

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

COMPARAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA  
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESTIRPES RECOMENDADAS PARA  
PRODUÇÃO DE INOCULANTES PARA SOJA, MILHO E TRIGO

**MANUELA BRUXEL**

Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia

(UERGS)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre na Área de Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

**Porto Alegre, RS, Brasil, 2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

COMPARAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA  
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESTIRPES RECOMENDADAS PARA  
PRODUÇÃO DE INOCULANTES PARA SOJA, MILHO E TRIGO

**Manuela Bruxel**  
Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia

**Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá**  
Orientador

**Porto Alegre, RS, Brasil, 2012**

## CIP - Catalogação na Publicação

Bruxel, Manuela

COMPARAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESTIRPES RECOMENDADAS PARA PRODUÇÃO DE INOCULANTES PARA SOJA, MILHO E TRIGO / Manuela Bruxel. -- 2012.

88 f.

Orientador: Enilson Luiz Saccol Sá.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Rizóbios. 2. Metodologia. 3. Análise molecular.  
I. Sá, Enilson Luiz Saccol , orient. II. Título.

“Não há nada que seja maior evidência de insanidade  
do que fazer a mesma coisa, dia após dia,  
e esperar resultados diferentes”.  
*Einsten*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais Loni Brandt Bruxel e Ademir Bruxel e minha irmã Caroline Bruxel pelo apoio incondicional, pelo amor dedicado, pelas palavras de conforto, pelos momentos de união. AMO VOCÊS MAIS DO QUE TUDO! Também não poderia esquecer da minha madrinha Lia Brandt Funcke que me ensinou a ser “estudadeira”.

Ao meu orientador Enilson Luiz Saccol de Sá, pelos conhecimentos passados, pela amizade, pelas palavras rigorosas, mas sempre construtivas e principalmente pela paciência com a conclusão deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Andréia Bins, André Nunes, Camille Granada, Gleidson Rieff, Leandro Hahn, Márcio Silveira, Marcos Stroschein, Neemias Santos, Rafael Lima, Rafael Machado, Raquel Damasceno, Suélen Oldra, Thaís Cabral e William Rosa, pelos momentos de discussão intelectual, de apoio, de descontração e ao enriquecedor café depois do almoço. Obrigada pela amizade.

Ao PPGMAA, pelos conhecimentos a mim oferecidos e pelas novas amizades. Um agradecimento mais que especial às amigas Francielle Bucker, Priscila Ribas e Simone Pieniz.

Aos amigos de Santa Cruz, que sempre presentes, me fazem ser uma pessoa mais feliz.

Aos amigos da UERGS, fonte das melhores piadas biológicas.

Ao Éder Kinast, meu amor, pela compreensão, estímulo e convivência. Minha inspiração na vida pessoal e acadêmica.

Ao CNPq e ao MAPA, pelo auxílio financeiro.

À FEPAGRO, em especial à Eliane Bangel.

Ao prof. Fábio Pedrosa pelas estirpes de *Azospirillum* sp.

Aos novos amigos da SCIT, em especial a Marinês Steffanello, minha parceira de serão.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para a conclusão desta etapa na minha vida.

# COMPARAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESTIRPES RECOMENDADAS PARA PRODUÇÃO DE INOCULANTES PARA SOJA, MILHO E TRIGO

Autora: Eng. Biop. Manuela Bruxel

Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá

## <sup>1</sup>RESUMO

O Brasil é o segundo maior produtor de inoculantes do mundo e possui uma das legislações mais rigorosas para qualidade de inoculantes, entretanto com o grande desenvolvimento de novas estirpes e produtos, novas metodologias de análise dos produtos devem ser pesquisadas visando melhor qualidade e praticidade. A utilização de métodos de análise de perfis genômicos, direto do produto inoculante, para a caracterização dos microrganismos recomendados para inoculação no País foi o objetivo do presente estudo. Foram utilizadas as quatro estirpes recomendadas para soja, duas recomendadas pra milho/trigo e vinte produtos inoculantes com misturas dos referidos microrganismos, em diversas formulações. As estirpes isoladas, suas misturas e os inoculantes foram caracterizados quanto ao melhor tipo de extração de DNA, coloração do gel de agarose e através de técnicas moleculares, com análise da distribuição dos elementos repetitivos BOX e ERIC, de oligonucleotídeos iniciadores específicos para bradirrizóbios e eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Os resultados obtidos mostram que a extração realizada com kit apresenta maior concentração de DNA extraído e melhor qualidade, quando comparada às demais. A coloração dos géis de agarose foi padronizada para utilização do corante *Blue green*. As análises com a técnica de DGGE permitiu a identificação das estirpes recomendadas para soja dentro do produto inoculante.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (75 p) Julho, 2012. Trabalho realizado com o apoio financeiro do CNPq.

COMPARISON AND DEVELOPMENT OF METHODOLOGIES FOR  
MOLECULAR IDENTIFICATION OF RECOMMENDED STRAINS FOR  
INOCULANT'S PRODUCTION FOR SOYBEAN, CORN AND WHEAT

Author: Eng. Biop. Manuela Bruxel

Advisor: Enilson Luiz Saccol de Sá

<sup>2</sup>**ABSTRACT**

Brazil is the second largest producer of inoculants in the world and has one of the more stringent law's quality, however with the development of new strains and products, new methodologies for analyzing the products should be investigated in order to better quality and practicality. The use of methods of analysis of genomic profiles, direct from the product, for the characterization of microorganisms recommended for inoculation in the country was the aim of this study. Four strains recommended for soybean, two recommended to corn / wheat and twenty inoculant products with mixtures of such microorganisms, in various formulations, were used for the tests. The methodology of analysis of the isolated strains, inoculants and their mixtures were characterized as the best type of DNA extraction, staining of the agarose gel and using molecular techniques to analyze the distribution of consensus elements BOX and ERIC primer specific for bradyrhizobia and electrophoresis in denaturing gradient gel (DGGE). The results show that the extraction performed with kit has a higher concentration of DNA extracted and better quality when compared to the other. The staining of agarose gels has been standardized for use of the *Blue green* dye. The DGGE technique allowed the identification of the strains recommended for soybean inoculant into the product.

---

<sup>2</sup> Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (75 p) July, 2012. Work performed with financial support from CNPq.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio.....	4
2.2 Cenário Brasileiro da inoculação .....	5
2.3 Inoculantes comerciais .....	6
2.4 Legislação Brasileira para produção e qualidade de inoculantes.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Estirpes bacterianas .....	16
3.2. Produtos Inoculantes estudados.....	17
3.3. Métodos usados para extração de DNA .....	19
3.3.1. Extração salina com Acetato de Sódio (AcONa) .....	20
3.3.2. Extração com fenol.....	21
3.3.3. Extração com kit Wizard DNA Purification® .....	22
3.3.4 Extração com kit Power Soil®DNA isolation.....	23
3.3.5 Quantificação de DNA .....	25
3.3.6 Análise estatística.....	25
3.4 Coloração do gel de agarose .....	26
3.5. Identificação molecular das estirpes isoladas e dos inoculantes comerciais.....	26
3.5.1 Reação da PCR com sequências repetitivas no genoma (rep-PCR), conforme previsto na IN nº30/2010 (MAPA, 2010).....	27
3.5.2. Sequência específica das espécies <i>B. japonicum</i> e <i>B.</i> <i>elkani</i> .....	29

3.5.3 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Extração de DNA	34
4.2 Coloração do gel de agarose	40
4.3 Identificação molecular das estirpes isoladas e dos inoculantes comerciais	45
4.3.1 Sequências repetitivas no genoma (rep-PCR)	45
4.3.2 Sequências específicas para a separação das espécies <i>B. japonicum</i> e <i>B. elkanii</i>	56
4.3.3. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	59
5. CONCLUSÕES	63
7. RECOMENDAÇÃO	65
8. REFERÊNCIAS	67

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Estirpes autorizadas para produção de inoculantes .....	16
<b>TABELA 2.</b> Composição dos produtos comerciais .....	17
<b>TABELA 3.</b> Condições de amplificação da PCR .....	28
<b>TABELA 4.</b> Condições aplicadas no termociclador .....	28
<b>TABELA 5.</b> Volumes das soluções desnaturantes (0 e 100%) necessários para a confecção do gradiente de desnaturação no gel de DGGE .....	31
<b>TABELA 6.</b> Quantidades de DNA obtidas com o uso de métodos de extração com Kit, Sal e Fenol (médias de 6 repetições).....	36
<b>TABELA 7.</b> Comparação da eficiência dos três protocolos de extração .....	38
<b>TABELA 8.</b> Extração de DNA dos inoculantes turfosos (médias de 6 repetições). .....	39

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Montagem do gradiente do gel de DGGE .....	32
<b>FIGURA 2.</b> Eletroforese em gel de agarose do DNA genômico extraído de inoculantes comerciais.....	35
<b>FIGURA 3.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação específicos de <i>B. elkanii</i> .....	41
<b>FIGURA 4.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação específicos de <i>B. elkanii</i> .....	42
<b>FIGURA 5.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação específicos de <i>B. elkanii</i> .....	43
<b>FIGURA 6.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação específicos de <i>B. elkanii</i> .....	44
<b>FIGURA 7.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de BOX-PCR das estirpes isoladas e das suas misturas.....	46
<b>FIGURA 8.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de ERIC-PCR das estirpes isoladas e das suas misturas.....	47
<b>FIGURA 9.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de BOX-PCR dos produtos inoculantes.....	49
<b>FIGURA 10.</b> Análise de similaridade com índice de <i>Jaccard</i> e agrupamento por UPGMA dos inoculantes comerciais e as estirpes recomendadas. ....	51
<b>FIGURA 11.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de ERIC-PCR dos produtos inoculantes.....	53
<b>FIGURA 12.</b> Análise de similaridade com índice de <i>Jaccard</i> e agrupamento por UPGMA dos inoculantes comerciais e as estirpes recomendadas. ....	55

<b>FIGURA 13.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação específicos para <i>B. elkani</i> .....	57
<b>FIGURA 14.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação específicos para <i>B. japonicum</i> . ....	58
<b>FIGURA 15.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação específicos para <i>B. japonicum</i> . ....	59
<b>FIGURA 16.</b> Eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida e uréia (55 a 65%) dos produtos de amplificação da região V3 do 16S rDNA .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
SEMIA: Seção de Microbiologia Agrícola  
FEPAGRO: Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária  
RELARE: Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologias de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola  
UFC: unidade formadora de colônia  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
RNA: Ácido ribonucleico  
ARDRA: Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado  
DGGE: Eletroforese em gel gradiente desnaturante  
PCR: Reação de polimerase em cadeia  
min: minuto (s)  
h: hora (s)  
L: litro (s)  
mL: mililitro (s)  
°C: grau (s) Celsius  
μL: microlitro (s)  
s: segundo (s)  
rpm: rotações por minuto  
V: Volts  
pb: Pares de base  
U: Unidade  
mM: mili Molar  
μM: micro Molar  
pM: pico Molar  
pH: potencial hidrogeniônico  
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético  
SDS: Dodecil sulfato de sódio  
TAE/TBE: Tris – Ácido Acético - EDTA / Tris – Ácido Bórico - EDTA  
UPGMA: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*

## **1. INTRODUÇÃO**

A comercialização de produtos inoculantes no mundo ultrapassa a quantia de 60 milhões de doses ao ano, somente no Brasil, 23 milhões de doses são negociadas, ou seja, quase a metade da produção mundial. A utilização da fixação biológica de nitrogênio, como produto comercial, é realizada desde os anos 60, quando as primeiras indústrias foram criadas para esse fim.

A utilização da inoculação em cultivos de soja estimulou o grande desenvolvimento da cultura no país, auxiliando-o a atingir o patamar de segundo maior produtor de soja do mundo. A disseminação da produção e utilização de inoculantes, suas diferentes formulações e a variedade de estirpes, juntamente com a importação de produtos, geraram a necessidade de um controle fiscal e de qualidade dos mesmos. A fim de sanar esses problemas, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou a lei 6.894, em 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes, destinados à agricultura.

A lei atua como marco regulatório do inoculante como produto comercial. No entanto, como medidas executivas, a Instrução Normativa nº13,

de 24 de março de 2011 (MAPA, 2011), regulamenta a produção dos inoculantes, garantindo a qualidade e recomendando as estirpes específicas para cada tipo de inoculante. E por sua vez, a Instrução Normativa nº30, de 10 de novembro de 2010 (MAPA, 2010) regulamenta o controle de qualidade do produto comercial, prevendo para tanto, metodologias específicas a serem realizadas pelos laboratórios certificados pelo MAPA. Atualmente, as análises de qualidade dos inoculantes são realizadas pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária - FEPAGRO, em Porto Alegre.

