospirillum amazonense* isolates. Elsevier GmbH. 49:565-576. DOI: 10.1016/j.pedobi.06.008. 2005.

- AZMAT, M. A.; KHAN, I. A.; CHEEMA, H. M. N.; RAJWANA, I. A.; KHAN, A. S.; KHAN, A. A. Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L. Univ.-Sci. B (Biomed. Biotechnol.) 13 (4), 239–243. 2012.
- BACHMANN, B.; LUKE, W.; HUNSMANN, G. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. Nucleic Acids Res 18: 1309. 1990.
- BALDANI, J. I.; AZEVEDO, M. S.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S.; OLIVARES, F. L.; GOI, S. R.; BALDANI, V. L. D. & DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. Interrelação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa: SBCS; Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 621-666.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.77, p.549-579, 2005.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. A root-associated nitrogen-fixing bacterium. International Journal of Systematics Bacteriology, Washington, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. & DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. Soil Biol. Biochem. 29:911-922, 1997.
- BALDANI, J. I.; GUEDES, H. V.; VIDAL, M. S.; SCHWAB, S.; TEIXEIRA, K. R. S.; CRUZ, L. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L. Base de dados genômica de estirpes que compõem o inoculante de cana-de-açúcar e milho. Embrapa Agrobiologia. Documentos 282. Seropédica: Embrapa, 32 p. 2011.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, V. L. D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. P. 195-232.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H. & BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. Plant Soil. 384:413–431 p. DOI 10.1007/s11104-014-2186-6. 2014.
- BARROS, R. Energia para um novo mundo. RJ: Monte Castelo Ideias, 2007.160 p.
- BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. Plant Growth Regulation; an International Journal on Natural and Synthetic Regulators, Dordrecht, v. 24, p. 7-11, 1998.
- BELLONE, C. H. y BELLONE, S. C. Fijación biológica del nitrogeno atmosférico. 1ª ed. Tucumán: el autor, 223 p.; 24x16 cm. 2006.

- BERMÚDEZ-GUZMÁN, M. J.; GUZMÁN-GONZÁLEZ, S.; OROZCO-SANTOS, M.; VELÁZQUEZ-MONREAL, J. J.; BUENROSTRO-NAVA, M. T.; Y MICHEL-LÓPEZ, C. Y. Optimización de un protocolo para aislamiento de DNA de hojas de *Saccharum officinarum*. J. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Vol.7 Núm.4 16 de mayo - 29 de junio, p. 897-910. 2016.
- BERTALAN, M.; ALBANO, R.; PÁDUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K. R.; SCHWAB, S.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; OLIVEIRA, A.; FRANÇA, L.; MAGALHÃES, V.; ALQUÉRES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M. M.; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMÃO, T.; MACEDO, J.; VALADÃO, A.; DRESCHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M. S.; GUEDES, H.; RODRIGUES, H.; MENESES, C.; BRIOSO, P.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; JUNIOR, J.; FILHO, G. S.; FLORES, V. M. Q.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; GUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L.; MACEDO, J.; ALVES-FERREIRA, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; COELHO, A.; SANTOS, E.; AMARAL, G.; NEVES, A.; PACHECO, A. B.; CARVALHO, D.; LERY, L.; BISCH, P.; RÖSSLE, S. C.; ÜRMÉNYI, T.; PEREIRA, A. R.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; VON KRÜGER, W.; MARTINS, O.; BALDANI, J. I. AND FERREIRA, P. C. G. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5^T. BMC Genomics. 10:450 doi:10.1186/1471-2164-10-450. 2009.
- BIGGS, I. M.; STEWART, G. R.; WILSON, J. R. & CRITCHLEY, C. N-15 natural abundance studies in Australian commercial sugarcane. Plant Soil, 238:21-30, 2002.
- BOA SORTE, P. M. F. Estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em cana-de-açúcar cultivada em duas regiões do Brasil. Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. p. 106. 2013.
- 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. Dissertação (mestrado), curso de Pós-graduação em Ciência do Solo. Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. p. 56. 2009.
- BOA SORTE, P. M. F.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; MELO, L. H. V.; GALISA, P. S.; LEAL, L.; BALDANI, J. I. & BALDANI, V. L. D. Development of a real-time PCR assay for the detection and quantification of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane grown under field conditions. African Journal of Microbiology Research vol. 8(31). DOI: 10.5897/AJMR2014.6779. pp. 2937-2946, 30 July, 2014.
- BODDEY, L. H.; DART, P.; GOI, S. R.; BALDANI, J. I. Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas na cultivar Q151 de cana-de-açúcar cultivada na Austrália. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23., REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7., SIMPÓSIO BRASILEIRO DE BIOLOGIA DO SOLO, 5., REUNIÃO BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 2., 1998, Caxambu, MG. Resumos Lavras: UFLA/SBCS/SBM, 1998. P. 809.
- BODDEY, R. M. & DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. Plant Soil, 108:53-65, 1988.

- BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in sugar cane: A key energetically viable biofuel production. *Critical Reviews in Plant Science*, v. 29, p. 263-279, 1995.
- BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of ^{15}N natural abundance technique for quantification of the contribution of N_2 fixation to sugar cane and others grasses. *Australian Journal of Agricultural Research*. v. 28, p. 889-895, 2001.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R. & REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: Present knowledge and future applications. *Plant Soil*, 252:139-149, 2003.
- BONILLA, G. A. E. Seleção de bactérias diazotróficas solubilizadoras de fósforo e seu efeito no desenvolvimento de plantas de arroz. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. p. 64. 2011.
- BORGES, K C. A. S. Identificação de Madeiras Nativas por DNA *BARCODE*. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. p. 84. 2016.
- BRASIL, M. S.; BALDANI, J. I. & BALDANI, V. L. D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul mato-grossense. *R. Bras. Ci. Solo*, 29:179-190, 2005.
- CALLADINE, C. R.; DREW, H. R.; LUISI, B. F. And TRAVERS, A. A. *Understanding DNA: The molecule and how it works*, 2004.
- CASSÁN, F. D. & SALAMONE, I. G. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. 1^a ed. Buenos Aires: Asoc. Argentina de Microbiología, 2008. 276 p. 15x23 cm.
- CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, The Hague, v. 108, p. 23-31, 1988.
- CGEE - CENTRO DE GESTÃO DE ESTUDOS ESTRATÉGICOS. Estudo sobre as possibilidades e impactos da produção de grandes quantidades de etanol visando à substituição parcial de gasolina no mundo – Fase 1. Campinas: Nipe/Unicamp e Centro de Gestão de Estudos Estratégicos, 2005.
- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113-116. 1993.
- COELHO, C. H. M.; MEDEIROS, A. F. A.; POLIDORO, J. C.; XAVIER, R. P.; RESENDE, A.; QUESADA, D. M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R.; URQUIAGA, S. Identificação de genótipos de cana-de-açúcar quanto ao potencial de contribuição da fixação biológica de nitrogênio. *Agronomia*, v. 37, p. 37-40, 2003.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v. 2 – Safra 2015/16, n. 1 - Primeiro Levantamento, Brasília, abr. 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>.

- COUILLEROT, O.; BOUFFAUD, M.; BAUDOIN, E.; MULLER, D.; CABALLERO-MELLADO, J.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 42, n. 12, p. 2298-2305, 2010.
- CRESTANA, S. Açúcar e Álcool: Da cana-de-açúcar ao álcool combustível. *AGROANALYSIS A REVISTA DE AGRONEGÓCIOS DA FGV. FUNDAÇÃO GETULIO VARGAS*. Vol 26. N° 12. Dezembro 2006. Caderno Especial. p. 3-4.
- CRUZ, L. M., SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacterial isolated from banana (*Musa spp.*) e abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 67, p. 2375-2379, 2001.
- DA SILVA P. R. A.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; VIDAL, M. S.; CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M. and BALDANI, J. I. Draft genome sequence of *Paraburkholderia tropica* Ppe8 strain, a sugarcane endophytic diazotrophic bacterium. *Brazilian journal of microbiology*, 49:210–211. 2018.
- DEMATTÊ, J. L. I. Nitrogênio em cana planta. *RPAnews cana & indústria*. Ano15. N° 180. Julho de 2016. p 26-28.
- DEMEKE, T.; JENKINS, R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Heidelberg, n. 396, p. 1977-1990, 2010.
- DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, G. A. Cana-de-açúcar. Eds. Campinas: Instituto Agronômico, 882 p. 2010.
- DINON, A. Z.; PRINS, T. W.; VAN DIJK, J. P.; ARISI, A. C. M.; SCHOLTENS, I. M. J. & KOK, E. J. Development and validation of real-time PCR screening methods for detection of *cry1A.105* and *cry2Ab2* genes in genetically modified organisms. *Anal Bioanal Chem*. 400:1433–1442. Doi:10.1007/s00216-011-4875-9. 2011.
- DOBRITSA, A. P. And SAMADPOUR, M. Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66, 2836–2846. 105:1149–1162. DOI I 10.1099/ijsem.0.001065. 2016.
- 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.
- ERALI, M.; VOELKERDING K. V. & WITTEWERC. T. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and Molecular Pathology*. Elsevier Inc. All rights reserved. Doi:10.1016/j.yexmp.2008.03.012. 85. 50–58. 2008.
- EUROGENTC EXPERIENCE TRUE PARTNERSHIP. qPCR Guide. p. 68. Disponível em: <http://www.eurogentec.com/uploads/qpcr-guide.pdf>.

- EUROGENTEC® (Experience true partnership). qPCR guide. p. 68. Disponível em, <<https://secure.eurogentec.com/uploads/qPCR-guide.pdf>> Acessado em: 05/07/2017.
- FALEIRO, A. C.; PEREIRA, T. P.; ESPINDULA, E.; BROD, F. C. A. ARISI, A. C. M. Real Time PCR detection targeting nifA gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. *Symbiosis*. Versão Online In: (doi:10.1007/s13199-013-0262-y). p. 9. 2013.
- FALEIRO, F. G., ANDRADE, S. R. M., REIS JUNIOR, F. B. *Biotecnologia: estado da arte e aplicação na agropecuária*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p. 246-281. 730 p.:il. 2011.
- FANG, G.; HAMMAR, S.; GRUMET, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques*, v. 13, p. 53-54, 1992.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. v.39:783-791, 1985.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciênc. agrotec.* [online]. 2014, vol.38, n.2 [citado 2017-07-08], pp. 109-112. Disponible en: ISSN 1413-7054. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>.
- FIGUEIREDO, G. G. O. Protocolo para inoculação de bactérias diazotróficas em sementes de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Setor de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná. – Curitiba, 2012.
- FILOSO, S., MARTINELLI, L. A.; HOWARTH, R. W.; BOYER, E. W. & DENTENER, F. Human activities changing the nitrogen cycle in Brazil. *Biogeochemistry*, 79:61-89, 2006.
- FORMIGHIERI, E. F. Manual de anotação café. Disponível em <http://www.lge.ibi.unicamp.br/manuais/manual_annota_cafe.htm> Acesso em 28/06/2017.
- FRANKE-WHITTLE, I. H.; O_SHEA, M. G.; LEONARD, G. J. & SLY, L. I. Design, development, and use of molecular primer and probes for the detection of gluconacetobacter species in the pink sugarcane mealybug. *Microbial Ecology*, v. 50, p. 128-139, 2005.
- FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus* a endolactic producing isolated from sugar cane cultivars of Mexico. *Plant and Soil*, The Hague, v. 164, p.145-150, 1993.
- FURUSHITA, M.; SHIBA, T.; MAEDA, T.; YAHATA, M.; KANEOKA, A.; TAKAHASHI, Y.; TRII, K.; HASEGAWA, T.; OHTA, M. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p.5336–5342, 2003.
- GEHRIG, H. H.; WINTER, K.; CUSHMAN, J.; BORLAND, A. And TAYBI, T. An improved RNA isolation method for succulent plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18, 369–376.doi:10.1007/BF02825065. 2000.
- Ghedira, R.; PAPAZOVA, N.; VUYLSTEKE, M.; RUTTINK, T.; TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M. Assessment of primer/template mismatch effects on real-time PCR