Para identificação dos microrganismos presentes nos inoculantes, a IN nº30/10 sugere a identificação sorológica por aglutinação das estirpes ou, como alternativa, recomenda análises de biologia molecular, que embora estejam bastante disseminadas no meio acadêmico, ainda apresentam empecilhos metodológicos para a identificação rápida, barata, reprodutível e eficaz dos microrganismos presentes nos inoculantes. Apesar do Brasil possuir uma das legislações mais rigorosas no controle da produção e da qualidade dos inoculantes, a IN nº30/10 apresenta diversos problemas metodológicos, incluindo a ausência de métodos específicos para avaliação de inoculantes contendo microrganismos promotores de crescimento em plantas.

Desta maneira, os objetivos deste trabalho foram 1) avaliar a metodologia de identificação molecular dos microrganismos presentes nos inoculantes, de acordo com a legislação vigente; 2) testar diferentes ferramentas de biologia molecular a fim de distinguir as diferentes estirpes recomendadas para a produção de inoculantes de soja e gramíneas dentro das diversas formulações existentes; 3) instituir uma metodologia rotineira para

identificação das estirpes, auxiliando assim a inspeção destes insumos agrícolas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

O estudo sobre metodologias de controle de qualidade de inoculantes é de grande importância para que se realize uma fiscalização rápida e precisa dos produtos a serem comercializados. O emprego de biologia molecular na identificação dos microrganismos presentes nos inoculantes tende a facilitar o trabalho rotineiro dos órgãos fiscalizadores.

### **2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio**

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) consiste na redução do nitrogênio molecular atmosférico ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_4$ ), reação esta comandada pela enzima nitrogenase. Apesar da habilidade de reduzir o nitrogênio atmosférico seja uma característica primordialmente dos procariotos, as condições fisiológicas e de especificidade necessárias variam entre as diversas espécies de microrganismos (Burns & Hardy, 1975; Long, 1989). Estima-se que aproximadamente 5% dos procariotos possuem genes responsáveis pelo processo de FBN (Raymond et al., 2004)

Os microrganismos fixadores de nitrogênio ou simplesmente os diazotróficos, possuem outros mecanismos que podem estimular o crescimento das plantas, sendo estes caracterizados como diretos e indiretos. Os mecanismos diretos de promoção de crescimento incluem a própria fixação

biológica de nitrogênio, produção de sideróforos, fito-hormônios, solubilização de fosfatos e aceleração do processo de mineralização dos nutrientes. Os mecanismos indiretos de promoção de crescimento incluem os mecanismos de indução de resistência sistêmica das plantas, o antagonismo à patógenos, o aumento da resistência das plantas a situações de estresse e a produção de antibióticos (Oliveira et al., 2003; Santillana et al., 2005). Esses microrganismos são denominados rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (ou a sigla em inglês, PGPR – *Plant Growth-promoting Rhizobacteria*) (Schroth & Hancock, 1981).

## **2.2 Cenário Brasileiro da inoculação**

A inoculação de sementes de leguminosas dispensa a utilização de fertilização nitrogenada, reduzindo os custos de produção e minimizando a degradação dos ambientes naturais, pois diferentemente da fertilização nitrogenada, há o aproveitamento total do nitrogênio, não havendo perdas com lixiviação e/ou percolação no solo. Desta maneira, estima-se que a inoculação de leguminosas resulte em uma economia anual de US\$ 3 bilhões (Hungria, 2005), sem contar a conservação do meio ambiente.

O mercado brasileiro de inoculantes com estirpes de rizóbios é um dos maiores do mundo, sendo comercializadas mais de 23 milhões de doses por ano, das quais mais de 95% são destinadas para a cultura da soja e cerca de 4% para cultura do feijão (Chueire et al., 2003). Não obstante, leguminosas como ervilhaca, ervilha, amendoim, cornichão, alfafa, entre outras forrageiras e arbóreas, possuem estirpes recomendadas para produção de inoculantes, embora não existam estudos de ordem econômica semelhantes à soja.

Atualmente, existe um crescente interesse pelo uso de inoculantes contendo bactérias que promovam o crescimento vegetal e incrementem a produtividade, como é o caso dos inoculantes destinados para culturas de gramíneas, como trigo e milho. Apesar de recente, a utilização dos mesmos já pondera uma economia de aproximadamente US\$ 1,2 bilhões, tanto na cultura de milho quanto na de trigo (Hungria et al., 2010).

### **2.3 Inoculantes comerciais**

O produto inoculante consiste em uma cultura de microrganismos previamente selecionada misturada a um veículo amorfo que pode ser turfa, água destilada ou uma mistura de diferentes polímeros. A oferta no mercado nacional é bastante variada, podendo ser encontrados inoculantes designados como turfosos, líquidos ou líquido-turfosos (Schuh, 2005). Independentemente do veículo, as formulações devem oferecer condições de sobrevivência e proteção para as bactérias. Neste sentido, o veículo utilizado para inocular uma estirpe deve proteger a célula bacteriana proporcionando a manutenção de grande quantidade de células viáveis no solo e na semente até o período que surgem as raízes (Daeker et al., 2004).

Ao longo das últimas décadas, a maioria dos inoculantes comercializados no Brasil utiliza turfa como veículo, especialmente porque além de possibilitar a manutenção de elevado número de bactérias viáveis, oferece proteção física contra adversidades do solo (Freire & Verneti, 1999; Lupwayi et al., 2005; Zilli et al., 2010). Entretanto, estudos com diferentes formulações são realizados anualmente, a fim de encontrar um produto que confere melhor proteção às células procarióticas, maior facilidade na aplicação

e também como um diferencial no mercado (Stephens & Rask, 2000; Schuh, 2005; Rohr, 2007; Fernandes Jr. et al., 2009; Silva, 2009).

Neste contexto, os inoculantes líquidos se destacam cada vez mais pela facilidade de aplicação em grandes plantios com semeadura mecanizada e tem sido aceitos por apresentarem eficácia semelhante à turfa (Hynes et al., 1995, Albareda et al., 2008). Inoculantes líquidos compostos de polímeros biodegradáveis são alternativas que já estão sendo empregados em inoculantes comerciais para rizóbios, como por exemplo, polímeros como carboximetilcelulose (CMC) e amido, que são solúveis em água e previnem as células de estresse ambiental e dessecação, e possuem propriedades adesivas adicionais necessárias aos produtos líquidos (Fernandes Jr. et al., 2009; Rohr, 2007).

Pesquisas realizadas pela ANPII (Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes) com agricultores que utilizam inoculantes indicam que 61% dos entrevistados preferem os produtos líquidos, principalmente pela facilidade do manuseio e inoculação, demonstrando que o recente investimento em P&D das empresas no desenvolvimento de novas formulações está efetivamente ganhando mercado (ANPII, 2010).

Outra abordagem que vem sendo desenvolvida nas últimas décadas são os inoculantes com polímeros que promovem o encapsulamento das células e só as libera após a degradação do material no ambiente, como é o caso da utilização do alginato e goma xantana, que além de serem de baixo custo e biodegradáveis, favorecem a multiplicação e a sobrevivência dos microrganismos quando aplicados no solo (Denardin & Freire, 2000).

## **2.4 Legislação Brasileira para produção e qualidade de inoculantes**

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) não restringe a utilização de nenhum material como veículo de inoculante no Brasil, desde que o mesmo seja capaz de atender as condições estabelecidas na Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011 (MAPA, 2011), que estabelece que os produtos que contenham bactérias fixadoras de nitrogênio para simbiose com leguminosas devam conter concentração mínima de  $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) por grama ou mililitro de produto, até a data de vencimento, de tal forma que esta concentração equivale à quantidade de inoculantes que deve ser misturada a 50Kg de sementes de soja para proporcionar, no mínimo, 600.000 células bacterianas viáveis por sementes de soja. Os inoculantes devem ser elaborados com suporte estéril e estarem livres de microrganismos não especificados no fator de diluição  $10^{-5}$ , podendo este suporte ser sólido ou fluido e ter um prazo de validade mínimo de 6 meses a contar da data de fabricação, e devem conter pelo menos duas estirpes, podendo essas estarem em diferentes combinações.

A IN nº13/11 (MAPA, 2011) também infere que para os demais produtos inoculantes formulados com bactérias associativas e microrganismos promotores de crescimento em plantas, a concentração de microrganismos deve ser informada no processo de registro do produto, de acordo com a recomendação específica emitida por órgão brasileiro de pesquisa científica ou credenciado no MAPA, comprovando sua eficiência agrônômica segundo protocolos definidos em instruções normativas vigentes do referido órgão. No

entanto, não institui valores específicos para inoculantes destinados à gramíneas, embora em seu anexo III, recomende os microrganismos promotores de crescimento em plantas para produção dos mesmos.

Desta forma, os valores de referência para a riqueza dos inoculantes para gramíneas usados na produção comercial baseiam-se na proposta apresentada na RELARE (Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologias de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola) de  $10^8$  UFC por grama ou mililitro de produto (Hungria et al., 2010 - Reunião da RELARE, 2010).

Além das exigências para a produção dos inoculantes, o MAPA através da IN nº30, de 12 de novembro de 2010, estabelece as metodologias oficiais para qualidade de inoculantes (contagem, identificação e análise da pureza). O artigo 19º, propõe que os microrganismos presentes no produto inoculante sejam identificados através de métodos sorológicos por aglutinação (Vicent, 1970). Em seu artigo 21º, alternativamente, sugere a utilização de *rep*-PCR (amplificação de sequências repetitivas no genoma), e recomenda que a identificação seja realizada a partir de colônias puras ou crescidas em meio líquido. Tanto no artigo 19º quanto no 21º, são apresentados os protocolos a serem utilizados para cada tipo de identificação; e adicionalmente à análise por *rep*-PCR também é sugerida a metodologia de extração de DNA (Metodologia com Acetato de Sódio).

A Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) é responsável pela manutenção e distribuição de estirpes recomendadas para utilização em inoculantes comerciais. A coleção de culturas SEMIA foi incluída

como parte do Centro de Recursos Microbiológicos (MIRCEN), criado em convênio com o Governo do Estado do Rio Grande do Sul em 1978 (Freire & Verneti, 1999; Hungria & Campo, 2007). Atualmente, a coleção SEMIA constitui um importante acervo de estirpes de rizóbios, contando com mais de 1000 estirpes indicadas para 200 plantas leguminosas de interesse econômico, tais como: soja, feijão, trevo, alfafa, etc.

A FEPAGRO também é responsável pelo controle de qualidade de todos os inoculantes produzidos e importados pelo Brasil, o que inclui análises de riqueza dos inoculantes com contagem de concentração mínima de  $10^9$  células viáveis através do crescimento em meio Levedura-Manitol (Vicent, 1970) pelo método de Espalhamento em Superfície (*Spread Plate*), análise de contaminação na diluição de  $10^5$  e identificação dos microrganismos presentes dentro do produto comercial através de sorologia. No que se refere ao controle de qualidade da quantidade mínima em sementes, atualmente, essa análise não é realizada pela FEPAGRO, nem por outra instituição (Damasceno, 2011).

Os rizóbios têm sido caracterizados através de métodos sorológicos por apresentarem grande heterogeneidade antigênica, o que possibilita a separação dessas bactérias em tipos antigênicos distintos (Lemos, 1994). Pontualmente, as quatro estirpes recomendadas para produção de inoculantes de soja possuem antígenos e antissoro correspondente para cada estirpe (Mendes et al., 2000), todavia, não existe um antígeno específico para cada estirpe recomendada para produção de inoculantes, e conseqüentemente um antissoro correspondente.

Diversas metodologias de aglutinação podem ser empregadas, entretanto as análises podem ter reações cruzadas entre os sorogrupos, o que exige tecnologias mais específicas na produção de soros e antígenos para garantir a melhor definição (Olsen et al., 1983; Valez et al., 1988). Outro problema encontrado acontece quando as estirpes não reagem com os soros testados (Hungria, 1994; Bangel, 2000). Por isso, cada vez mais as técnicas de biologia molecular para caracterização e identificação dos microrganismos tem ganhado destaque pela facilidade e eficiência.

#### **2.4 Metodologias moleculares aplicadas na caracterização de diazotróficos**

A utilização de técnicas moleculares tem estimulado o desenvolvimento de procedimentos simples e rápidos para a caracterização de populações microbianas, em nível de gênero, espécie e até mesmo estirpe (Schneider & de Bruijn, 1996; Giongo, 2007). Muitas metodologias moleculares baseados na técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) vêm sendo utilizados na identificação dos diazotróficos, principalmente com o intuito de acessar e elucidar a distribuição taxonômica desses fixadores de nitrogênio, que apresentam-se muito diversos em solos tropicais (Vinuesa et al., 1998; Vinuesa et al., 2005; Germano et al., 2006; Binde et al., 2009).

A utilização do gene conservado 16S rDNA é amplamente difundida no estudo de dizotróficos (Williams et al., 1990; Young et al., 1991) e muitas vezes associado a mais de uma técnica, como ARDRA (Análise de Restrição do DNA Ribossomal) (Baldani et al., 1992; Laguerre et al., 1992 e 1993; Chueire et al., 2000; Elboutahiri et al., 2009), que consegue diferenciar

espécies recomendadas para produção de inoculantes, mas nem sempre é capaz de diferenciar espécies estreitamente relacionadas, como é o caso do gênero *Bradyrhizobium* (Laguerre et al.1996; Tarefework et al., 2001). Estudos semelhantes são realizados com a região espaçadora – ITS, entre os genes 16S e 23S do rDNA, que apresentam bons resultados quanto a distinção das estirpes recomendadas para produção de inoculantes (Ueda et al., 1995; Chueire et al, 2003), embora considerado menos conservado.

Diferentemente, os trabalhos com sequenciamento, tanto de genes ribossomais (Rumjanek et al., 1993; Menna et al., 2006 e 2009; Binde et al., 2009) quanto de genes específicos de fixação ou nodulação (Göttfert et al. 2000; Figueiredo, 2008), ou até mesmo análises de múltiplos genes (MLST – *Multilocus Sequence Typing/* Tipificação por sequenciamento de *Multi loci*) (Menna et al., 2009; Ribeiro et al., 2009; Roma Neto et al., 2010) conseguem através da comparação das sequencias, diferenciar as estirpes recomendadas para produção de inoculantes. Contudo, resultados imprecisos podem ocorrer quanto à diferenciação de espécies, por exemplo, MENNA et al. (2006) empregam a classificação de que uma diferença de 1,03% nos nucleotídeos do gene 16S rDNA já pode indicar uma nova espécie. Atrelado a isso, o custo elevado e a necessidade de equipamentos adequados dificultam o seu uso nas análises de rotina para a identificação das estirpes.

Por sua vez, as técnicas que analisam o DNA como um todo, como RAPD (*Random amplification of polymorphic DNA/* Polimorfismo do DNA amplificado ao acaso), AFLP (*Amplified fragment length polymorphism/* Polimorfismo do tamanho do fragmento amplificado) e rep-PCR (*Repetitive*

*sequence*/ Amplificação de sequências repetitivas) possuem um grande poder discriminatório, por se tratarem de análises que geram perfis de amplificação e detectam a diversidade genética (Sato et al., 1999; Elboutahiri et al., 2009).

A Técnica de RAPD por se tratar de amplificações ao caso demonstra grande facilidade de execução, no entanto é exaustiva, uma vez que muitos oligonucleotídeos iniciadores devem ser testados. A técnica não apresenta resultados concretos na identificação de polimorfismos nas estirpes de diazotróficos (Sato et al., 1999; Bangel, 2000; Elboutahiri et al., 2009), embora NISHI et al. (1996) tenham caracterizado as estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 566 e 586) e seus isolados (CPAC 7 e 15, respectivamente) observando variabilidade genética entre as estirpes e suas variantes.

A técnica de AFLP caracteriza-se como uma boa técnica para diferenciar estirpes ou espécies intimamente relacionadas, mas não se aplica como um ferramenta filogenética (Tarefework et al., 2001). Esta técnica baseia-se na amplificação seletiva, por PCR, de fragmentos de DNA genômico total, gerados pela digestão com enzimas de restrição (Olive & Bean, 1999). A AFLP é uma técnica relativamente rápida e simples, cuja reprodutibilidade tem sido testada com bastante sucesso em diazotróficos (Olive & Bean, 1999; Gao et al., 2001; Willems et al., 2000; Giongo, 2007).

As sequências repetitivas de consenso dispersas no genoma (rep-PCR) caracterizam-se como uma boa técnica para distinção dos diazotróficos no estudo da diversidade. A amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores REP e ERIC (Versalovic et al., 1991 e de Bruijn, 1992, respectivamente)

contém repetições centrais invertidas e altamente conservadas e não demonstram homologia uma com a outra (de Bruijn, 1992). Foram inicialmente identificadas em *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* e são normalmente encontradas em regiões intergênicas transcritas, mas não traduzidas (Lupski & Weinstock, 1992). O oligonucleotídeo BOX (Versalovic et al., 1994) é uma sequência de DNA altamente repetitiva e conservada, localizada em regiões intergênicas de *Streptococcus pneumoniae*, próximas a genes envolvidos na virulência ou competência e transformação genética. A dispersão desses fragmentos pode ser indicativa da estrutura e evolução do genoma bacteriano em função da seleção (Martin et al., 1992). Porém estudos relacionando rep-PCR e o gene 16S rDNA apresentam baixa correlação, se tornando inadequados para agrupar ou definir espécies (Binde et al., 2009; Menna et al., 2009)

A utilização da técnica de rep-PCR permite a identificação dos microrganismos através de um perfil de amplificação, e caracteriza-se como uma ferramenta com boa discriminação até mesmo entre estirpes, embora nem todas apresentem perfis diferentes. As sequências repetitivas são conservadas nos rizóbios e diversos estudos de caracterização foram realizados (de Bruijn, 1992; Chen et al., 2000; Ferreira e Hungria; 2002; Hungria et al., 2006; Kaschuk et al., 2006; Granada, 2010; Menna et al., 2009; Stroschein, 2010; Machado, 2011; Martins et al, 2011). Aliado aos estudos já realizados, deste modo, a legislação brasileira através do artigo 21º, da IN nº30/10, prevê a identificação dos rizóbios através desta técnica.

Dentre outras técnicas, a eletroforese em gel gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* - DGGE) também se apresenta como uma ferramenta potencial na identificação de microrganismos, uma vez que a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes ribossomais têm se apresentado suficiente para análise espacial e/ou temporal de múltiplas amostras simultaneamente, a fim de evidenciar os microrganismos ali presentes (Henriques et al., 2006; Nimnoi et al., 2011), e sem a necessidade de multiplicação prévia das células. ROSADO (1999) foi pioneiro no Brasil na utilização de análises metagenômicas de solo e rizosfera para identificação do gene *nifH* em *Paenibacillus azotofixans*, e conclui que a técnica da DGGE é reproduzível e fornece uma maneira rápida de avaliar a diversidade genética intraespecífica de um gene funcional, tanto em culturas puras, como em amostras ambientais.

A DGGE é utilizada principalmente em estudos populacionais, onde apresenta um alto poder discriminatório entre as amostras ambientais. Em estudos com diazotróficos, a técnica é utilizada principalmente em amostras de nódulos, solo e de extrato vegetal a fim de caracterizar os microrganismos ali presentes (Andreote et al., 2009; Hong et al., 2007; Nimnoi et al., 2011). No entanto, a técnica de DGGE consegue separar fragmentos de DNA com mesmo tamanho, mas com diferenças na sequência de nucleotídeos (Myers et al., 1988), e por isso, caracteriza-se como uma ferramenta potencial para discriminar diferentes estirpes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Estirpes bacterianas

As estirpes autorizadas para a produção de inoculantes comerciais foram obtidas da Coleção de Cultura de rizóbios (Seção de Microbiologia Agrícola – SEMIA) da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Porto Alegre – Rio Grande do Sul - Brasil. Posteriormente foram mantidas no laboratório de Microbiologia Agrícola e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no Departamento de Ciências dos Solos. As estirpes SEMIA utilizadas neste estudo são classificadas na tabela 1, de acordo com a respectiva cultura agrícola, conforme instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011 (MAPA, 2011).

**TABELA 1.** Estirpes autorizadas para produção de inoculantes

<b>Cultura Agrícola</b>	<b>Nome comum</b>	<b>Estirpe (SEMIA)</b>	<b>Gênero/Espécie</b>	<b>Acesso Genbank*</b>
<i>Glycine max</i>	Soja	5079	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	AF234888
		5080	<i>B. japonicum</i>	AF234889
		587	<i>B. elkanii</i>	AF234890
		5019	<i>B. elkanii</i>	AF237422
<i>Zea Mays/ Triticum aestivum</i>	Milho/ Trigo	Ab-V5	<i>Azospirillum brasilense</i>	-
		Ab-V6	<i>A. brasilense</i>	

\* Tabela adaptada da Instrução Normativa nº13, 24 de março de

As estirpes foram cultivadas em meio sólido CRYMA (Levedura - Manitol – Ágar) (Vicent, 1970) em placas de Petri com corante vermelho congo, em estufa a 28°C, com o tempo de inoculação variando de 3 a 7 dias, de acordo com a espécie. Para manutenção no banco de estirpes, as mesmas foram mantidas em meio líquido CRYMA e glicerol 50% e armazenadas em ultra-freezer (ULT Freezer, Thermo Electron Corporation, USA), a -80°C.

As estirpes foram inoculadas em meio líquido CRYMA em erlenmeyer e colocadas no incubador orbital (H300 - Cientec equipamentos para laboratório, Piracicaba, Brasil) por 48h, a 28°C e sob agitação 120.000rpm.

### 3.2. Produtos Inoculantes estudados

Foram estudadas 20 amostras de produtos inoculantes contendo diferentes estirpes e suportes turfosos ou líquidos com diferentes composições declaradas na embalagem (tabela 2).

**TABELA 2.** Composição dos produtos comerciais

ID *	natureza	SEMIA	Riqueza (células/ mL)	composição declarada**
INL 1	Líquido	5080 5079	5x10 <sup>9</sup>	Água, extrato de levedura, glicerol, polímero hidrossolúvel, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e cloreto de sódio.
INL 2	Líquido	5080 5079	5x10 <sup>9</sup>	Cloreto de sódio, fosfato monopotássico, sulfato de magnésio, glicerol, levedura e carboximetilcelulose.
INL 3	Líquido	5080 5079	6x10 <sup>9</sup>	A base de água.
INL 4	Líquido	5079 587	5x10 <sup>9</sup>	Substrato estéril a base de sacarose, proteína hidrolisada, fornecedores de micronutrientes, fosfato monopotássico, hidróxido de sódio, nitrato de potássio,

<b>INL 5</b>	Líquido	5080 5079	1,4x10 <sup>9</sup>	cloreto de sódio e água. A base de água.
<b>INL 6</b>	Líquido	5019 5079	5x10 <sup>9</sup>	Água e sacarídeos.
<b>INL 7</b>	Líquido	5080 5079	5x10 <sup>9</sup>	Líquido aquoso.
<b>INL 8</b>	Líquido	5080 5079	5x10 <sup>9</sup>	Água, cloreto de sódio, fosfato monopotássico, sulfato de magnésio, glicerol, extrato de levedura, carboximetilcelulose.
<b>INLT 9</b>	Líquido Turfosos	5080 5079	5x10 <sup>9</sup>	Fosfato dipotássico, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, nitrato de potássio, fosfato diamônico, cloreto férrico, sulfato de manganês, glicerina, extrato de levedura, turfa, água destilada CSP.
<b>INL 10</b>	Líquido	5080 5079	5x10 <sup>9</sup>	Fosfato dipotássico, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, nitrato de potássio, fosfato diamônico, cloreto férrico, sulfato de manganês, glicerina, extrato de levedura, água destilada CSP.
<b>INL 11</b>	Líquido	5080 5079	5x10 <sup>9</sup>	Água, extrato de levedura, glicerol, carboximetilcelulose e gelatina, fosfato monopotássico, fosfato monoamônico (MAP), cloreto de sódio, sulfato de magnésio.
<b>INL 12</b>	Líquido	5080 5079	5x10 <sup>9</sup>	Água, extrato de levedura, glicerol, carboximetilcelulose e gelatina, fosfato monopotássico, fosfato monoamônico (MAP), cloreto de sódio, sulfato de magnésio.
<b>INL 13</b>	Líquido	5079 587		Água destilada, glicerol, glicose, polímeros, dispersante.
<b>INL 14</b>	Líquido	5080 5079	5x10 <sup>9</sup>	Fosfato dipotássico, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, nitrato de potássio, fosfato diamônico, cloreto férrico, sulfato

<b>INLT 15</b>	Líquido Turfoso	5080 5079	5x10 <sup>9</sup>	de manganês, glicerina, extrato de levedura, água destilada CSP. Fosfato dipotássico, fosfato monopotássico, nitrato de potássio, fosfato monoamônico, glicerol, extrato de levedura, água destilada CSP, turfa, sulfato manganoso, cloreto férrico e sacarose.
<b>INL 16</b>	Líquido	AbV5 AbV6	2x10 <sup>8</sup>	Água, extrato de levedura, cloreto de amônio, glicerol, ácido málico, fosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, EDTA férrico, sulfato de cobre, sulfato de zinco, ácido bórico, molibdato de sódio e sulfato de manganês.
<b>INL 17</b>	Líquido	AbV5 AbV6	2x10 <sup>8</sup>	Água, poliol, ácido carboxílico, estabilizante/conservante e tensoativo.
<b>INT 18</b>	Turfoso	5080 5079	2,6x10 <sup>9</sup>	Turfa esterilizada
<b>INT 19</b>	Turfoso	5080 5079	7,2x10 <sup>9</sup>	Turfa
<b>INT 20</b>	Turfoso	5080 587	-	Turfa

\* ID - Identificação

\*\* Composição de acordo com o rótulo do produto comercial

### 3.3. Métodos usados para extração de DNA

A extração de DNA das estirpes padrão isoladas e das contidas nos produtos comerciais foi realizada utilizando-se quatro metodologias diferentes, com seis repetições.