- amplification of target taxa for GMO quantification. *J Agric Food Chem*, 57(20):9370–9377. 2009.
- GILLIS, M. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int. J. f Systematic Bacteriology*. 39. 361-364. 1989.
- GÍRIO, L. A. S.; DIAS, F. L. F.; REIS, M. R.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BOLONHEZI, D. & MUTTON, M. A. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.50, n.1, p.33-43, DOI: 10.1590/S0100-204X2015000100004. 2015.
- GOMES, A. A.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40, p.1105-1113, 2005.
- GRAHAM, M. H.; HAYNES, R. J. & MEYER, J. H. Changes in soil fertility induced by trash retention an fertilizer applications on the long-term trash management trial at Mount Edgecombe. *Proc. South Africa Sugar Technol. Assoc.* 74:109-113, 2000.
- GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A.; O'DONNELL, A. G.; BAILEY, M. J. Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environmentsfor Analysis of Robosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. vol. 66, N°. 12. p. 5488-5491. 2000.
- GRIFFITHS-JONES, S.; MOXON, S.; MARSHALL, M.; KHANNA, A.; EDDY, S. R. And BATEMAN, A. Rfam: annotating non-coding RNAs in complete genomes. *Nucleic Acids Research* 33, 2005.
- GUEDES, H. V.; SANTOS, S. T.; PERIN, L.; TEIXEIRA, K. T. S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Polyphasic Characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* Isolates Obtained from Different Sugarcane Varieties. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39:718-723. ISSN 1517-8382. 2008.
- GUPTA, V. et al. The water-deficit stress- and red-rot-related genes in sugarcane. *Functional and Integrative Genomics*, Berlin, v. 10, n. 2, p. 207-214, 2010.
- HARTMANN, A.; ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: OKON, Y. (Ed.). *Azospirillum/ Plant Associations*. Boca Raton: CRC press, 1994. p. 15-39.
- HASSAN, U.; MIRZA, M. S.; MEHNAZ, S.; RASUL, G.; MALIK, K. A. Physiological, biochemical and molecular characterization of *Azospirillum* ssp. Isolated from cereal crops. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-EGUMES, 7., 1996, Faisalabad, Pakistan. Abstracts. Pakistan: National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering (NIBGE), 1996. p. 159-160.
- HEALEY, A.; FURTADO, A.; COOPER, T.; And HENRY, R. J. Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods*. 10:2. p.8. 2014.

- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; And WILLIAMS, P. M. Real-time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986–994. 1996.
- HILL, P. J. And STEWART, G. S. A. B. The Polymerase Chain Reaction in Molecular and Micro-Biology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews – Vol. 10*, 1992.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agr. Exp. STA. Cir*, 347p., 1950.
- HOEFSLOOT, G.; TERMORSHUIZEN, A. J. L.; WATT, D. A. & CRAMER, M. D. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown South African sugarcane cultivar. *Plant Soil*, 277:85-96, 2005.
- HOLMES, A.; BIRSE, L.; JACKSON, R. W.; HOLDEN, N. J. An optimized method for the extraction of bacterial mRNA from plant roots infected with *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in MICROBIOLOGY*. Volume 5: Article 286. 6 p. 2014.
- HONEYCUTT, R. J.; SOBRAL, B. W. S.; KEIM, P. And IRVINE, J. E. A rapid DNA extraction method for sugarcane and its relatives. *Plant Mol. Biol. Reporter*. 10(1):66-72. 1992.
- HOSSAIN, M. A.; SHAIK, M. M.; SHAHNAWAZ, R. M. S.; ISLAM, N. And MIAH, M. A. S. Quality DNA isolation using different methods of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Bangladesh J. Sugarcane*. 28:65-69. 2006.
- HUAQIANG, T.; HAITAO, H.; MAMMAN, T.; JIANYAO, M. And HUANXIU, L. Comparative analysis of six DNA extraction methods in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *J. Agric. Sci.* 5(7):82-90. 2013.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; CRISPINO, C. C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLI, R. N. R.; MENDES, I. C. & ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and of N fertilizer to grain yield. *Can. J. Plant Sci.*, 86:927-939, 2006.
- ILHA, E. C; SCARIOT, M. C. TREML, D.; PEREIRA, T. P. SANT'ANNA, E. S.; PRUDÊNCIO, E. S.; ARISI, A. C. M. Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. *Ann Microbiol* 66:597–606. p. doi: 10.1007/s13213-015-1137-7. 2016.
- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotrophic colonising vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *Journal of Experimental Botany*, v. 48, p. 785-797, 1997.
- JOHNSON, G.; NOLAN, T.; And BUSTIN, S. A. Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE. *Methods Mol. Biol.* 943,1–16. 2013.
- JONES, D. L.; NGUYEN, C.; FINLAY, R. D. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface. *Plant Soil* 321:5–33. 2009.

- KENNEDY, I. R. and ISLAM, N. I. The current and potential contribution of symbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms. *A Rev. Australian Journal of Experimental Agriculture*. 41. 447-457. 2001.
- KHANUJA, S. P. S.; SHASANY, A. K.; DAROKAR, M. P. And KUMAR, S. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Mol. Biol. Reporter*. 17(1):1-7. 1999.
- KIMURA, M. A. simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v.16:111-120, 1980.
- KOTCHONI, S. O.; And GACHOMO, E. W. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. *Mol. Biol. Rep.* 36:1633–1636. 2009.
- KRALIK, P. And RICCHI, M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 8. Article 108. Doi:103389/fmicb.2017.00108. 2017.
- KUMAR, S.; STECHER, G., and TAMURA K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33:1870-1874. 2016.
- LAMB, T. G.; TONKYN, D. W.; KLUEPFEL, D. A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from rizosphere to aerial plant tissue. *Canadian Journal of Microbioly*, v.42, p.1112-1120, 1996.
- LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A.; DINARDO-MIRANDA, L. L.; SCARPARI, M. S.; GARCIA, J. C.; BIDÓIA, M. A. P.; SILVA, D. N.; MENDONÇA, J. R.; KANTHACK, R. A. D. CAMPOS, M. F. BRANCALIÃO, S. R.; PETRI, R. H. & MIGUEL, P. E. M. Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. 2ª. Ed. Revisada . Campinas: Instituto Agronômico. (Documentos IAC, N. 109). 16 p. 2013.
- LI, M.; ZHAO, G.; LIU, J.; GAO, X.; ZHANG, Q. Effect of different heat treatments on the degradation of Salmonella nucleic acid. *J Food Saf* 33:536–544. p. doi:10.1111/jfs.12086. 2013.
- LIFE® (Technologies). Real-time PCR handbook. p. 70. 2012. Disponível em, <<http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>> Acessado em: 04/07/2017.
- LIMA, D. R. M. Fixação Biológica de Nitrogênio e Nutrição Nitrogenada em Cana Planta Inoculadas com Bactérias Diazotróficas. Tese (Doutorado em Ciência do Solo)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife. 90 f.:il. 2016.
- LIMA, K. B. FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES, BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E ADUBAÇÃO FOSFATADA EM MUDAS DE MAMOEIRO. Tese

- (Mestrado) Produção vegetal. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Campos dos Goytacazes – RJ. p. 95. 2010.
- LIN, S.; ASIF HAMEED, A.; SHEN, F.; LIU, Y.; HSU, Y.; SHAHINA, M.; LAI, W.; YOUNG, C. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense*(1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. Springer International Publishing Switzerland. 105:1149–1162. DOI 10.1007/s10482-014-0176-6. 2014.
- LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M. & VAN DER LELIE D. Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit Rev Plant Sci* 21: 583–606. 2002.
- LODHI, M. A.; GUANG-NING, Y.; WEEDEN N.F.; REISCH, B. I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 12, p. 6-13, 1994.
- LOOMIS, W. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods in Enzymology*, 31, 528–545. 1974.
- LUCARINI, A. C.; SILVA, L. A.; BIANCHI, R. A. C. Um Sistema Para a Contagem Semi-automática de Microorganismos. *Pesquisa & Tecnologia FEI- N° 26*. 36-40 p. 2004.
- LUCHI, N.; CAPRETTI, P.; PAZZAGLI, M.; PINZANI, P. Powerful qPCR assays for the early detection of latent invaders: interdisciplinary approaches in clinical cancer research and plant pathology. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:5189–5204. p. doi: 10.1007/s00253-016-7541-5. 2016.
- LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.86, n.1, p.1-25, 2004.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. *Microbiologia de Brock*.14.ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Rio, v. 55, p. 417-4430, 1983.
- MCPHERSON, M. J. & MØLLER, S. G. PCR: THE BASICS. T&Finforma. ISBN: 0-4153-5547-8. 2. ed. 305.p. 2006.
- MICHELLON, E.; SANTOS, A. A. L.; RODRIGUES, J. R. A. Breve descrição do Proálcool e perspectivas futuras para o etanol produzido no Brasil. XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Rio Branco-AC. p. 16. 2008.
- MILANI, K. M. L.; MACHINESKI, O.; BALOTA, E. L. OCORRÊNCIA E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR. *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, N.13; 1345-1351.p. 2011.

- MONLLOR, N. F. Desarrollo y validación de un nuevo sistema de detección molecular basado en qPCR de *Legionella* spp. en muestras ambientales. Máster. Instituto Universitario del Agua y de las Ciências Ambientales. Universidad de Alicante. f. 63.il.:2013.
- MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2002. 626p.
- MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A. & CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae* 1(2): 74-99, 2010.
- MOSER, C.; GATTO, P.; MOSER, M.; PINDO, M.; VELASCO, R. Isolation of functional RNA from small amounts of different grape and apple tissues. *Molecular Biotechnology*, 26, 95-99. 2004.
- MULLIS, K. B. target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *AnnBiolClin* 48(8):579-582, 1990.
- MUOKI, R. C.; PAUL, A.; KUMARI, A.; SINGH, K.; KUMAR, S. An Improved Protocol for the Isolation of RNA from roots of Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Mol Biotechnol.* 52:82-88. 2012.
- NEVES, M. I. S. C. And LORENA, C. R. M. Desvendando aplicações da biotecnologia no ensino formal. 2009.
- NOLAN, T.; BERGKVIST, A.; CARVALLO, A.; CHERESON, P. H.; DALEY, L.; HEATH, A.; HIBBS, S.; HOGE, S.; JOURAVLENA, E.; KREADER, C.; MOHAMMED, M.; MUELLER, E.; RICHARDSON, G.; RUSSELL, T.; WARD, B.; WEBER, S. A.; WIKLANDER, M. A Technical Guide PCR TECHNOLOGIES: PCR, RT-PCR; qPCR, RT-qPCR, dPCR. SIGMA-ALDRICH. p.160. 2014.
- NOVACANA.COM. A produção de cana-de-açúcar no Brasil (e no mundo). Disponível em: www.novacana.com/cana-de-acucar/producao-cana-de-acucar-brasil-e-mundo/#producao-pelo-mundo. Acesso em: 02/07/2016.
- NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H. V.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. Fertilidade do solo. – Viçosa, MG; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 1017p.: il. p. 395-397. 2007.
- NUNES, C. F.; FERREIRA, J. F.; FERNANDES, M. C. N.; BREVES, S. S.; GENEROSO, A. L.; SOARES, B. D. F.; DIAS, M. S. C.; PASQUAL, M.; BOREM, A.; CANÇADO, G. M. A.; Otimização de um método para extração de DNA genômico a partir de folhas de morangueiro. *Ciência Rural*, v. 8, p. 1382-1389, 2011.
- NUTZ, S.; DÖLL, K.; and KARLOVSKY, P. Determination of the LOQ in real-time PCR by receiver operating characteristic curve analysis: application to qPCR assays for *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*. *Anal. Bioanal. Chem.* 401:717–726. doi:10.1007/s00216-011-5089-x. 2011.
- OLIVARES, F. L. Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. Híbrido) por bactérias endofíticas do gênero