Para a extração de DNA das estirpes padrão, uma alíquota de 1,5mL da suspensão contendo as células crescidas em erlenmeyer foi transferida para um microtubo, centrifugadas a 14.000rpm por 2min, para formar o precipitado de células. Para os inoculantes líquidos, o procedimento foi semelhante, entretanto uma alíquota de 1,5mL foi retirada de cada produto comercial, e

posteriormente da mesma forma, centrifugou-se a 14.000rpm por 2min, para a formação do precipitado de células.

Para obtenção das células bacterianas dos inoculantes turfosos, retirou-se uma alíquota de 10g do produto e colocou-se em frasco graduado tipo Schott contendo 90mL de solução salina de NaCl (0,85%) estéril e encaminhou-se para agitação em agitador orbital (H300 - Cientec equipamentos par a laboratório, Piracicaba, Brasil) por 20min. Uma alíquota de 1,5mL foi retirada desta solução e posteriormente centrifugada a 14.000rpm por 2min, para a formação do precipitado das células.

Os precipitados das células formados nessa etapa foram encaminhados para as diferentes extrações de DNA

### **3.3.1. Extração salina com Acetato de Sódio (AcONa)**

A extração de DNA foi realizada conforme IN n°30/2010 (MAPA, 2010). Os precipitados das células das estirpes padrão isoladas foram lavados três vezes com solução salina de NaCl (0,85%) estéril. Já os precipitados das células dos inoculantes foram lavados três vezes com PBS 1X, após cada lavagem as suspensões foram centrifugadas a 13.000rpm e o sobrenadante descartado.

Ressuspenderam-se os precipitados em solução contendo 400µL de TE (50:20), 25µL de SDS 20% a 60°C, 10µL de proteinase K (10mg.mL<sup>-1</sup>) (Invitrogen corp., California, USA) , 10µL de lisozima (5 mg.mL<sup>-1</sup>) (Invitrogen corp., California, USA) e 2µL de RNase (Invitrogen corp., California, USA), e então incubou-se a 37°C, por uma hora em banho-seco (Dryblock, modelo

BS20). Na sequência, as amostras foram homogeneizadas com ponteiros de 1mL, com a ponta cortada, por três vezes, para retirar a viscosidade.

A seguir, acrescentou-se 30µL de solução salina NaCl (5M), 70µL de AcONa (3M) e 28µL de H<sub>2</sub>O ultrapura e as amostras foram homogeneizadas e deixadas repousando por 1h a 4°C. Em seguida, foram centrifugadas a 12.000rpm durante 15min, em temperatura ambiente ( $\pm 23^{\circ}\text{C}$ ). Foi retirado 300µL do sobrenadante de cada amostra e adicionado 600µL de etanol absoluto gelado, armazenando-se, por uma noite, a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

No dia seguinte, centrifugou-se as amostras a 12.000rpm durante 15min. Descartou-se o etanol e adicionou-se 400µL de etanol 70%. Centrifugou-se novamente a 12.000rpm por 5min e descartou-se o etanol 70%.

O precipitado ficou secando por aproximadamente 3h em temperatura ambiente. Logo após, os precipitados foram ressuspensos em 50µL de tampão TE (10:1).

As amostras de DNA foram mantidas na geladeira, a aproximadamente 8°C, para utilização imediata, e posteriormente estocadas no freezer, a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3.2. Extração com fenol**

A extração foi realizada conforme SAMBROOK (2001). Os precipitados das células das amostras foram lavados três vezes com solução salina NaCl (0,85%) estéril. Após cada lavagem as suspensões foram centrifugadas a 13.000rpm e o sobrenadante descartado.

O precipitado das células das amostras foram ressuspensos em 400µL da solução TE 1X, 30µL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS 20%) a 60°C

e 10 $\mu$ L de lisozima (20 mg.mL<sup>-1</sup>) (Invitrogen corp., California, USA), homogeneizou-se bem e incubou-se a 37°C por 1 hora em banho seco (Dryblock- BS20, Cambridge, Inglaterra). Em seguida, adicionou-se 2 $\mu$ L de proteinase K (10mg.mL<sup>-1</sup>) (Invitrogen corp., California, USA) e voltou-se a incubar por 15min a 65°C.

Na sequência, adicionou-se 450 $\mu$ L de Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamílico (25/24/1:v/v/v) e homogeneizou-se. As amostras foram centrifugadas por 10min a 13.000rpm. Retirou-se o sobrenadante para um novo microtubo e adicionou-se 450 $\mu$ L de Clorofórmio/Álcool isoamílico (24/1:v/v), novamente homogeneizou-se bem e centrifugou-se por 10min a 13.000rpm. Transferiu-se 200 $\mu$ L de sobrenadante a um novo tubo.

Foi adicionado 140 $\mu$ L de isopropanol, homogeneizou-se bem e centrifugou-se por 20min a 13.000rpm. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com etanol 70%. Em seguida, todo etanol 70% foi retirado e as amostras foram deixadas a temperatura ambiente para secar por aproximadamente 2h. Posteriormente, as amostras foram ressuspendidas em 50 $\mu$ L da solução TE2 pH 8,0.

As amostras de DNA foram mantidas na geladeira, a aproximadamente 8°C, para utilização imediata, e posteriormente estocadas no freezer, a -20°C.

### **3.3.3. Extração com kit Wizard DNA Purification®**

A extração de DNA foi realizada conforme instruções do kit Wizard DNA Purification® (Promega corp., Madison, USA). Os precipitados das células das amostras foram ressuspendidos em 600 $\mu$ L da solução "Nuclei Lysis

Solution” e foram incubados a 80°C por 5min em banho seco (Dryblock- BS20, Cambridge, Inglaterra).

Após as amostras esfriarem até a temperatura ambiente ( $\pm 23^{\circ}\text{C}$ ) foram adicionados 3 $\mu\text{L}$  de “RNase Solution” e incubou-se novamente, entretanto, a 37° por 1h. Adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de “Protein Precipitation Solution” e agitou-se em *vortex* (Phoenix-AP56, Araraquara, Brasil) por 20s. Incubou-se as amostras a -20°C por 5 min e em seguida centrifugou-se a 14.000rpm por 3min.

Os sobrenadantes foram transferidos a novos microtubos onde se adicionou 600 $\mu\text{L}$  de isopropanol e mexeu-se gentilmente o tubo até formar massa visível. Centrifugou-se novamente a 14.000rpm por 2min. O sobrenadante foi descartado sobrando somente o precipitado, que foi lavado com 600 $\mu\text{L}$  de etanol 70%, invertendo-se o tubo 4 vezes.

Centrifugou-se a 14.000rpm por 2 min e cuidadosamente o etanol 70% foi aspirado, e deixou-se o precipitado secar por 20 min à temperatura ambiente. Reidratou-se o DNA com 100 $\mu\text{L}$  da solução “DNA Rehydration Solution” e colocou-se em banho seco (Dryblock- BS20, Cambridge, Inglaterra) por 1h a 65°C.

As amostras de DNA foram mantidas na geladeira, a aproximadamente 8°C, para utilização imediata, e posteriormente estocadas no freezer, a -20°C.

### **3.3.4 Extração com kit Power Soil®DNA isolation**

A extração foi realizada conforme especificações do fabricante do kit Power Soil®DNA isolation kit (MO Bio, Carlsbad, CA), de maneira que pesou-

se 0,25 g de inoculante turfosso e adicionou-se ao microtubo *Glass Bead* de 2 mL. Adicionou-se 750 µL da *solução de beads* ao microtubo já contendo o inoculante.

Os microtubos foram agitados no *vortex* (Phoenix-AP56, Araraquara, Brasil) por 10s, e adicionou-se 60 µL de *Solução C1* a 60°C, e inverteu-se manualmente o microtubo 20 vezes. Posteriormente, os microtubos foram agitados em *vortex* horizontal adaptado (Phoenix-AP56, Araraquara, Brasil) por 10min, a velocidade máxima.

Os microtubos foram centrifugados por 14.000rpm por 30 segundos e posteriormente foram transferidos 500µL de sobrenadante para um novo microtubo, fornecido pelo kit. Adicionou-se 250µL da *Solução C2* e agitou-se no *vortex* (Phoenix-AP56, Araraquara, Brasil) por 5s. Incubou-se a 4° C por 5 min.

Centrifugou-se por 1 min a 14.000rpm e transferiu-se 500µL do sobrenadante a um novo microtubo, e posteriormente adicionou-se 200µL da *Solução C3* e agitou-se no *vortex* (Phoenix-AP56, Araraquara, Brasil) por 5s. Incubou-se novamente a 4°C por 5min.

Os microtubos foram centrifugados por 1 min a 14.000rpm e transferiu-se 750 µL do sobrenadante para um novo microtubo, onde adicionou-se 1,2mL da *Solução C4* e agitou-se no *vortex* (Phoenix-AP56, Araraquara, Brasil) por 5s.

Adicionou-se 675µL da solução recém agitada no microtubo contendo uma coluna de sílica acoplado e centrifugou-se por 1min, a 14.000rpm. Este procedimento foi realizado três vezes, e logo após adicionou-se 500 µL da *Solução C5* e centrifugou-se por 30s a 14.000rpm.

Transferiu-se a coluna de sílica para um novo microtubo e adicionou-se 100µL da *Solução C6* no centro da coluna e centrifugou-se os microtubos por 40s a 14.000rpm. Descartou-se a coluna de sílica.

As amostras de DNA foram mantidas na geladeira, a aproximadamente 8°C, para utilização imediata, e posteriormente estocadas no freezer, a -20°C.

### **3.3.5 Quantificação de DNA**

Todas as extrações de DNA foram quantificadas através do fluorímetro Qubit® (Invitrogen corp., California, USA), que foi calibrado para quantificar amostras de DNA dupla fita, com fluorescência entre 485 e 530 nm. A solução de trabalho do Qubit corresponde a proporção de 1:200 (v:v) - 1µL do componente A (Qubit®*reagent*) para 199µL do componente B (Qubit®*dsDNA buffer*), para cada amostra.

Uma alíquota de 3µL de DNA extraído de cada amostra foi misturada a 197 µL da solução de trabalho do Qubit®, para completar 200µL, e posteriormente agitada no *vortex* (Phoenix-AP56, Araraquara, Brasil) por 3s.

Deixou-se descansar por 2min a temperatura ambiente ( $\pm 23^{\circ}\text{C}$ ) e posteriormente as amostras foram quantificadas no fluorímetro Qubit® (Invitrogen corp., California, USA).

### **3.3.6 Análise estatística**

A quantidade de DNA extraído em cada metodologia foi comparada pela análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey (0,05) no programa ASSISTAT (versão 2011).

### 3.4 Coloração do gel de agarose

Foi realizada uma curva de calibração para utilização do corante de DNA *Blue Green loading dye* 1X (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) comparando-o com o perfil do corante brometo de etídio.

Para comparação de perfil de corrida de eletroforese em gel de agarose foram utilizadas as amostras de DNA amplificado com o oligonucleotídeo iniciador específico para *Bradyrhizobium elkanii* (Giongo et al., 2007), em amostras da estirpe SEMIA 587. O produto esperado da amplificação possuía 401pb.