- Herbaspirillum*. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997. p.344. Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo – UFRRJ, Itaguaí, RJ.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. In roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 21, p. 197-200, 1996.
- OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Colonização do tecido vascular por *Herbaspirillum* spp. em sorgo e cana-de-açúcar. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v. 18, Supl., p. 313, 1993.
- OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, p.59-61, 2003.
- OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; And BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant Soil*. 284:23-32. 2006.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; And BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plantlets. *Plant Soil* 242: 205–215. 2002.
- OLIVEIRA, C. A. ESTIMATIVAS DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM CANA-DE-AÇÚCAR POR $\delta^{15}\text{N}$. Dissertação (Mestrado) em Agricultura Tropical. Instituto Agrônomo, Campinas. 2012, 80 fls.
- OSEI, O.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; ZILLI, J. E.; BODDEY, R. M.; AHIABOR, B. D. K. ABAIDOO, R. C. & ROUWS, L. F. M. PCR assay for direct specific detection of *Bradyrhizobium* elite strain BR 3262 in root nodule extracts of soil-grown cowpea. *Plant Soil. Methods Paper*. DOI 10.1007/s11104-017-3271-4. 2017.
- PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 39, p. 225-258, 2001.
- PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 29, n. 8, p. 900-915, 1983.
- PAUL, E. A. and CLARK, F. E. 1996. *Soil Microbiology and Biotechnology*. Second ed. Academic Press. San Diego. CA. In: BELLONE, C. H. & BELLONE, S. C. Fijación biológica del nitrógeno atmosférico. 1ª ed. Tucumán: el autor, 2006. 223 p.; 24x16 cm.
- PEREIRA, T. P.; AMARAL, F. P.; DALL'ASTA, P.; BROD, F. C. A.; ARISI, A. C. M. Real-Time PCR Quantification of the Plant Growth Promoting Bacteria *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1 in Maize Roots. *Mol Biotechnol. Versão Online* In:(doi:10.1007/s12033-014-9742-4). p.11. 2014.

- PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. S.; SANTOS, C. L. R.; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. *Revista Ciência Agronômica*, v.44, n.2, p.363-370, 2013.
- PERIN, L. Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp). 2003, 68 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- PESSOA, D. D. V.; VIDAL M. S.; BALDANI, J. I. SIMÕES-ARAÚJO, J L. Validation of reference genes for RT-qPCR analysis in *Herbaspirillum seropedicae*. *Journal of Microbiological Methods*. 127 (2016) 193–196.
- PINHO, M. S. L. Pesquisa em Biologia Molecular: como fazer? *Rev bras Coloproct*, 26(3): 331-336. 2006.
- PIÑÓN, D.; CASAS, M.; BLANCH, M.; FONTANIELLA, B.; BLANCO, Y.; VICENTE, C.; SOLAS, M. T.; LEGAZ, M. E. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont produces a bacteriocin against *Xantomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Research in Microbiology*. Amsterdam. v. 153, p. 345-351, 2001.
- POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; QUESADA, D. M.; XAVIER, R. P.; COELHO, C. H. M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) para a cultura cana-de-açúcar no Brasil. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, document 144. 26 p. 2001.
- RABELLO, A.; PONTES, L. A.; ENK, M. J.; MONTENEGRO, S. M. L.; MORAIS, C. N. L. Diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular da Esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. Orgs. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 895-925. ISBN 978-85-7541-370-8. Disponível em <<http://books.scielo.org/id/37vww/pdf/carvalho-9788575413708-33.pdf>>. Acesso em: 30/06/2017.
- RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. (1997). Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In: REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. *Uso de Ferramentas Moleculares em Estudos da Diversidade de Microrganismos do solo*. Planaltina, DF. p.31. 2002.
- RADWAN, T. El-S. El-D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* ssp. *Symbiosis*, v.32:39-54, 2002.
- RAMOS, S. N. M.; SALAZAR, M. M.; PEREIRA, G. A. G.; EFRAIM, P. Plant and metagenomic DNA extraction of mucilaginous seeds. *MethodsX* 1. 225-228 p. 2014.
- REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de Bactérias Diazotróficas em Diferentes Genótipos de Cana-de-açúcar. *Pesq. Agropec. bras.* Brasília, DF. v. 35, n.5. p. 985-994, 2000.

- REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S. & REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados à *Brachiaria* spp. em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitorrhômio pela bactéria. R. Bras. Ci. Solo, 28:103-113. 2004a.
- REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Intra-specific diversity study of the nitrogen fixing bacterium *Azospirillum amazonense* isolated from different *Brachiaria* species. Symbiosis, v.36, p.41-56, 2004.
- REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. CRC Critical Reviews in Plant Science, Boca Raton, v. 19, p. 227-247, 2000.
- REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense*(BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366). Embrapa Agrobiologia/Circular técnica 30. Seropédica, RJ. 4 p. 2009.
- REIS, V. M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOLGEL, J.; STROFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, L.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v. 54, p. 2155-2162, 2004.
- REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.10, p.401-405, 1994.
- REIS, V. M.; PITARD, R. M.; Dourado, F. S.; Camacho, N. N.; VIDEIRA, S. S.; Camargo, A. B.; BOA SORTE, P. F.; VIDAL, M. S.; SCHWAB, S.; BALDANI, J. I. Caracterização morfo-fisiológica e molecular das estirpes diazotróficas do inoculante de cana-de-açúcar. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 280). ISSN: 1517-8498. p. 31. 2011.
- RIBEIRO, M. R.; NASCIMENTO, C. W. A.; FILHO, M. R. R.; CANTALICE, J. R. B. Tópicos em Ciência do Solo. ISSN: 1519-3934. Vol. VI. p. 204-270. 2009.
- RODENBUSCH, C. R. Análise de Vacinas Contra o Sorotipo 3 do Vírus da Doença de Marek por PCR em Tempo Real e Cultivo Celular. Dissertação (Mestrado) Ciências Veterinárias, na área de concentração de Microbiologia Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Porto Alegre-RS. 48 f.:il. 2006.
- RODRIGUES, L. S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M. & BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura de arroz inundado. Pesq. Agropec. Bras., 41:275-284, 2006.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, v.2, n.9, p.40-43, 1999.

- ROSSETTO, R.; DIAS, F. L. F. NUTRIÇÃO E ADUBAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR: indagações e reflexões. ENCARTE DO INFORMAÇÕES AGRONÔMICAS Nº 110 – JUNHO/2005. p 6-11.
- RUANO, G.; BRASH, D. E.; and KIDD, K. K. PCR: the first few cycles. *Amplifications* 7:1-4. 1991.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 ed., Cold Spring Harbor Press, v.2, p.8004-8102, 2001.
- SAMPAIO, E. V. S. B.; SALCEDO, I. H.; VICTORIA, R. L. & TRIVELIN, P. C. O. Redistribution of the nitrogen reserves of ¹⁵N enriched stem cuttings and dinitrogen fixed by 90-day-old sugarcane plants. *Plant Soil*, 108:275-279, 1988.
- SANTOS, C. L. R. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas em sorgo granífero, forrageiro e sacarino. Dissertação (Mestrado). Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 66 f.:il. 2010.
- SAUBIDET, M. I.; FATTA, N.; BARNEIX. The effect of inoculation with *Azospirillum brasiliense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant and Soil*, v.245, p.215-222, 2002.
- SCHMITTGEN, T. D.; LEE, E. J.; JIANG, J.; SARKAR, A.; YANG, L.; ELTON, T. S.; CHEN, C. “Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA.” *Methods* 44, 31-8, 2008.
- SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; PEREIRA, W.; JÚNIOR, J. B. C.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M. URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.47(2):261-268, 2012.
- SIGMA[®] (*Life Science*). qPCR Technical guide. p. 42. 2008. Disponível em, <<http://www.gene-quantification.de/SIAL-qPCR-Technical-Guide.pdf>> Acessado em: 04/07/2017.
- SIKA, K. C.; KEFELA, T.; ADOUKONOU-SAGBADJA, H.; AHOTON, L.; LAMINE BABA-MOUSSA, A. S.; BAPTISTE, L. J.; KOTCONI, S. O.; GACHOMO. E. A simple and efficient genomic DNA extraction protocol for large scale genetic analyses of plant biological systems. *Plant Gene* 1:43–45. 2015.
- SILVA, D. B. S.; RODRIGUES, L. M. C.; AMARAL, B. C.; SILVA, L. E.; OLIVEIRA, K. M. P.; GRISOLIA, A. B. A Quantidade de Células de Leveduras do Gênero *candida* pode Influenciar a Integridade e Quantidade de DNA Extraído? ENEPEX - Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão (UEMS/UFGD). 5º Epex UEMS e 8º Enepe UFGD. p. 6. 2014. Disponível em:< <http://eventos.ufgd.edu.br/enepex/anais/arquivos/256.pdf>> Acesso em: 16/07/2017.
- SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. O Setor Sucroalcooleiro e o Domínio Tecnológico. NAIPE, São Paulo, SP, p. 3 - 21, 01 jun. 2007.

- SOMMER, R.; and TAUZ, D. Minimal homology requirements for PCR primers. *Nucleic Acids Res.* 17, 6749, 1989.
- SOUZA, R. S. C.; OKURA, V. K.; ARMANHI, J. S. L.; JORRÍN, B.; LOZANO, N.; SILVA, M. J.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; ARAÚJO, L. M.; VERZA, N. C.; BAGHERI, H. C.; IMPERIAL, J & ARRUDA, P. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Scientific Reports* |6:28774| DOI: 10.1038/srep28774. 1-15. 2016.
- SPEROTTO, R. A. Protocolos e métodos de análise em laboratórios de biotecnologia agroalimentar e de saúde humana. Editora da Univates. Lajeado-RS. 329 p. 2014.
- STETS, M. I. Monitoramento de *Azospirillum brasilense* e estudo da diversidade bacteriana associada a raízes de trigo (*Triticum aestivum*). Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR. p. 109. 2013.
- STETS, M. I.; ALQUERES, S. M. C.; SOUZA, E. M.; DE OLIVEIRA, P. F.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. & CRUZ, L. M. Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 bacteria in wheat roots by strain-specific quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol.* 81:6700–6709. (2015).
- STEVENSON, F. J.; BREMNER, J. M.; HAUCK, R. D. & KEENEY, D. R., eds. Nitrogen in agricultural soils. Madison, American Society of Agronomy, 1982. p.651-688.
- STROPA, K. C. Enumeração Celular pela Quantificação Absoluta por PCR em Tempo Real de Culturas de *Bradirrizóbios*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal. Jaboticabal – São Paulo. F.il.: 108. 2009.
- TAUCCONNIER, R.; BASSEREAU, D. La canã de azucar. Barcelona: Aditorial Blume, 1975. 433 p. Coleção Agricultura Tropical. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, G. A. Cana-de-açúcar. Eds. Campinas: Instituto Agrônômico, 882 p. 2010.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. MICROBIOLOGIA. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, J.; FAIRCLOTH, B. C.; REMM, M.; ROZEN, S. G. *Primer3*—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40:e115–e115. 2012.
- URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C. de; RESENDE, A. S. de; WEBER, H. Efeito da queima, aplicação de N, irrigação e molibdênio na produção e acumulação de nitrogênio na cana de açúcar a longo prazo. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998. 13 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 72).
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S. & BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 56:105-114, 1992.