As amplificações foram analisadas em gel de agarose 1,5%, 10x15cm, submetidas à eletroforese horizontal com tampão TBE 1x por 1 hora a 60V .

Uma alíquota de 5 $\mu$ L de DNA amplificado foi misturada com alíquotas decrescentes de *Blue green* (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), iniciando-se com 1 $\mu$ L (denominado 6X) e diminuindo-se à metade, até a concentração 1:0,015 (denominada 1X).

O padrão de perfil eletroforético foi comparado com o produto amplificado corado com brometo de etídio (0.5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>).

### 3.5. Identificação molecular das estirpes isoladas e dos inoculantes comerciais.

As amostras das estirpes isoladas, suas misturas (1:1/v:v) e dos inoculantes líquidos extraídos com kit Wizard DNA Purification® (Promega corp., Madison, USA), bem como as amostras dos inoculantes turfosos

extraídos com kit Power Soil®DNA isolation kit (MO Bio, Carlsbad, CA) foram encaminhados para avaliação da metodologia de identificação molecular.

### **3.5.1 Reação da PCR com sequências repetitivas no genoma (rep-PCR), conforme previsto na IN nº30/2010 (MAPA, 2010)**

As amostras foram amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores das sequências repetitivas BOX (BOX A1 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994) e ERIC (ERIC1-R: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3' e ERIC2 5'-AAGTAAGT GACTGGGGTGAGCG-3')(de Bruijn, 1992), que amplificam perfis de bandas entre 3000 e 100 pb.

As reações de PCR foram otimizadas em 25µL, realizadas em triplicata, e as condições da reação estão listadas na tabela 3, bem como as condições de amplificação no termociclador (Amplitherm, modelo TX96) listadas na tabela 4.

Utilizou-se como controle negativo uma reação contendo 20 µL da mistura de reação de amplificação, sem DNA, e 5 µL de água ultrapura para completar o volume de 25µL. As reações foram realizadas em triplicatas.

As amplificações foram analisadas em gel de agarose 1,5%, 10x15cm, submetidas à eletroforese horizontal com tampão TBE 1x por 2,5 horas a 60V, coradas com *Blue Green* (LGC Biotecnologia, São Paulo, BR) e comparadas com marcador molecular *Ladder* 400pb (Ludwig Biotecnologia, Porto Alegre, BR). O gel foi visualizado no fotodocumentador KODAK G2200.

**TABELA 3.** Condições de amplificação da PCR

Reagentes	Volume na reação ( $\mu\text{L}$ )		Concentração final
	BOX	ERIC	
H <sub>2</sub> O ultrapura	9,3	8,3	-
dNTP's (10mM)**	5	5	200mM cada
Tampão 10X*	2,5	2,5	10X
MgCl <sub>2</sub> (50mM) *	1	1	1,5mM
Primer (10pmol)	1	1	10pmol
DMSO	1	1	-
Taq polimerase (5U $\mu\text{L}^{-1}$ ) *	0,2	0,2	1U
DNA	5	5	30ng
<b>Total</b>	<b>25<math>\mu\text{L}</math></b>	<b>25<math>\mu\text{L}</math></b>	-

**TABELA 4.** Condições aplicadas no termociclador

Condições de amplificação	Ciclos	BOX		ERIC	
		Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tempo (min)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tempo (min)
Desnaturação inicial	-	95	7	95	7
Desnaturação	30	94	1	94	1
Anelamento		53	1	51	1
Extensão		65	8	65	8
Extensão final	-	65	16	65	16

Os fragmentos amplificados foram analisados no programa Gel Pro Analyser® 3.1 e transformados em uma matriz binária de base de dados, de maneira que 0 (zero) indica a ausência de banda e 1 (um) a presença da

mesma. A similaridade genética foi calculada pelo coeficiente de Jaccard (i, j) e o dendograma foi agrupado com algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) pelo programa NTSYS 2.0®.

### **3.5.2. Sequência específica das espécies *B. japonicum* e *B. elkani***

As amostras isoladas e os inoculantes para soja foram amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores Brady (5'-AMTKCCTTTGAKWYTKAAGATCTTG-3') + B<sub>jap</sub> (5'-GTCACATCTCTGCGACCGGTC-3), para a espécie *B. japonicum* e Brady (5'-AMTKCCTTTGAKWYTKAAGATCTTG-3') + B<sub>elk</sub> (5'-AACTCCGTCTCTGGAGTCCGCGA-3'), para a espécie *B. elkani* (Giongo et al., 2007), desenvolvidos para diferenciar as duas espécies de bradimirizóbios.

A reação de amplificação foi realizada contendo Tampão 10X (Invitrogen, Califórnia, USA); 1,5Mm de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Califórnia, USA), 1mM de dNTPs (Promega corp., Madison, USA); 1µL de DMSO; 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Califórnia, USA); 10pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 30ng de DNA molde e H<sub>2</sub>O ultrapura para completar 25µL.

As condições empregadas no termociclador (Amplitherm, modelo TX96) foram: um período inicial de desnaturação 94°C por 5min; seguido por 35 ciclos de 93°C por 1min de desnaturação; 67°C por 1min de anelamento; e, 72°C por 2min de extensão; e um período final de extensão a 72°C por 8min.

Utilizou-se como controle negativo uma reação contendo 20 µL da mistura de reação de amplificação, sem DNA, e 5 µL de água ultrapura para completar o volume de 25µL.

Os fragmentos esperados de aproximadamente 400pb foram verificados em eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% com TBE 1x, a 75V por 1h, corado com *Blue Green* (LGC Biotecnologia, São Paulo, BR) e comparados com marcador molecular *Ladder* 1Kb (Invitrogen, Califórnia, USA). O gel foi visualizado no fotodocumentador KODAK G2200.

### 3.5.3 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

As amostras foram amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores da região V3 do gene 16S rDNA de *E. coli*, 341f adicionado de um grampo de GC (5'-(GC)<sub>20</sub>CCTACGGGAGGCAGCAG-3') e 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3').

A reação de amplificação foi realizada contendo Tampão 10X (Invitrogen, Califórnia, USA); 1,5Mm de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Califórnia, USA), 1mM de dNTPs (Promega corp., Madison, USA); 1μL de DMSO; 1U de *Taq platinum* (Invitrogen, Califórnia, USA); 15pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 5μL de DNA molde e H<sub>2</sub>O ultrapura para completar 25μL.

As condições empregadas no termociclador (Amplitherm, modelo TX96) foram: um período inicial de desnaturação 93°C por 2min; seguido por 35 ciclos de 93°C por 45s de desnaturação; 53°C por 1min de anelamento; e, 72°C por 2min de extensão; e um período final de extensão a 72°C por 5min.

Os fragmentos esperados de aproximadamente 200pb foram verificados em eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% com TBE 1x, 5x7cm, a 75V por 1,5h, corado com *Blue Green* (LGC Biotecnologia, São Paulo, BR). Como padrão de peso molecular foi utilizado o *Ladder* 1Kb

(Invitrogen, Califórnia, USA) e o gel foi visualizado no fotodocumentador KODAK G2200.

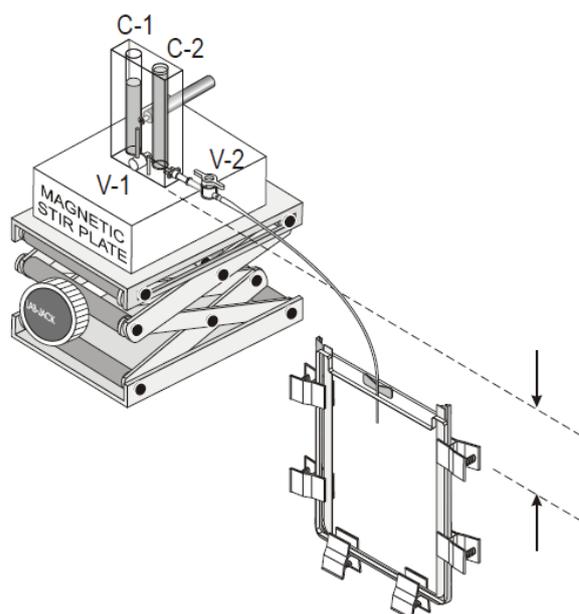
Os produtos de amplificação por PCR foram encaminhados para o DGGE (CBS Scientific Inc, San Diego, CA). A montagem do “sanduíche” de gel gradiente paralelo (15 x 17,5cm e 0,75mm de espessura) foi feita em uma superfície limpa, colocando-se a placa de vidro maior com cantos arredondados e envolvendo-a com a fita *gelWrap*. Posteriormente foram adicionados os espaçadores e a placa de vidro menor por cima da maior, formando o “sanduíche”, e lacrou-se os cantos das placas com grampos C-05.

A solução desnaturante 0% para preparar o gel 6% de poliacrilamida foi preparada utilizando-se agitação magnética constante. Em um frasco erlenmeyer, foram adicionados 5 mL de solução estoque de acrilamida/bisacrilamida 40%, 19,5mL de água destilada e 0,5 mL de solução tampão TAE 50X, completando o volume final em 25 mL. Em um segundo frasco erlenmeyer, para a solução desnaturante 100%, foram adicionados 5mL de solução estoque de acrilamida/bisacrilamida 40%, 0,5mL de TAE 50x e adicionou-se as 10,5g de uréia aos poucos, e então adicionou-se 10 mL de formamida, tudo sob agitação magnética e temperatura a 37°C. A partir das soluções padrão 0 e 100% montou-se o gradiente desejado de 55 e 65% (Tabela 5).

**TABELA 5.** Volumes das soluções desnaturantes (0 e 100%) necessários para a confecção do gradiente de desnaturação no gel de DGGE

Concentração do desnaturante	Solução 0%	Solução 100%
55%	6,75	8,25
65%	5,25	9,75

Em tubos *Falcon*, cada solução desnaturante, baixa (55%) e alta densidade (65%), foi adicionada 100 $\mu$ L de Persulfato de amônio 10% e 10 $\mu$ L de TEMED. Os tubos foram invertidos por repetidas vezes para homogeneizar a solução, sendo então a solução de baixa concentração transferida para canaleta C-1 e a solução de maior concentração à C-2 do *Gel Gradient maker* (Figura 1), com as válvulas V-1 e V-2 fechadas.



**FIGURA 1.** Montagem do gradiente do gel de DGGE

Fonte: Instruction Manual Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (CBS Scientific Inc, San Diego, CA).

O *Gel Gradient maker* foi elevado a uma altura de 15cm acima da estrutura “sanduíche” das placas de vidro e mantido em cima de um agitador magnético. Um tubo condutor foi conectado ao *Gel Gradient maker* em uma extremidade e a uma agulha na outra extremidade, ligando o *Gel Gradient maker* à estrutura sanduíche de placas de vidro.

O agitador magnético foi ligado com uma barra magnética (bailarina) na canaleta C2. Abriu-se a válvula V-1 e V-2 e preencheu-se o gel com gradiente desnaturante. Esse processo foi realizado em tempo inferior a 5 minutos, uma vez que a montagem do gel deve terminar antes do início da polimerização do mesmo. Em seguida o pente foi colocado, e foi aguardado 60 minutos para a polimerização do gel.

Na cuba de eletroforese foram colocados 23L de tampão de corrida (TAE 1X), sendo então aquecidos a 60°C por aproximadamente 2h. Passado os 60 minutos de polimerização do gel, o pente foi removido gentilmente e o sanduíche de placas de vidro contendo o gel foi então colocado no tanque de eletroforese.

As amostras aplicadas no gel com gradiente foram os produtos de amplificação com concentração de aproximadamente 300ng de DNA. Aproximadamente 20µL de amostra foram misturados a 5 µL de solução tampão de corrida de DGGE, e posteriormente aplicados nos poços do gel.

Para a corrida de DGGE, foi aplicada uma corrente de 150V por 6,5h em uma temperatura de 60°C. Após a eletroforese, o gel foi corado com 10 mL de solução de coloração com Sybr Safe (1:10000/ v:v) (Invitrogen, Califórnia, USA) previamente preparada. A solução de coloração do gel foi espalhada sobre o gel que foi deixado cerca de 1 hora no escuro. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada e então cuidadosamente transferido para o sistema de fotodocumentação KODAK G2200.

A similaridade entre as estruturas dos microrganismos presentes nos inoculantes foi determinada com base na presença ou ausência de bandas.