- URQUIAGA, S.; XAVIER, G. R.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; SÁ, J. M.; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. *Plant and Soil*, v. 356, n. 1-2, p. 5–21, 2012.
- VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 2008, 44(5):619–626.
- VAZE, A.; NERKAR, G.; PAGARIYA, M.; DEVARUMATH, R. M. And PRASAD, D. T. Isolation and PCR amplification of genomic DNA from dry leaf samples of sugarcane. *Int. J. Pharma Bio Sci.* 1(2):1-6. 2010.
- 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.
- VOET, D.; VOET, J. G. CHARLOTTE, W. P. *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.
- WALLACE, R.B.; SHAFFER, J.; MURPHY, R. F.; et al. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res*; 6: 3543-3557. 1979.
- WANG, H.; QI, M.; CUTLER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 21, n.17, p. 4153-4154, 1993.
- WANG, T. Y.; WANG, L.; ZHANG, J. H.; DONG, W. H. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genet. Mol. Res.* 10, 519–525. 2011.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, vol 171, pp 737 - 738, 1953.
- WHILEY, D. M.; SLOOTS, T. P. Sequence variation in primer targets affects the accuracy of viral quantitative PCR. *J Clin Virol.* 34(2):104–107. 2005.
- YAMADA, Y.; HOSHINO, K. And ISHIKAWA, T. The Phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequence 16S ribosomal RNA. The elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 61. 1244-1251. 1997.
- YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; & MADDEN, T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134-145. 2012.
- YEOH, Y. K.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; DENNIS, P. G.; ROBINSON, N.; RAGAN, M. A.; SCHMIDT, S. AND HUGENHOLTZ, P. The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying nitrogen fertilizer application. *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/1462-2920.12925 18(5), 1338–1351. p. 2016.

ANEXOS

A. Primers Desenhados

Tabela 23. Primers desenhados para as estirpes bacterianas que compõem o inoculante para cana-de-açúcar.

Espécies (Estirpe)	Primers	Sequências (5'-3')	Amplicon (pb)	
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> HCC103 (BR11504)	103C24F	ACCCACGCTCCTTCAGTCTC	171	
	103C24R	CGCCCTGTCTGTTCAGCACGG		
	103C26F	ACTCTCGCCGATCAGTGTCG	177	
	103C26R	TCAGCGGACTTACCCTTGAC		
	103C28F	GCCTGCGATAACTGGGTAGT	208	
	103C28R	CCATTTACTGAGTGCGCTCG		
	103C106F	GGCGTCCAAGATACGTCGTC	196	
	103C106R	GGACCCGTAAGTTGTTACC		
		Hr103C1870F	CATCACGACCTTCGTTGGCG	112
		Hr103C1870R	GCCGAGTCCGTTGATCTGGT	
		103C3251F	AATGATAGAGGGGATGGCGGC	109
		103C3251R	ACTCCTCGGGAGAACAACCG	
		103C3867F	TGGATGTCATGCTGCCTCGC	197
		103C3867R	GATTTGCCGGTGCTTGACGG	
		Hr103C3868F	TGGAGCTTGAGTACGCGACG	117
		Hr103C3868R	GCAGCAGTTCGTAAGTGGCG	
	103C4055F	TCCTGCGGAAAGATGTGGTG	208	
	103C4055R	GTGATGTAGCGGAGCCAAGG		
	Hr103C4062 F	TCCATCGCATCCTCCACTGC	188	
	Hr103C4062 R	ACGGGCGGTACAGTTTGGCG		
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54 (BR11335)	54C6369F	TGGCATCGACGTGACTGTAG	162	
	54C6369R	TACTTCCGTGCGAACATCAG		
	54C6391F	AGTTGCGTGAGCTTCTGAGC	170	
	54C6391R	AGCTGACTGGTCGCCATTAC		
	54C6396F	CTGCCGTACATCGACCACCG	195	
	54C6396R	CGGGGTAGTCGTTATAGAGCG		
	54C6398F	CTACCCTCAGCAGTGCCAGT	153	
	54C6398R	TCCTCGGCTGGATTCACTAC		
	54C6400F	GCTGTCCATTGAAGATAACCG	193	
	54C6400R	CGTCCCACCACACTGGAACG		
	54C6406F	GCATGGCATAACGAAGTCGGTC	102	
	54C6406R	CAATGAGTTGCCCGTCCGTG		
	54C6416F	GCAGTTGATTGACCGACCCG	142	
	54C6416R	CAGAAGCTCAATGTCCGCGC		
	54C6416F2	GTTGATTGACCGACCCGACG	142	
	54C6416R2	CGGCAGAAGCTCAATGTCCG		
	54C6403F	GCTGAACATCGAGGAGAGCG	241	
	54C6403R	TGACCACCGATAGCGAGGC		
	54CUmuDF	CGCACATCGTCGAGGGCGAC	109	
	54CUmuDR	CGCAGGCGCTTGATGGTGAA		
54CUmuCF	CTACGTTTCGTGCGAGCGTG	129		
54CUmuCR	GCGGCCATCTTGATGCCAG			
54CPeIEF	GCCTTTGGTTCATGCTGGTG	208		
54CPeIER	GGCTGCGAAGAGACACTGGG			

	54CphageEndoF	ATTCACGCTCCCTCGACGAC	186
	54CphageEndoR	CGGGCTTGGCGTTGGTGACG	
<i>Paraburkholderia tropica</i> Ppe8^T (BR11366^T)	Pt8C14F2	GATGCCTTTGCTTCCGGTGC	111
	Pt8C14R2	CCGCTAGGGCTCCCTAATCC	
	Pt8C3641F	ATCGAATATCGCCGGGTCGG	125
	Pt8C3641R	AGACCGAGACGTTTCGCAGAG	
	8C41F	TTTCAGCAAGCAAGACCCGC	146
	8C41R	TCCTGGTAATGACGAGCGCC	
	8C3622F	GAACTGCACGAGTTTGGGCG	151
	8C3622R	CTGGAACACGTACCAGCCGA	
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5^T (BR11281^T)	Gd5C70F2	CACCGGGACAGGATTGGACC	188
	Gd5C70R2	TATGATGCGCCCGTCTACCC	
	5C8F	GACGGTCGCTTGGAACCTTG	127
	5C8R	GTCATGGGGGAGGCTCTTG	
	5C8F2	ACGTCCCGGATTTCCATCGG	165
	5C8R2	CTGTGGCAAGGTTCCAAGCG	
	Gd5C4525F	GCCTTCCCAAGGTCGCTA	143
	Gd5C4525R	TGGTCCCAGTCGAAACCGC	
<i>Nitrospirillum amazonense</i> CbAmc (BR11145)	NaCbCgyrAF	GCTGTCCGATTTACCAAC	68
	NaCbCgyrAR	ATTCACCCTCTTCCTCCAG	
	CbCgmkF	CTGGTCAGCATCTTCATCC	127
	CbCgmkR	AGTGGCTCATCTCGTTGG	
	CbCidhCF	CTACGAGCACCGCCTGAT	129
	CbCidhCR	AGAGAGCCGAAACCCTGG	
	CbCLSUF	AACATCATCGTCCGCCAG	78
	CbCLSUR	GAAAATGGTGTGGTCCTTGC	
	CbCGreAF	GAGCGACATCAAGAACGG	136
	CbCGreAR	GAAGGCGATCTCCACGAT	
	CbCtipAF	GCCTATGAGCCCGTCTGG	141
	CbCtipAR	GGAACCGCCATATAAGATGC	
	CbCglyAF	CTGGGCAAGAAGATCAACTC	120
	CbCglyAR	GTATTCTTGAACCTCGGGC	
CbCrecAF	GAACTGGAAGGCGAGATG	89	
CbCrecAR	GAGATGGACGAGGTCAGC		

B. Produtos de PCR dos Testes de Primers para as Bactérias do Inoculante

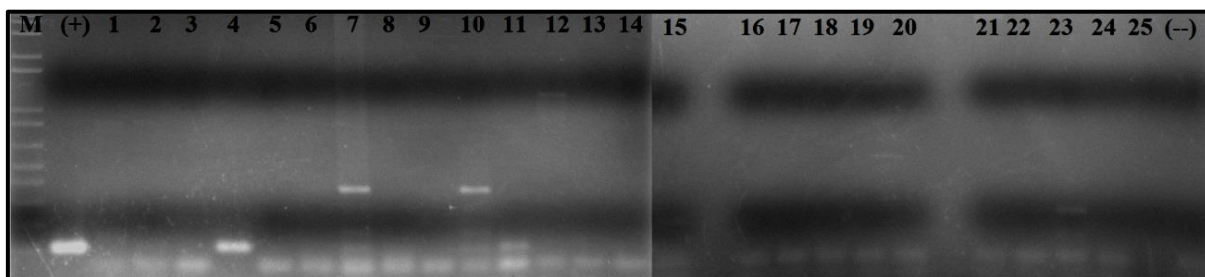


Figura 33. Produto de PCR em gel de agarose 2% para teste dos primers desenhados a partir do contig 1870 do genoma da estirpe HCC103, dentro e fora da espécie. M- Marcador molecular; de 1 a 5 estirpes de *H. rubrisubalbicans*; de 6 a 10 estirpes de *H. seropedicae*; de 11 a 15 estirpes de *P. tropica*; de 16 a 20 estirpes de *G. diazotrophicus*; de 21 a 25 estirpes de *N. amazonense* e (-) controle negativo.

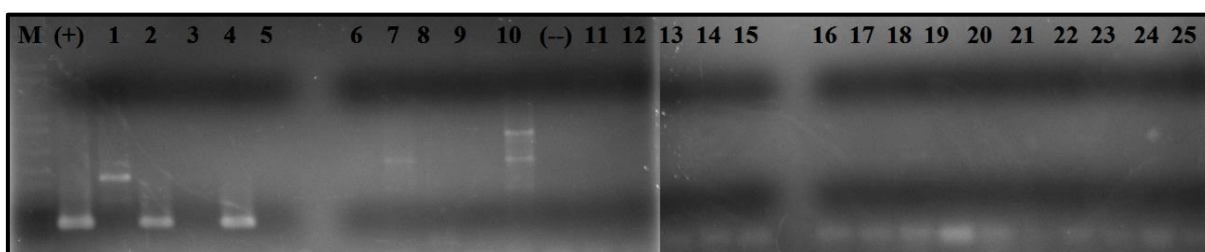


Figura 34. Produto de PCR em gel de agarose 2% para teste dos primers desenhados a partir do contig 3867 para a estirpe HCC103, entre estirpes bacterianas. M- Marcador molecular; de 1 a 5 estirpes de *H. rubrisubalbicans*; de 6 a 10 estirpes de *H. seropedicae*; de 11 a 15 estirpes de *P. tropica*; de 16 a 20 estirpes de *G. diazotrophicus*; de 21 a 25 estirpes de *N. amazonense* e (-) controle negativo.

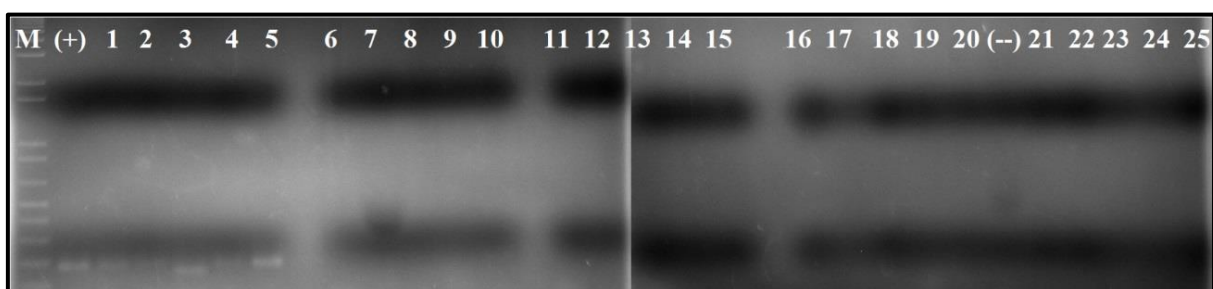


Figura 35. Produto de PCR em gel de agarose 2% para teste dos primers desenhados a partir do contig do gene *phageEndo* para a estirpe HRC54, entre estirpes de bacterianas. M- Marcador molecular; de 1 a 5 estirpes de *H. seropedicae*; de 6 a 10 estirpes de *H. rubrisubalbicans*; de 11 a 15 estirpes de *P. tropica*; de 16 a 20 estirpes de *G. diazotrophicus*; de 21 a 25 estirpes de *N. amazonense* e (-) controle negativo.

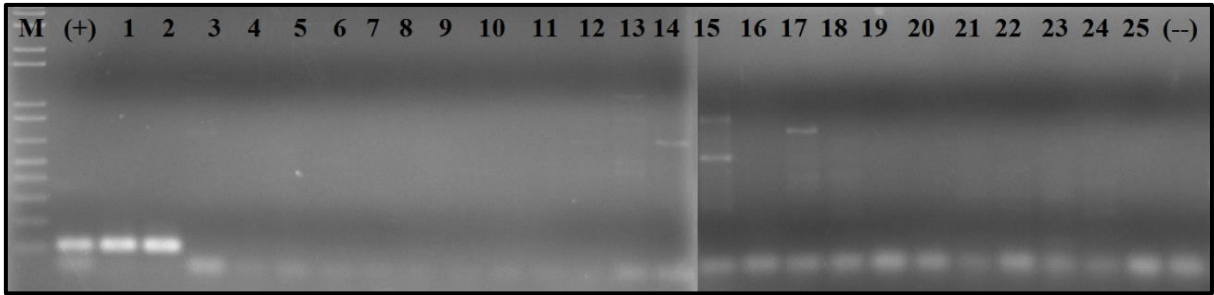


Figura 36. Produto de PCR em gel de agarose 2% para teste dos primers desenhados a partir do contig 14/2 para a estirpe Ppe8^T, entre estirpes de bactérias. M- Marcador molecular; de 1 a 5 estirpes de *P. tropica*; de 6 a 10 estirpes de *H. rubrisubalbicans*; de 11 a 15 estirpes de *H. seropedicae*; de 16 a 20 estirpes de *G. diazotrophicus*; de 21 a 25 estirpes de *N. amazonense* e (-) controle negativo.

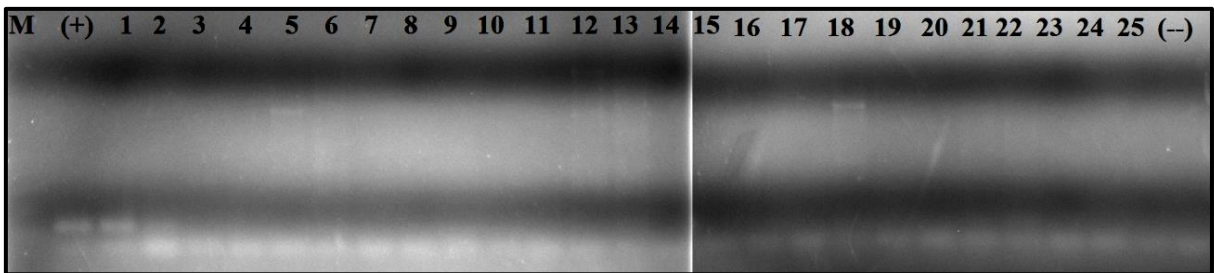


Figura 37. Produto de PCR em gel de agarose 2% para teste dos primers desenhados a partir do contig 3641 para a estirpe Ppe8^T, entre estirpes de bactérias. M- Marcador molecular; de 1 a 5 estirpes de *P. tropica*; de 6 a 10 estirpes de *H. rubrisubalbicans*; de 11 a 15 estirpes de *H. seropedicae*; de 16 a 20 estirpes de *G. diazotrophicus*; de 21 a 25 estirpes de *N. amazonense* e (-) controle negativo.

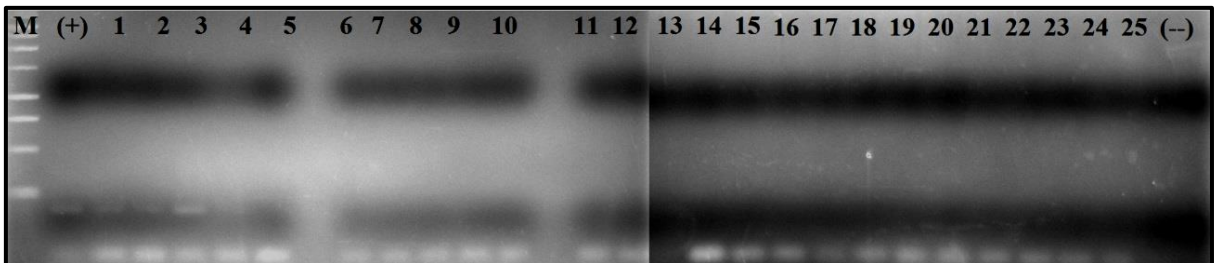


Figura 38. Produto de PCR em gel de agarose 2% para teste dos primers desenhados a partir do contig 70 para a estirpe Pal5^T, entre estirpes de bactérias. M- Marcador molecular; de 1 a 5 estirpes de *G. diazotrophicus*; de 6 a 10 estirpes de *H. rubrisubalbicans*; de 11 a 15 estirpes de *H. seropedicae*; de 16 a 20 estirpes de *P. tropica*; de 21 a 25 de *N. amazonense* e (-) controle negativo.

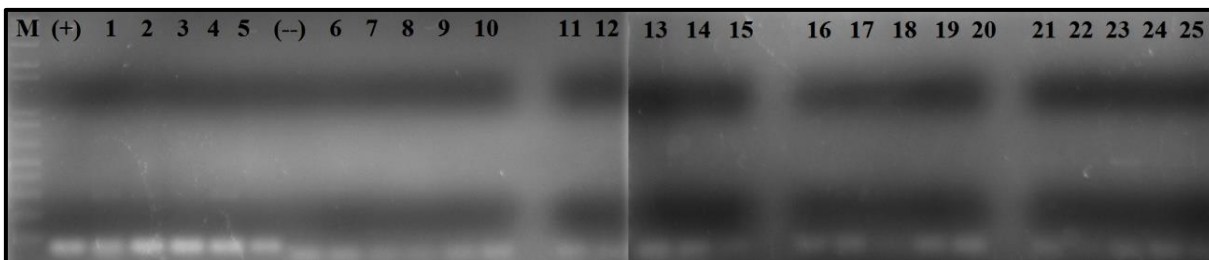


Figura 39. Produto de PCR em gel de agarose 2% para teste dos primers desenhados a partir do *contig* gene *gyrA* para a estirpe CbAmc, entre estirpes de bactérias. M- Marcador molecular; de 1 a 5 estirpes *N. amazonense*; de 6 a 10 estirpes *H. rubrisubalbicans*; de 11 a 15 estirpes de *H. seropedicae*; de 16 a 20 estirpes de *P. tropica*; de 21 a 25 estirpes de *G. diazotrophicus* e (-) controle negativo.

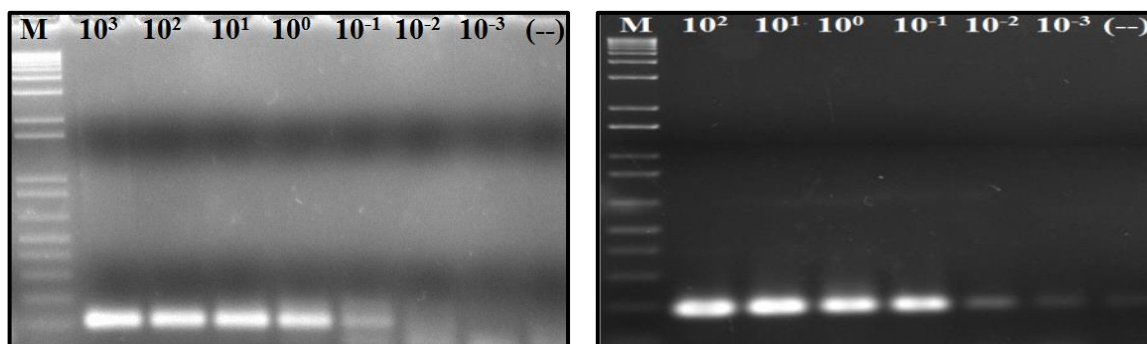


Figura 40. Produtos 117 pb (esquerda) e 188 pb (direita) da PCR para amostras de DNA alvo em diluição seriada (10x) utilizando os primers Hr103C3868 e Hr103C4062, respectivamente. Eletroforese em gel de agarose 2%.

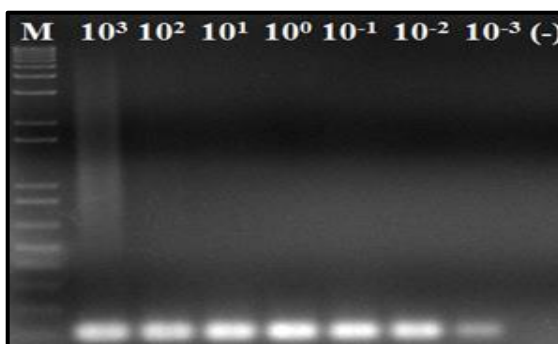


Figura 41. Produto (125 pb) da PCR para amostras de DNA alvo em diluição seriada (10x) utilizando os primers Pt8C3641. Eletroforese em gel de agarose 2%.

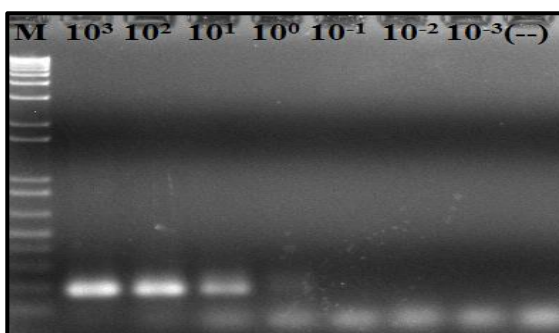


Figura 42. Produto (188 pb) da PCR para amostras de DNA alvo em diluição seriada (10x) utilizando os primers Gd5C70. Eletroforese em gel de agarose 2%.