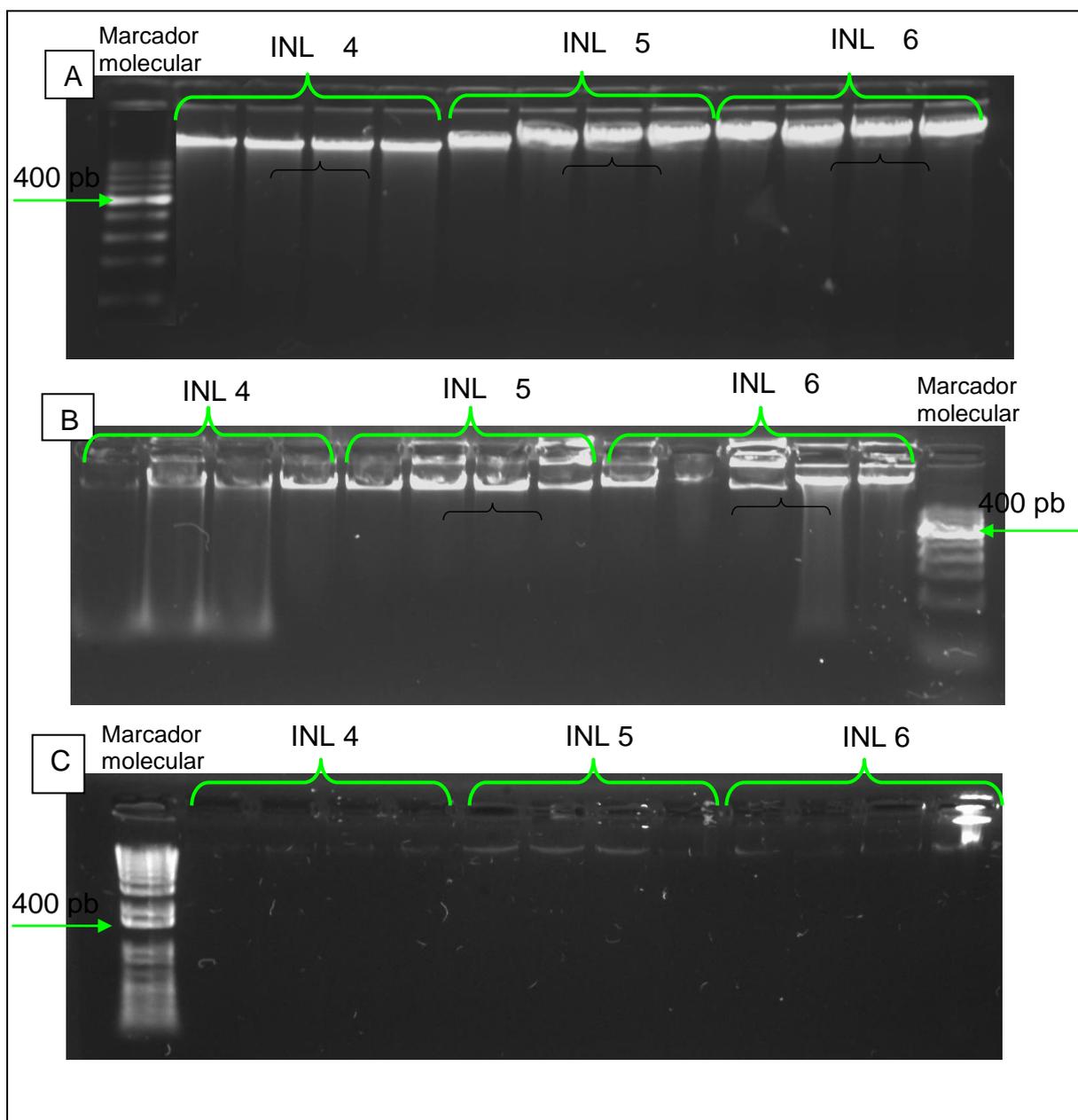
## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para estabelecer uma proposta eficiente de metodologia para a identificação dos microrganismos presentes nos inoculantes comerciais foram comparadas metodologias de extração de DNA, diferentes colorações e diferentes metodologias de análise molecular.

### **4.1 Extração de DNA**

Os métodos usados para extração de DNA foram denominados de extração com Sal (método com Acetato de Sódio), extração com Fenol (método com Fenol/Clorofórmio), kit para DNA (uso do Kit Wizard DNA Purification - Promega Corp., Madison, USA) e kit para solo (uso do Kit Power Soil - MO Bio, Carlsbad, CA).

O DNA das seis estirpes e dos vinte inoculantes comerciais foram extraídos com três metodologias distintas, com seis repetições. Os resultados indicam que, em geral, a extração com o kit para DNA mostrou-se eficiente para extrair maior quantidade de DNA (Média:  $265,3\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), em comparação com Sal (Média:  $77,4\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) e Fenol (Média:  $57,6\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) (Figura 2). Além de maior concentração de DNA extraído, as extrações realizadas com kit para DNA apresentam bandas bem formadas e pouco arraste (Figura 2A), quando comparadas às demais extrações.



**FIGURA 2.** Eletroforese em gel de agarose do DNA genômico extraído de inoculantes comerciais.

A) Extração com Kit para DNA, B) Extração com Sal e C) Extração com Fenol

As amostras de inoculantes líquidos Ab-V5, Ab-V6, INL2, INL8, INL13, INL 14 e INL16 não apresentaram diferenças na quantidade de DNA obtida com os diferentes métodos de extração ( $p > 0,5$ ). Dentre eles, destacam-se os inoculantes INL2, INL8 e INL13, que apresentaram baixas concentrações

de DNA extraído e grande viscosidade, muito provavelmente pela alta quantidade de carboximetilcelulose na sua formulação (Tabela 6). Além destes inoculantes, as estirpes padrão de *Azospirillum sp.* também não apresentaram diferença estatística entre as extrações, e quando comparadas às estirpes padrão de *Bradyrhizobium sp.*, apresentaram menores quantidades de DNA extraído, o que pode ser devido ao baixo tempo de crescimento a que foram submetidas. Apesar das baixas concentrações encontradas, a quantidade de DNA extraído foi suficiente para realização de reações em cadeia da polimerase (PCR).

Na tabela 6, observa-se que as amostras de inoculantes turfosos (INT18, INT19 e INT20) apresentaram concentrações menores de DNA quando comparadas com os demais inoculantes, contudo a utilização do Kit de DNA extraiu mais DNA do que os outros métodos.

Em cinco amostras de inoculantes líquidos (INL1, INL4, INL5, INL6 e INL11) as quantidades de DNA extraído com as três metodologias utilizadas diferiram significativamente entre si ( $p < 0,5$ ).

**TABELA 6.** Quantidades de DNA obtidas com o uso de métodos de extração com Kit, Sal e Fenol (médias de 6 repetições)

Inoculante	Média (ng/ $\mu$ L) $\pm$ SD *		
	Kit	Sal	Fenol
<b>SEMIA 5080</b>	290,3 $\pm$ 46,9 <sup>a</sup>	37,4 $\pm$ 13,4 <sup>b</sup>	42,0 $\pm$ 19,4 <sup>b</sup>
<b>SEMIA 5079</b>	312,5 $\pm$ 39,6 <sup>a</sup>	51,6 $\pm$ 18,0 <sup>b</sup>	44,8 $\pm$ 11,2 <sup>b</sup>
<b>SEMIA 587</b>	270,3 $\pm$ 71,4 <sup>a</sup>	24,5 $\pm$ 9,3 <sup>b</sup>	39,7 $\pm$ 22,6 <sup>b</sup>
<b>SEMIA 5019</b>	263,5 $\pm$ 32,5 <sup>a</sup>	19,8 $\pm$ 4,2 <sup>b</sup>	31,5 $\pm$ 16,5 <sup>b</sup>
<b>Ab-V5</b>	24,4 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	22,4 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	19,8 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>
<b>Ab-V6</b>	31,2 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	27,9 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	28,7 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>

<b>INL 1</b>	428,2 ± 16,6 <sup>a</sup>	137,8 ± 28,9 <sup>b</sup>	35,0 ± 9,2 <sup>c</sup>
<b>INL 2</b>	3,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,6 ± 3,2 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,8 <sup>a</sup>
<b>INL 3</b>	351,8 ± 57,0 <sup>a</sup>	42,3 ± 16,9 <sup>b</sup>	25,7 ± 6,8 <sup>b</sup>
<b>INL 4</b>	347,4 ± 100,7 <sup>a</sup>	193,0 ± 59,6 <sup>b</sup>	21,9 ± 11,6 <sup>c</sup>
<b>INL 5</b>	245,5 ± 65,5 <sup>a</sup>	124,4 ± 36,0 <sup>b</sup>	21,0 ± 3,4 <sup>c</sup>
<b>INL 6</b>	467,3 ± 56,5 <sup>a</sup>	50,6 ± 11,7 <sup>b</sup>	5,7 ± 2,3 <sup>c</sup>
<b>INL 7</b>	361,8 ± 116,3 <sup>a</sup>	156,3 ± 113,6 <sup>b</sup>	109,9 ± 26,0 <sup>b</sup>
<b>INL 8</b>	34,4 ± 8,7 <sup>a</sup>	38,0 ± 18,5 <sup>a</sup>	35,0 ± 13,0 <sup>a</sup>
<b>INL 9</b>	426,7 ± 133,7 <sup>a</sup>	167,9 ± 54,0 <sup>b</sup>	114,4 ± 23,7 <sup>b</sup>
<b>INL 10</b>	415,0 ± 51,4 <sup>a</sup>	36,7 ± 36,0 <sup>b</sup>	12,9 ± 2,3 <sup>b</sup>
<b>INL 11</b>	467,5 ± 52,0 <sup>a</sup>	325,0 ± 45,4 <sup>b</sup>	119,4 ± 37,6 <sup>c</sup>
<b>INL 12</b>	492,6 ± 78,8 <sup>a</sup>	68,8 ± 21,1 <sup>b</sup>	61,0 ± 57,5 <sup>b</sup>
<b>INL 13</b>	11,3 ± 6,43 <sup>a</sup>	7,9 ± 2,2 <sup>a</sup>	10,0 ± 6,6 <sup>a</sup>
<b>INL 14</b>	371,7 ± 87,6 <sup>a</sup>	238,8 ± 102,6 <sup>a</sup>	238,2 ± 74,8 <sup>a</sup>
<b>INL 15</b>	260,2 ± 70,6 <sup>a</sup>	36,3 ± 20,8 <sup>b</sup>	31,16 ± 24,4 <sup>b</sup>
<b>INL 16</b>	45,5 ± 5,2 <sup>a</sup>	28,2 ± 17,6 <sup>a</sup>	28,2 ± 19,0 <sup>a</sup>
<b>INL 17</b>	46,3 ± 8,6 <sup>a</sup>	4,5 ± 2,1 <sup>b</sup>	6,8 ± 4,9 <sup>b</sup>
<b>INT 18</b>	34,2 ± 7,2 <sup>a</sup>	13,9 ± 9,3 <sup>b</sup>	15,3 ± 2,8 <sup>b</sup>
<b>INT 19</b>	37,4 ± 4,6 <sup>a</sup>	16,5 ± 2,7 <sup>b</sup>	11,6 ± 2,7 <sup>b</sup>
<b>INT 20</b>	44,1 ± 4,5 <sup>a</sup>	12,9 ± 3,9 <sup>b</sup>	3,9 ± 0,5 <sup>c</sup>
<b>Média total</b>	<b>265,3</b>	<b>77,4</b>	<b>57,6</b>

\* Médias seguidas de mesma letra em linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de similaridade.

Com o intuito de verificar a qualidade do DNA obtido pelos métodos de extração foi realizada a amplificação por PCR com o oligonucleotídeo iniciador BOX-A1 (Versalovic et al., 1994), em duplicata. Os resultados das amplificações foram analisados e são mostrados na tabela 7. Das 26 amostras de DNA obtidas por cada metodologia de extração, 23 amostras de DNA (88,4%) extraídos com o uso do Kit de DNA amplificaram os fragmentos esperados; 15 extraídos com Sal (57,7%) amplificaram, e 20 extraídos com Fenol (76,9%) amplificaram. Do total das amostras de inoculantes analisadas, 60% dos DNAs obtidos com qualquer uma das metodologias testadas amplificaram, apenas duas amostras (INL2 e INL13) amplificaram somente com DNA obtido com a extração realizada com Kit de DNA e o DNA de 3 amostras

(os três inoculantes turfosos, nas duas repetições) não apresentaram ampliações independentemente do método utilizado.

**TABELA 7.** Comparação da eficiência dos três protocolos de extração

Tipo de extração	Duração média (h)	Nº de amostras	PCR	
			Amplificaram	Não amplificaram
Kit	3	26	23 (88,4%)	3 (11,6%)
Sal	18*	26	15 (57,7%)	11 (42,3%)
Fenol	6	26	20 (76,9%)	6 (23,1%)

\* Deve-se deixar *overnight*

A falta de amplificação provavelmente se deve à presença de contaminantes químicos no DNA extraído. Os contaminantes mais comuns das amostras ambientais são polissacarídeos, polifenóis ou ácidos húmicos e fúlvicos, de maneira que a presença dos mesmos pode reduzir ou até inibir a atividade da DNA polimerase, bem como amostras com altos níveis de polissacarídeos aumentam a viscosidade e podem produzir interferências nas análises moleculares (Fang et al., 1992; Han et al., 2010; Nunes et al., 2011). Observou-se que nenhuma das metodologias conseguiu extrair DNA livre de contaminantes químicos dos inoculantes turfosos, provavelmente devido à natureza do próprio suporte, a turfa, que é retirada da camada orgânica de solos de turfeiras e, portanto, constituída de substâncias muito diversas.

Em função dos resultados obtidos e visando-se a obtenção de DNA livre de contaminantes químicos, realizou-se a extração de DNA dos inoculantes turfosos com um Kit destinado a extração de DNA de solo (Power Soil®DNA isolation kit, MO Bio, Carlsbad, CA). A média da quantidade de DNA extraído pelo Kit de solo foi inferior ao obtido com o uso dos outros métodos (Tabela 8), contudo, todas as amostras de DNA dos inoculantes turfosos extraídas com Kit de solo foram amplificadas.

**TABELA 8.** Extração de DNA dos inoculantes turfosos (médias de 6 repetições).

Inoculantes Turfosos	Média (ng/μL) ± SD *			
	Kit	Sal	Fenol	Power Soil®
<b>INT 18</b>	34,2 ± 7,2 <sup>a</sup>	13,9 ± 9,3 <sup>b</sup>	15,3 ± 2,8 <sup>b</sup>	5,4 ± 0,9 <sup>a</sup>
<b>INT 19</b>	37,4 ± 4,6 <sup>a</sup>	16,5 ± 2,7 <sup>b</sup>	11,6 ± 2,7 <sup>b</sup>	6,5 ± 0,7 <sup>c</sup>
<b>INT 20</b>	44,1 ± 4,5 <sup>a</sup>	12,9 ± 3,9 <sup>b</sup>	3,9 ± 0,5 <sup>c</sup>	8,4 ± 0,6 <sup>b</sup>
<b>TOTAL</b>	28,5	6,93	11,1	6,76

\* Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de similaridade.

Os resultados observados nas condições deste estudo mostraram que a metodologia de extração de DNA empregada influi decisivamente na eficiência da amplificação. Essa influência foi observada tanto para o DNA extraído das amostras de inoculantes líquidos quanto de turfosos, onde foram observadas diferenças severas na qualidade do DNA extraído nas amostras, em função das metodologias empregadas (Tabela 7). Diferentemente dos resultados encontrados por VANYSACKER et al. (2011), que comparando metodologias de quatro kits comerciais de extração de DNA em lodo, verificou que a utilização de um determinado Kit comercial apresentava maiores quantidades de DNA extraído, entretanto, quando comparou a eficiência da amplificação, nenhuma das metodologias apresentou diferença estatística.

Também observou-se neste estudo que, embora a quantidade de DNA extraído e a qualidade do mesmo dependam do tipo de suporte utilizado na formulação do produto inoculante, a utilização de metodologias específicas para a extração de DNA, neste caso a extração com Kit de DNA e com Kit

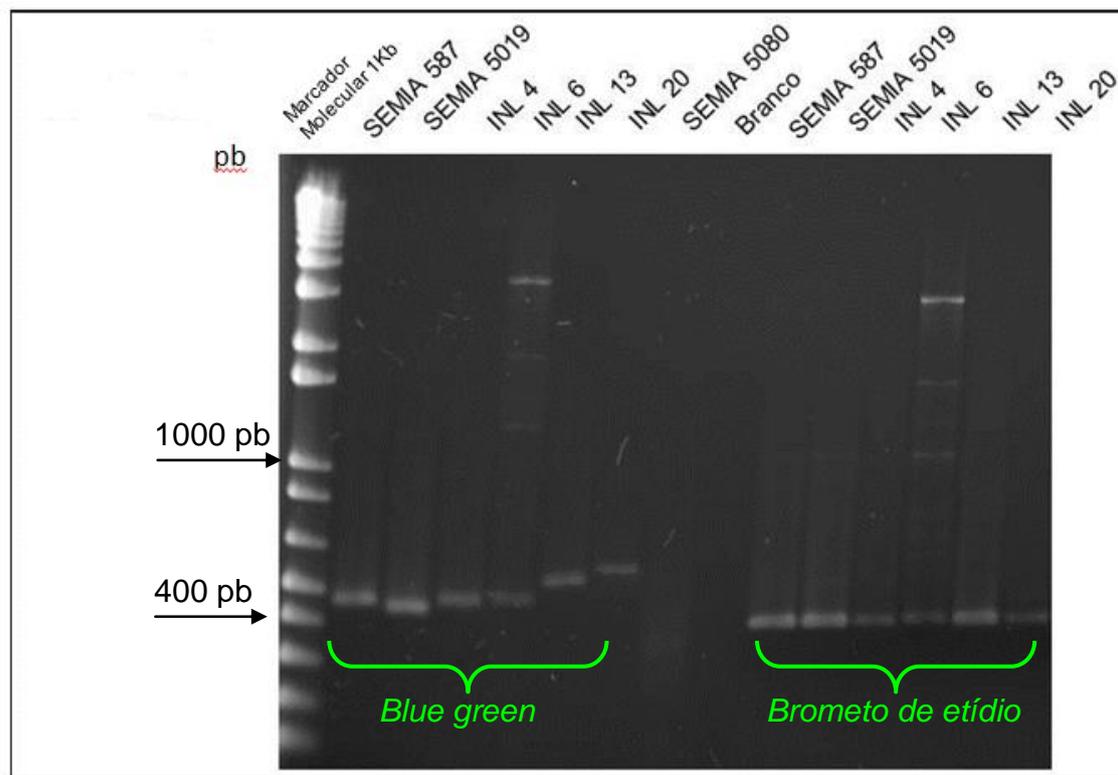
para solo, acarretaram em melhores resultados, tanto em termos de eficiência quanto em praticidade, mostrando-se adequados para uso em análises de rotina.

#### **4.2 Coloração do gel de agarose**

O método de coloração escolhido para corar os géis de agarose foi a que utiliza *Blue Green loading dye I* (LGC Biotecnologia, São Paulo, BR), o qual utiliza uma molécula modificada de cianeto não tóxica no lugar do tradicional brometo de etídio (BrEt), que por sua vez, é uma molécula classificada como de grande periculosidade, mutagênica, moderadamente tóxica e possível carcinogênica e teratogênica (Carcinello et al., 2008).

As instruções de uso do produto preveem a utilização de 1µL de *Blue Green loading dye I* (LGC Biotecnologia, São Paulo, BR) para cada 10µL de amostra. Entretanto, os resultados obtidos utilizando-se as instruções conforme o fabricante mostraram diferenças no perfil da corrida em eletroforese das amostras amplificadas.

O produto esperado para a amplificação com o oligonucleotídeo iniciador específico para a espécie *Bradyrhizobium elkanii* da estirpe SEMIA 587 era de 401pb (Giongo et al., 2007). Conforme figura 3, observou-se que o produto de 401pb foi correspondente com a corrida que utilizou a coloração com brometo de etídio, porém com a coloração com *Blue green*, as amostras não apresentaram um padrão idêntico de corrida para fragmentos que deveriam ter o mesmo tamanho, o que erroneamente poderia conduzir à observação de que as amostras possuísem tamanhos diferentes.

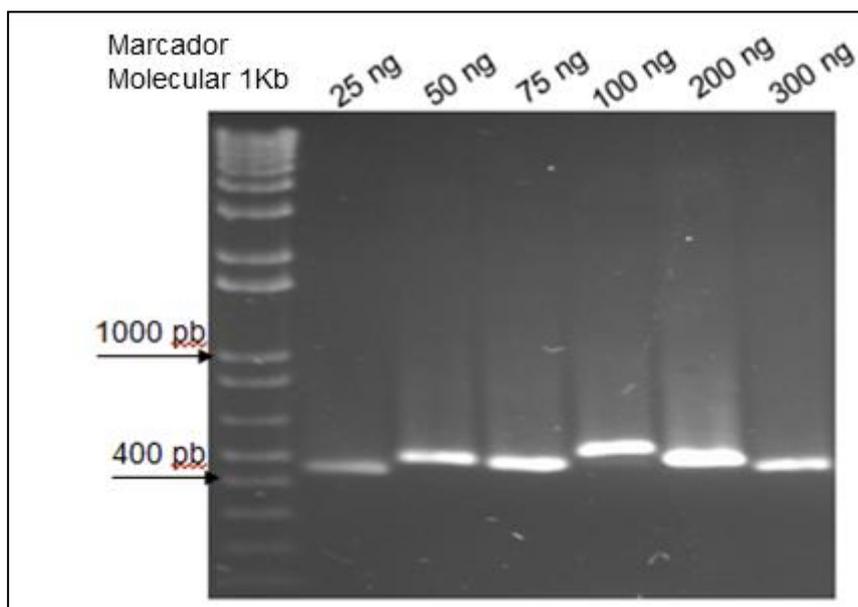


**FIGURA 3.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação específicos de *B. elkanii*.  
 Canaleta 1: Marcador Molecular 1Kb; Canaletas 2 a 6: coloração com *Blue green*; Canaleta 7: controle positivo; Canaleta 8: Controle negativo; Canaletas 9 a 14: coloração com brometo de etídio

Em função dos resultados obtidos, optou-se por verificar se a concentração de DNA da amostra causava diferença no perfil da corrida em eletroforese, por isso, aplicou-se 0,5 $\mu$ L de *Blue green* em 5 $\mu$ L de amplificações do fragmento específico de *B. elkanii* em amostras da SEMIA 587 com concentrações crescentes de DNA: 25ng, 50ng, 75ng, 100ng, 200ng e 300ng.

As amostras com diferentes concentrações de DNA apresentaram perfis de corrida diferentes e nenhum fragmento posicionou-se na altura esperada de 401pb, que deveria estar mais próximo à posição de 400pb do marcador 1Kb utilizado (Figura 4). Não houve correlação entre o perfil da corrida da eletroforese e a quantidade de DNA da amostra. Destaca-se que a amostra com 25ng e a com 300ng de DNA apresentaram perfis de corrida

semelhantes, diferentemente do que era previsto, pois acreditava-se que o *Blue green* poderia “pesar” na corrida das amostras com maior concentração de DNA.

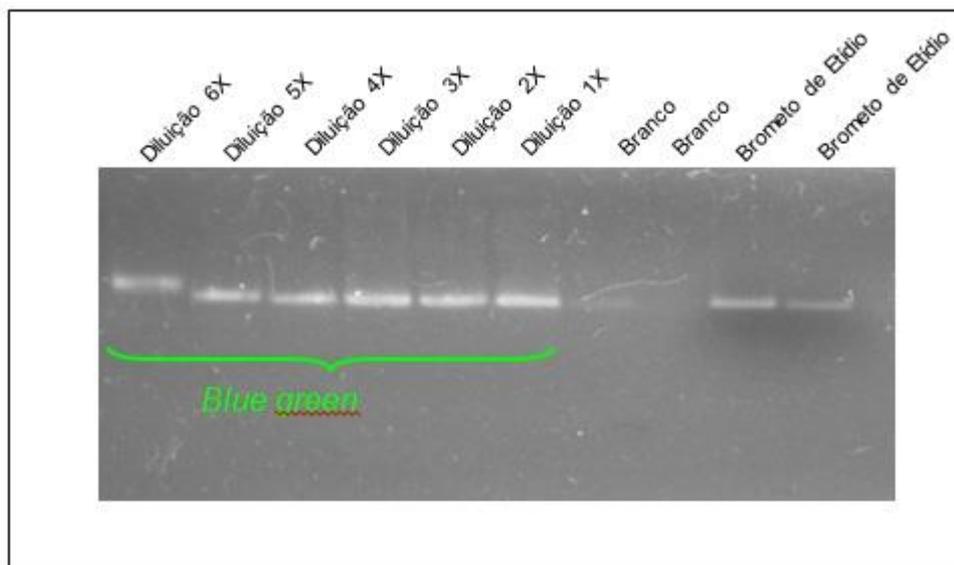


**FIGURA 4.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação específicos de *B. elkanii*.  
Canaleta 1: Marcador Molecular 1Kb; Canaletas 2 a 7: Diferentes concentrações de DNA.