C. Contagem por Microgota em Placa das Bactérias do Inoculante

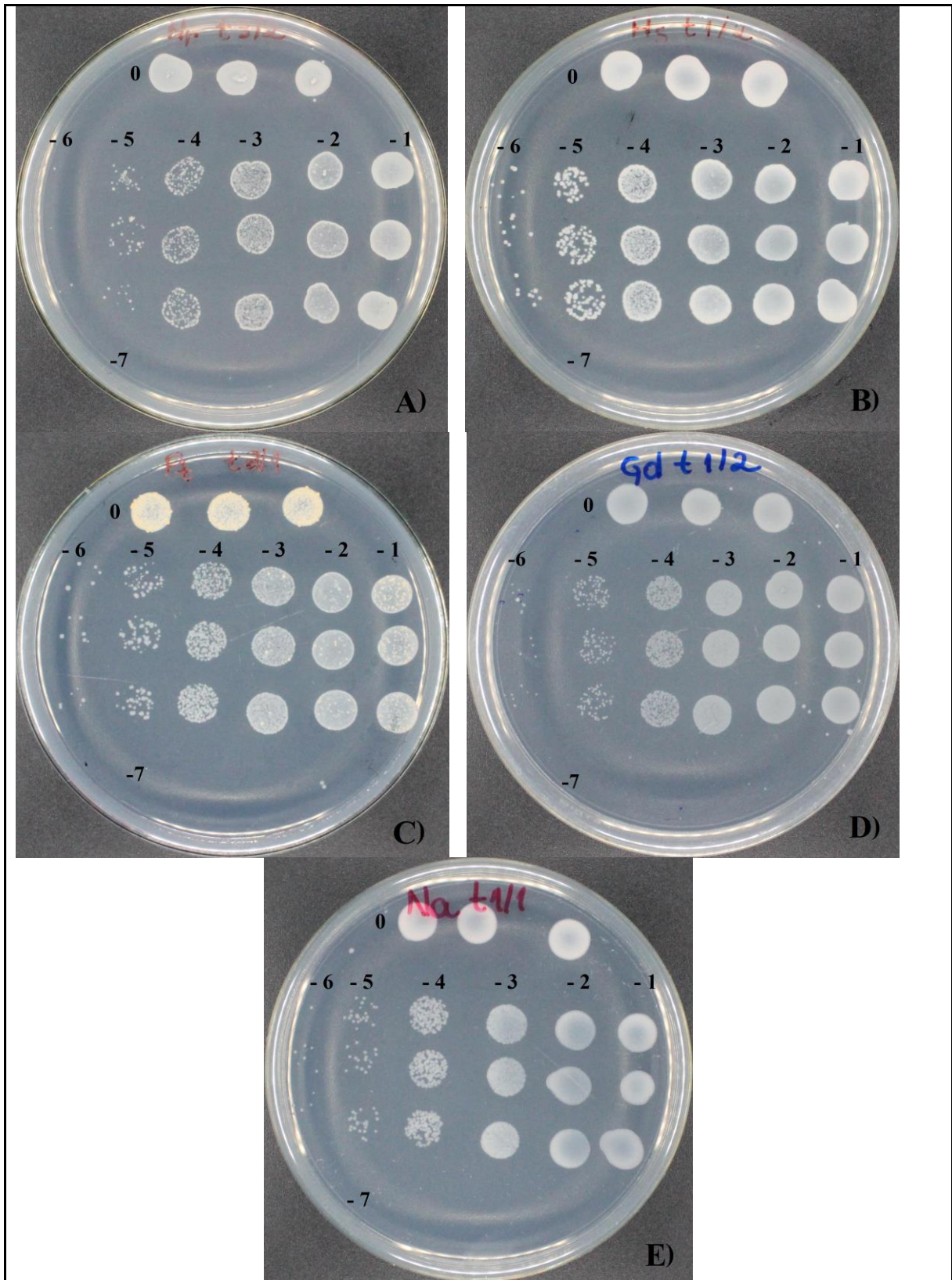


Figura 43. Placas contendo colônias de bactérias do inoculante para cana-de-açúcar utilizadas para contagem. **A)** *H. rubrisubalbicans*; **B)** *H. seropedicae*; **C)** *P. tropica*; **D)** *G. diazotrophicus* e **E)** *N. amazonense*.

D. Teste de Life and Death

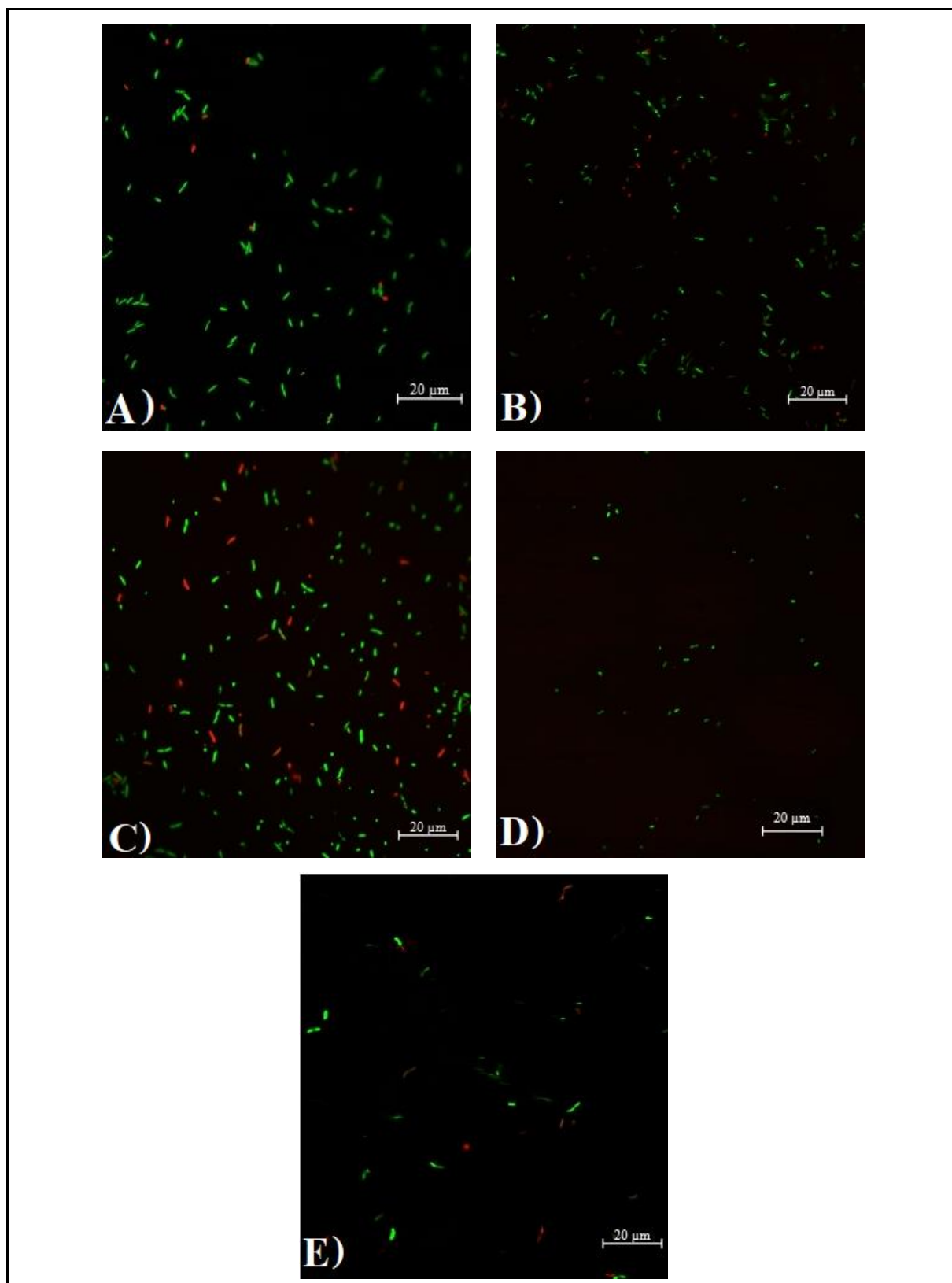


Figura 44. Teste *life and death* para as estirpes do inoculante crescidas em meio líquido DYGS. Bactérias vivas (verde) e mortas (vermelha). **A)** *H. rubrisubalbicans*; **B)** *H. seropedicae*; **C)** *P. tropica*; **D)** *G. diazotrophicus* e **E)** *N. amazonense*.

E. Resultados das Contagens em Câmara de Neubauer e Microgota Versus qPCR

Tabela 24. Resultados médios em número de células mL⁻¹ das contagens de bactérias do inoculante para cana-de-açúcar realizadas por meio da Câmara de Neubauer e qPCR.

Estirpes	Repetições biológicas					
	R1		R2		R3	
	Neubauer	qPCR	Neubauer	qPCR	Neubauer	qPCR
HCC103	2,075.10 ⁹	7,377.10 ⁹	1,250.10 ⁹	9,677.10 ⁹	1,775.10 ⁹	2,283.10 ⁹
HRC54	2,050.10 ⁹	3,386.10 ⁹	3,250.10 ⁹	2,050.10 ⁹	2,675.10 ⁹	2,343.10 ⁹
Ppe8^T	2,875.10 ⁹	7,595.10 ⁷	4,425.10 ⁹	5,632.10 ⁷	3,550.10 ⁹	8,598.10 ⁷
Pal5^T	7,500.10 ⁸	3,223.10 ⁸	1,325.10 ⁹	8,863.10 ⁸	1,675.10 ⁹	6,233.10 ⁸
CbAmc	1,175.10 ⁹	1,407.10 ⁹	7,250.10 ⁸	8,850.10 ⁸	1,000.10 ⁹	1,313.10 ⁹

Tabela 25. Resultados médios em número células mL⁻¹ de meio de cultivadas contagens de bactérias do inoculante para cana-de-açúcar realizadas por meio da contagem por Microgota em placa e qPCR.

Estirpes	Repetições biológicas								
	R1			R2			R3		
	D.O.	Placa	qPCR	D.O.	Placa	qPCR	D.O.	Placa	qPCR
HCC103	0,585	2,166.10 ⁸	3,153.10 ⁹	0,580	1,700.10 ⁸	8,341.10 ⁹	0,576	2,333.10 ⁸	1,105.10 ⁹
HRC54	0,453	1,233.10 ⁸	9,040.10 ¹⁰	0,418	8,000.10 ⁸	2,560.10 ¹⁰	0,373	6,333.10 ⁸	3,091.10 ¹⁰
Ppe8^T	0,817	2,900.10 ⁸	4,120.10 ⁹	0,880	3,600.10 ⁸	4,160.10 ⁸	0,835	4,633.10 ⁸	1,090.10 ⁹
Pal5^T	0,420	5,630.10 ⁸	1,877.10 ⁷	0,447	3,833.10 ⁸	1,857.10 ⁷	0,347	5,100.10 ⁸	6,574.10 ⁷
CbAmc	0,796	2,166.10 ⁸	2,030.10 ⁸	0,821	3,200.10 ⁸	2,170.10 ⁸	0,714	3,100.10 ⁸	8,650.10 ⁹

F. Solução de Hoaglands

Tabela 26. Componentes da solução de Hoaglands.

Para Solução Estoque de 1000 mL pH 6,5-7,0	
KH ₂ PO ₄ (1M)	1,0 mL
K ₂ HPO ₄ (1M)	1,0 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O (1M)	2,0 mL
CaSO ₄ .2H ₂ O	0,172 g
Solução de micronutrientes completos	1,0 mL
Solução de Ferro*	1,0 mL

* 1,21 g Na₂H₂EDTA/100 mL de água destilada e 0,6 g FeCl₃.6H₂O.

G. Protocolo para a Extração de DNA Total de Raízes de Cana-de-açúcar

1. Antes de macerar totalmente as raízes, elas podem ser pré-maceradas e separadas das camadas externas escuras, usando peneiras com malha de náilon e auxílio de N₂ líquido;
2. Usar de 300-350 mg do tecido raiz macerado com auxílio de N₂ líquido, alocado em micro tubos de 2 mL;
3. Adicionar 700-800 µL do tampão I (**Subitem 4.13.2**) pré-aquecido a 65° C e deixar em banho-maria de 30 a 160 min. O 2-β-mercaptoethanol deve ser adicionado ao tampão pré-aquecido a 65°C em um frasco a parte conforme o volume de trabalho.
4. Adicionar 700-800 µL de clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 (v:v), vortexar até obter uma amostra totalmente homogênea e centrifugar por 10 min em rotação máxima;
5. Adicionar 300 µL do tampão II (**Subitem 4.13.2**) ao recuperado (sobrenadante) na fase anterior, homogeneizar por 20 s no vortex a 1000 rpm;
6. As amostras devem ser tratadas com proteinase K 1mg mL⁻¹ (v:v) por 60 min a 37°C;
7. Adicionar SDS para uma concentração final de 1% (v:v) nas amostras, invertendo as amostras 10 vezes e incubar a 65°C/30 min;
8. Centrifugar as amostras por 2 minutos sob 10000 rpm, coletar o sobrenadante e transferir para um novo micro tubo de 2 mL;
9. Adicionar Fenol em volume igual ao recuperado na fase anterior, posterior a isso, misturar por inversão suave e centrifugar a 10000 rpm por 1 min, se necessário repetir esse passo mais de uma vez;
10. Recupere o sobrenadante e adicionar clorofórmio/álcool isoamílico 24:11 (v:v) em volume igual, misturar por inversão suave e centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos;
11. Adicionar Isopropanol ou álcool absoluto em volume igual ao recuperado e incubar as amostras por 20 minutos a 4°C ou em gelo;
12. Centrifugar a amostra por 5 min a 10.000 rpm e descartar o sobrenadante;
13. Lavar o precipitado (*pellet*) com 500 µL de álcool 70% e centrifugar por 5 min/10.000 rpm;
14. Deixar o *pellet* secar por 60-90 min em fluxo de ar ligado;
15. Reidratar o *pellet* em 50 µL de TE buffer ou água ultrapura, estocar amostra a -20°C.

H. Análise de Variância dos Experimentos I e II

Tabela 27. ANOVA com $P < 0,05$ para os resultados do experimento I.

Fatores	Gl	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Coleta	2	64,182	32,091	145,162	0,0000*
Variedade	1	1,245	1,245	5,634	0,0183*
Bactéria	4	544,521	136,130	617,776	0,0000*
Condição	1	0,200	0,200	0,905	0,3423
Dose	1	0,238	0,238	1,079	0,2999
Bloco	2	1,382	0,691	3,127	0,0455*
Coleta*Variedade	2	0,844	0,422	1,909	0,1502
Coleta*Bactéria	8	74,122	9,265	42,911	0,0000*
Coleta*Condição	2	0,294	0,147	0,665	0,5150
Coleta*Dose	2	0,854	0,427	1,933	0,1467
Variedade*Bactéria	4	1,088	0,272	1,231	0,2981
Variedade*Condição	1	0,023	0,0239	0,108	0,7424
Variedade*Dose	1	0,146	0,146	0,665	0,4156
Bactéria*Condição	4	0,643	0,160	0,728	0,5736
Bactéria*Dose	4	0,159	0,039	0,180	0,9485
Condição*Dose	1	0,052	0,052	0,239	0,6256
Coleta*Variedade* Bactéria	8	1,036	0,129	0,586	0,7891
Coleta*Variedade*Condição	2	0,047	0,023	0,107	0,8984
Coleta*Variedade*Dose	2	0,726	0,363	1,644	0,1952
Variedade* Bactéria*Condição	4	0,789	0,197	0,893	0,4688
Variedade*Bactéria*Dose	4	0,193	0,048	0,219	0,9277
Bactéria*Condição*Dose	4	0,129	0,032	0,147	0,9643
Coleta*Variedade*Bactéria*Condição	8	0,914	0,114	0,517	0,8433
Coleta*Variedade*Bactéria*Dose	8	1,011	0,126	0,572	0,8005
Variedade* Bactéria*Condição*Dose	4	0,202	0,050	0,228	0,9223
Coleta*Variedade*Bactéria*Condição*Dose	8	1,112	0,139	0,629	0,7534
Erro	268	59,025	0,220		
Total corrigido	359	755,190			
CV(%) = 14,19					
Média Geral = 3,3129			Número de observações = 360		

Tabela 28. ANOVA com $P < 0,05$ dos resultados do experimento II.

Fatores	GI	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Coleta	2	9,6714	4,8357	29,433	0,0000*
Variedade	1	4,8528	4,8528	29,537	0,0000*
Bactéria	4	267,1555	66,7888	406,511	0,0000*
Tecido	1	49,3055	49,3055	300,098	0,0000*
Condição	1	0,3747	0,3747	2,281	0,1320
Bloco	2	6,8779	3,4389	20,931	0,0000*
Coleta*Variedade	2	0,1129	0,0564	0,344	0,7093
Coleta*Bactéria	8	5,6671	0,7083	4,312	0,0001*
Coleta*Tecido	2	3,2904	1,6452	10,014	0,0001*
Coleta*Tratamento	2	0,0719	0,0359	0,219	0,8034
Variedade*Bactéria	4	3,0290	0,7572	4,609	0,0013*
Bactéria*Tecido	4	34,3762	8,5940	52,308	0,0000*
Bactéria*Tratamento	4	18,3658	4,5914	27,946	0,0000*
Coleta*Variedade* Bactéria	8	1,9416	0,2427	1,477	0,1649
Coleta*Variedade*Bactéria* Tecido	8	1,1248	0,1406	856	0,5544
Coleta*Variedade* Bactéria*Tratamento	8	1,5106	0,1888	1,149	0,3301
Variedade*Bactéria* Tecido*Tratamento	4	1,4886	0,3721	2,265	0,0623
Erro	294	48,3035	0,1642		
Total corrigido	359	457,5210			
CV(%) = 7,9					
Média Geral = 5,1149236		Número de observações = 360			

I. Dendogramas Gerados a partir de Perfil BOX-PCR

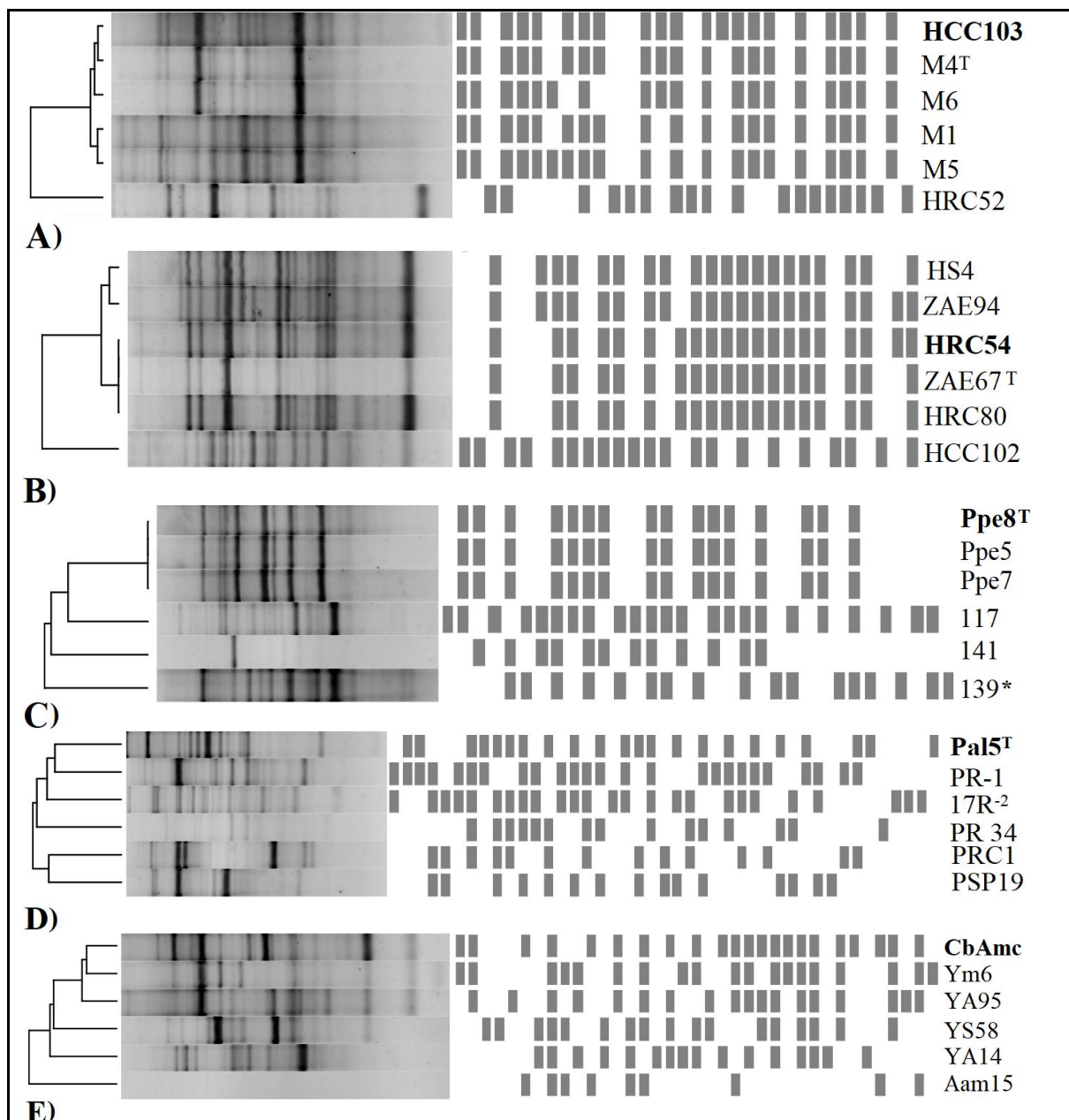


Figura 45. Dendograma gerado a partir do perfil BOX-PCR de estirpes pertencentes a espécies que compõem o inoculante para cana-de-açúcar. Espécies: **A)** *H. rubrisubalbicans*; **B)** *H. seropedicae*; **C)** *P. tropica*; **D)** *G. diazotrophicus* e **E)** *N. amazonense*. *Estirpe pertencente a espécie *Paraburkholderia vietinamensis*. Parâmetros: Jaccard (Tol. 1,0 - 1,0) % (H>0,0; S>0,0) % (10,0 - 95,0) %.

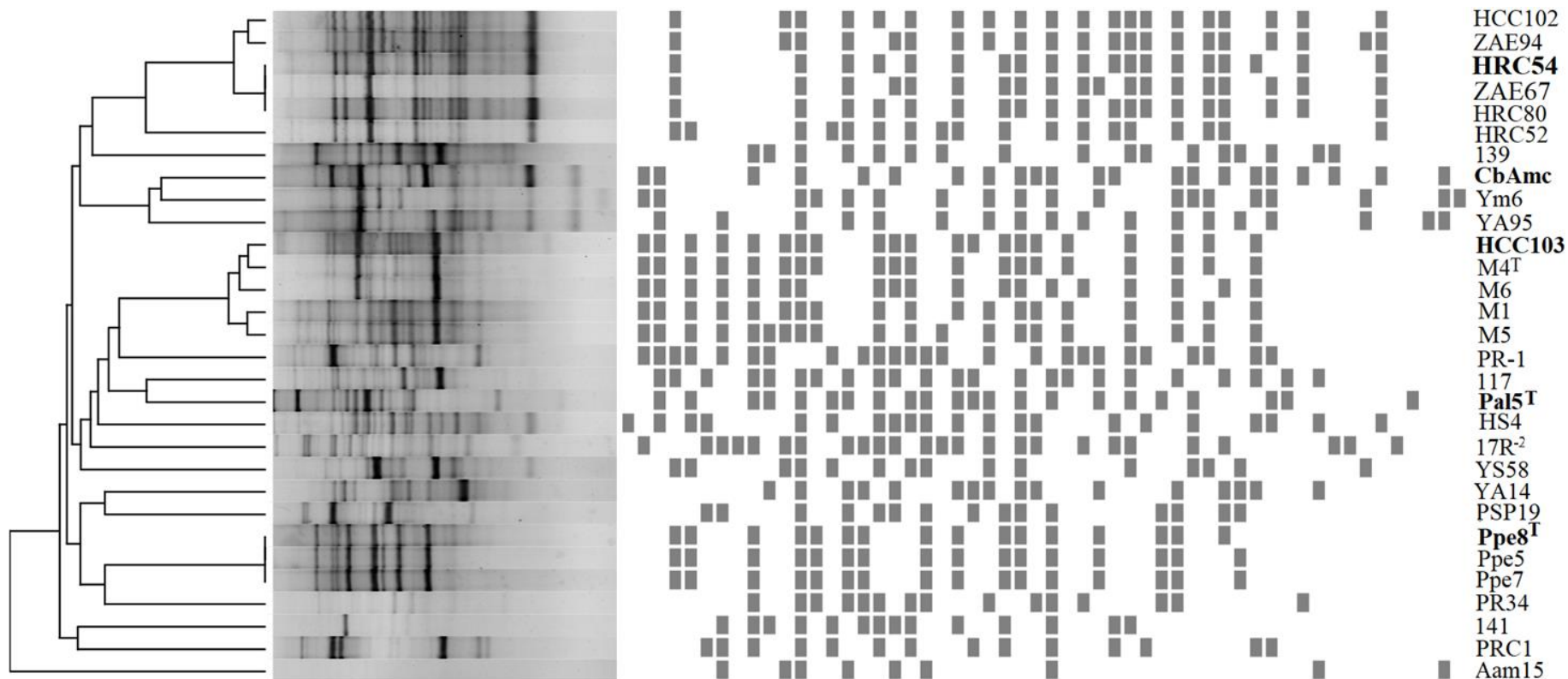


Figura 46. Dendograma geral a partir do perfil BOX-PCR de todas as estirpes com amostras de DNA utilizadas para selecionar primers específicos para as bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar. Parâmetros: *Jaccard* (Tol. 1,0 - 1,0) % (H>0,0; S>0,0) % (10,0 - 95,0) %.

J. Árvores Filogenéticas com Base no Gene 16S

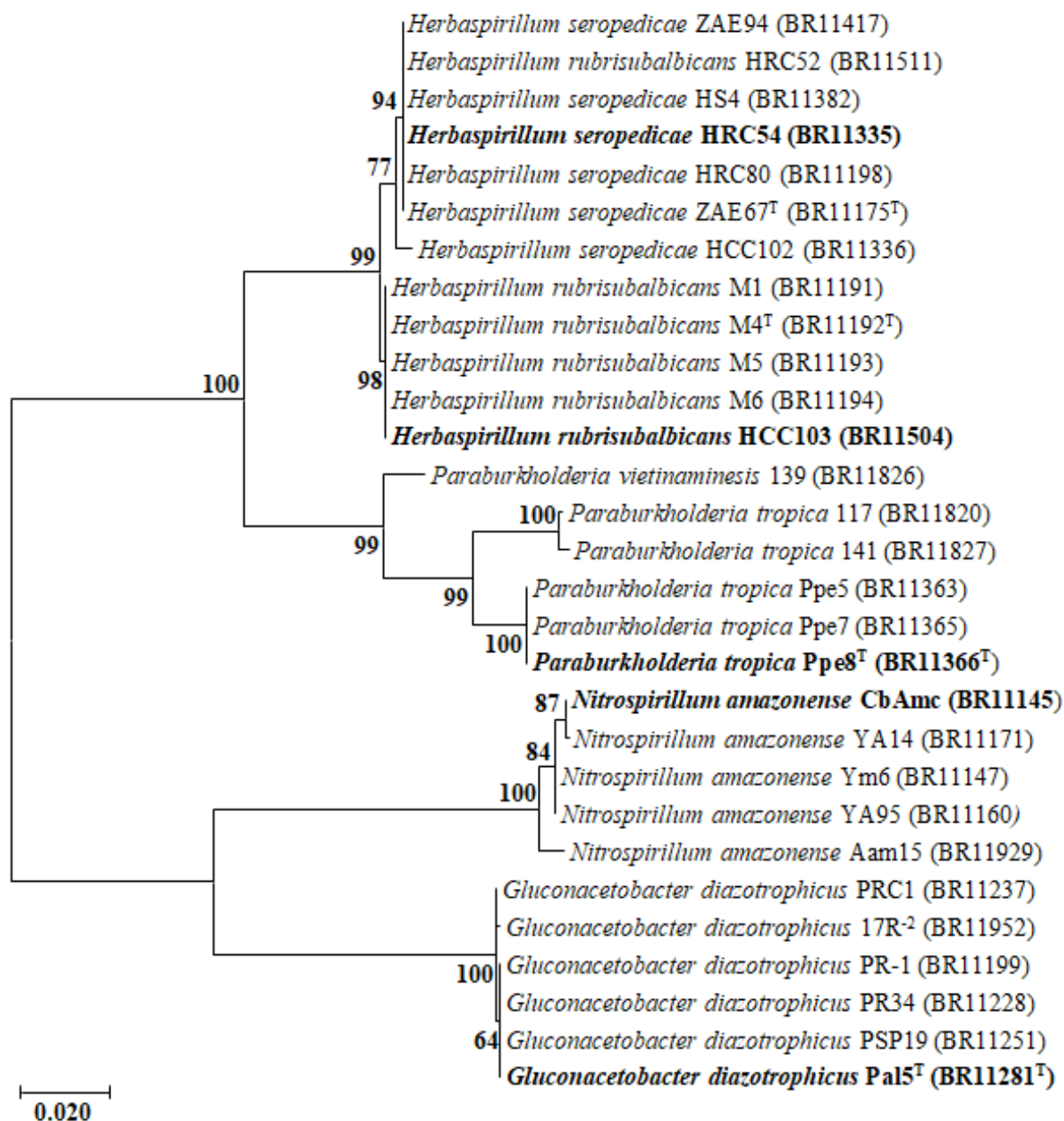


Figura 47. Árvore Filogenética a partir da comparação entre seqüências do gene 16S rDNA de todas as estirpes com amostras de DNA utilizadas para selecionar primers específicos para as bactérias que compõem o inoculante para cana-de-açúcar nesse trabalho. Método *Neighbor-Joining* baseado na comparação de 1363 pb de cada seqüência. *Bootstrap* com 1000 repetições. Distância evolucionária computada pelo método *Kimura 2-parameter*.

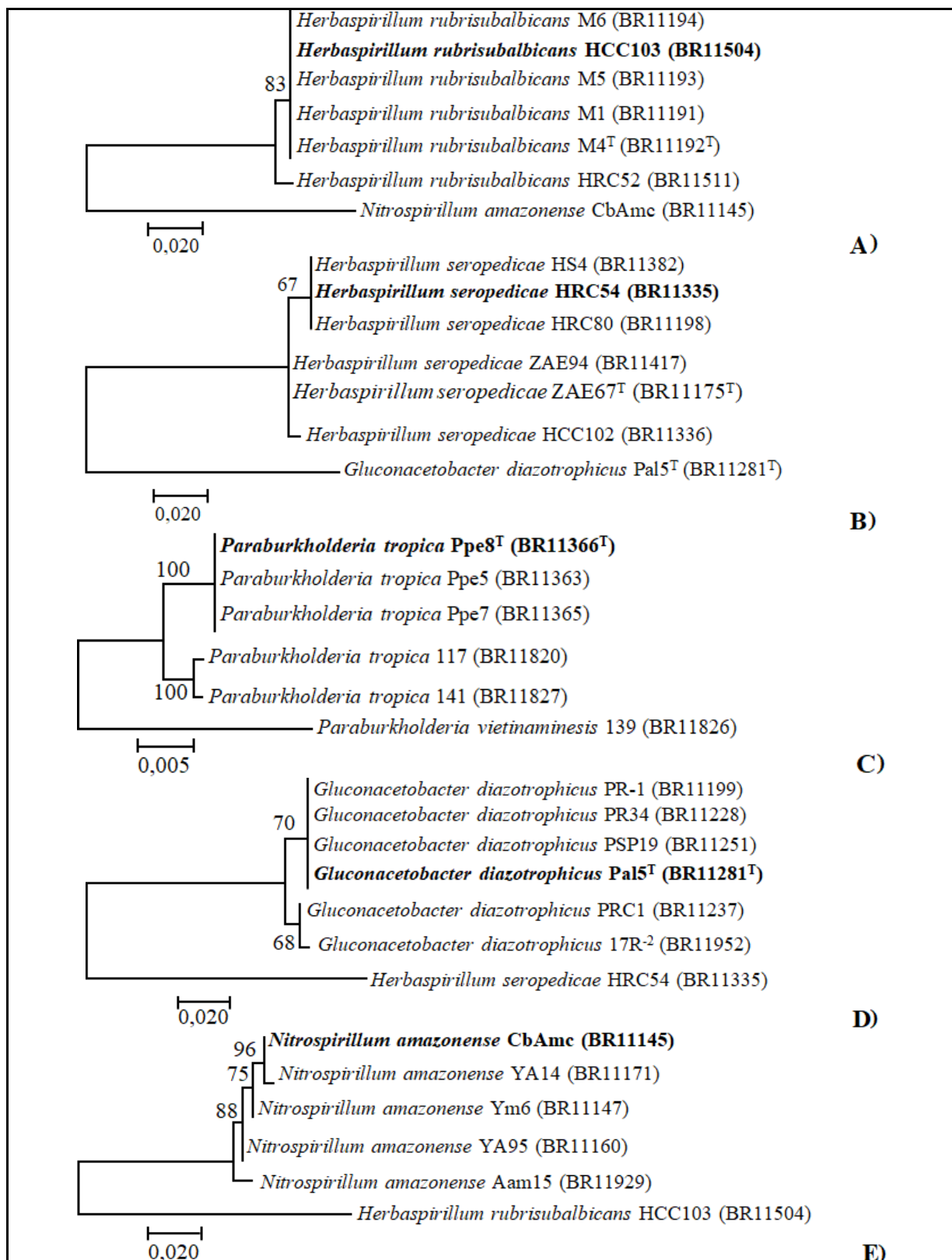


Figura 48. Árvore Filogenética com base na comparação das sequências do gene 16S rDNA das estirpes pertencentes a espécies que compõem o inoculante para cana-de-açúcar. Espécies: **A)** *H. rubrisubalbicans*; **B)** *H. seropedicae*; **C)** *P. tropica*; **D)** *G. diazotrophicus* e **E)** *N. amazonense*. Método *Neighbor-Joining* baseado na comparação de 1363 pb de cada sequência. *Bootstrap* com 1000 repetições. Distância evolucionária computada pelo método *Kimura 2-parameter*.