Portanto, constatou-se que, provavelmente, a causa da alteração no perfil de corrida da eletroforese poderia ser a quantidade de *Blue green* utilizada e não a concentração da amostra. Por isso, foi realizada uma curva padrão com as concentrações decrescentes de *Blue green*, iniciando-se de 1  $\mu$ L para 5  $\mu$ L de amostra com aproximadamente 30ng (diluição 6X), e diluindo-se sempre pela metade, com água ultrapura, até a concentração de 0,015  $\mu$ L (diluição 1X).

Observou-se que as amostras coradas com diluições de *Blue Green* menores do que 4X (0,25  $\mu$ L de *Blue green* para cada 5  $\mu$ L de DNA amplificado)

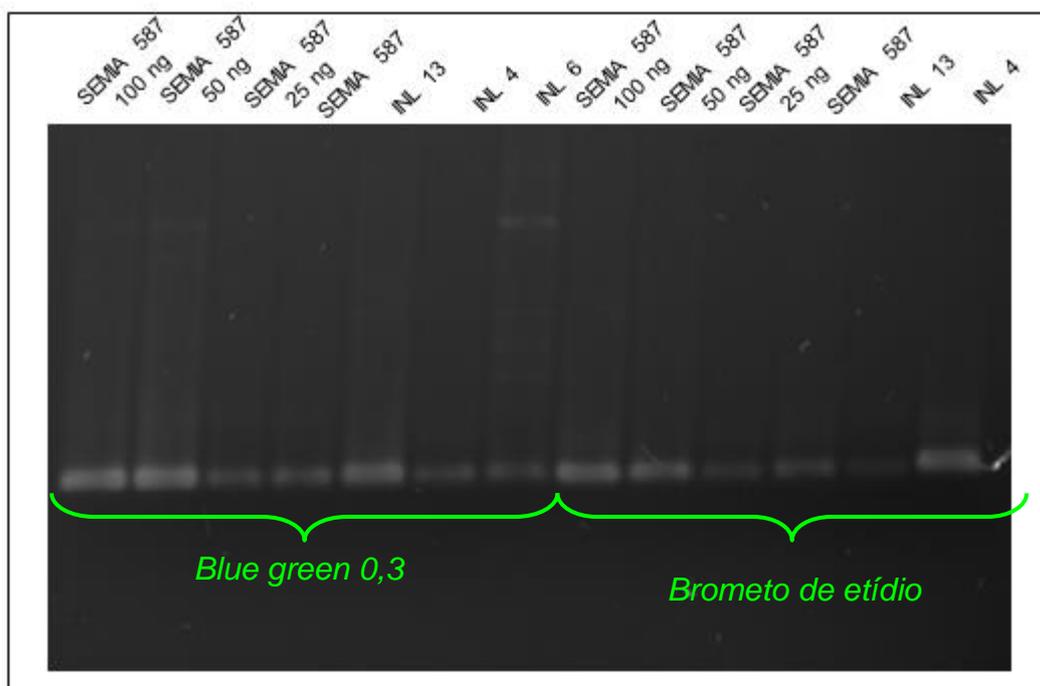
apresentavam padrão de corrida semelhante, para o mesmo produto de amplificação, praticamente não havendo diferença com a maior diluição (diluição 1X) (Figura 5), quando comparadas a coloração com brometo de etídio.



**FIGURA 5.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação cíficos de *B. elkanii*. Canaletas 1 a 6: Estirpe SEMIA 587 corada com *Blue green* diluído; Canaletas 7 e 8: Controle negativo; Canaletas 9 e 10: Estirpe SEMIA 587 corada com brometo de etídio

Em função dos resultados obtidos, foram realizados novos testes de perfil de corrida em eletroforese com a utilização da maior diluição de *Blue green* (diluição 1X) e observou-se que em muitos casos o corante saía da canaleta ou a coloração sumia em algumas amostras após 1h de corrida em eletroforese, o mesmo aconteceu para as diluições 2 e 3X. Provavelmente estas diluições tenham sido muito elevadas, e fizeram com que o corante perdesse peso e saísse da canaleta.

Os testes realizados com a diluição intermediária de 4X (0,25µL de *Blue green* para 5µL de amostra) apresentaram resultados satisfatórios quanto ao perfil de corrida em eletroforese do DNA amplificado, para diferentes amostras e também para diferentes concentrações da mesma amostra. No entanto, quando testada em ampliações que geravam vários fragmentos, por exemplo, perfis BOX (Versalovic et al., 1994), a diluição teve que ser calibrada, pois em alguns casos o corante não pesava suficientemente e acabava saindo da canaleta, e por isso optou-se por aumentar a quantidade de *Blue green* por amostra. Deste modo, estabeleceu-se que a concentração de *Blue green* utilizada neste trabalho foi de 0,3µL para cada 5µL de amostra, independentemente do tipo de amplificação (Figura 6).



**FIGURA 6.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação específicos de *B. elkani*. Canaletas 1 a 7: Coradas com *Blue green*; Canaletas 8 a 13: Coradas com brometo de etídio

Destaca-se que o ideal é diluir o *Blue green* em água ultrapura, pois o produto é bastante denso e a alíquota por amostra é pequena, sendo facilmente sugado mais produto do que necessário. Visto que pequenas quantidades podem interferir na corrida em eletroforese, utilizou-se como metodologia padrão para coloração de gel de agarose 1  $\mu$ L de solução (0,3  $\mu$ L de *Blue green* + 0,7  $\mu$ L de água ultrapura) para cada 5  $\mu$ L de amostra.

Muitos trabalhos de grupos brasileiros utilizando a coloração com *Blue green* podem ser encontrados na literatura atual (Borowsky et al., 2009; Santos et al., 2010; Martins et al., 2011; Carvalho et al., 2012). Em sua maioria, as instruções de uso restringem-se às recomendadas pelo fabricante ou simplesmente a coloração é citada. Nenhum dos trabalhos cita problemas com a corrida de eletroforese, nem há citações relatando esse problema na literatura.

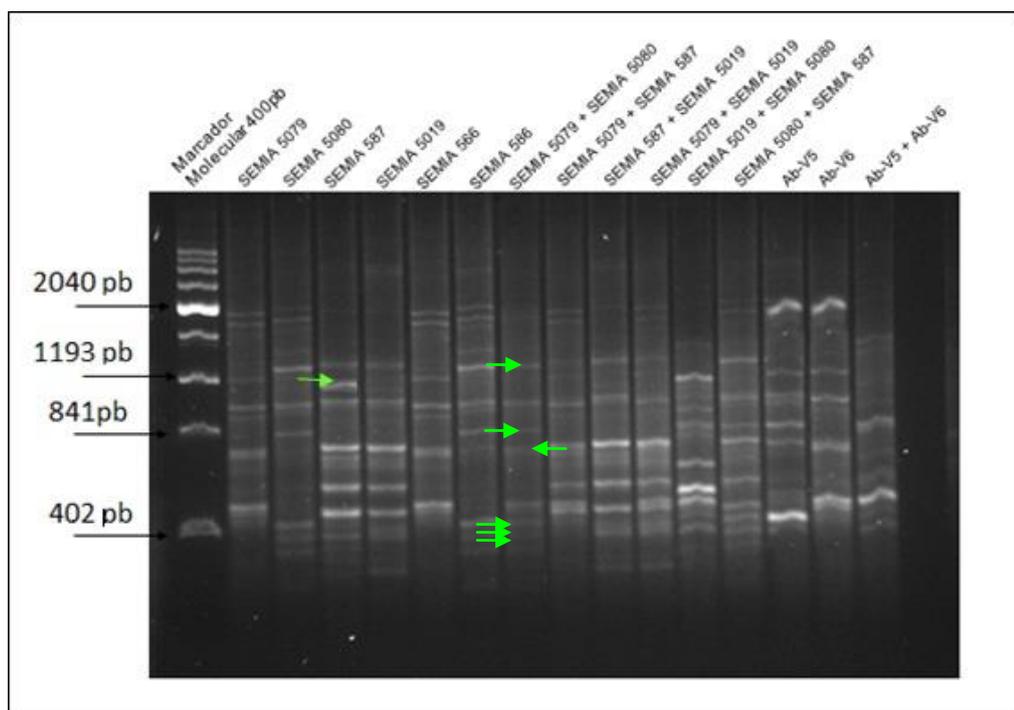
Colorações de DNA em gel de agarose podem ser utilizadas como substitutas ao brometo de etídio, como SYBR green® e SYBR safe® (Promega Corp., Madison, USA), GelRed® (Biotium Inc., Hayward, CA) e o próprio *Blue green* (LGC Biotecnologia, São Paulo, BR) entre outros, prometendo maior sensibilidade, maior estabilidade e menor toxidez.

### **4.3 Identificação molecular das estirpes isoladas e dos inoculantes comerciais.**

#### **4.3.1 Sequências repetitivas no genoma (rep-PCR)**

Na figura 7, são apresentados os perfis eletroforéticos das amplificações por PCR do oligonucleotídeo iniciador BOX-A1 das estirpes isoladas e suas respectivas misturas (1:1/v:v), onde os tamanhos variaram

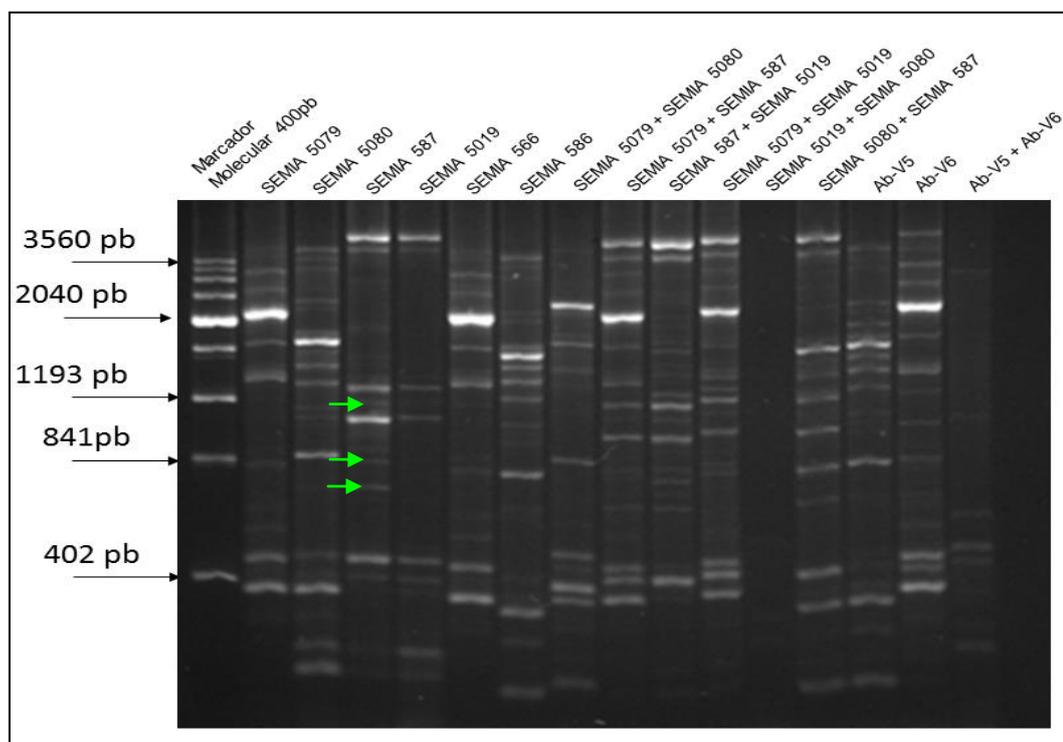
entre 2000 e 300 pb, e em média obtiveram 17 fragmentos amplificados. O oligonucleotídeo iniciador ERIC apresentou em média 20 fragmentos e os tamanhos variaram entre 4000 e 200 pb (Figura 8). Os perfis eletroforéticos foram testados em triplicata e mostraram 80% de reprodutibilidade, indicando robustez à técnica.



**FIGURA 7.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de BOX-PCR das estirpes isoladas e das suas misturas. Canaleta 1: Marcador Molecular de 400pb; Canaletas 2 a 16: Estirpes isoladas e misturas; Canaleta 17: Controle negativo

A metodologia de rep-PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC e BOX-A1 apresentou uma grande variabilidade de perfis. As estirpes SEMIA 5080 e SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium japonicum* e estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* apresentam perfis de amplificação distintos, conseguindo-se identificá-las quando isoladas. No entanto, o mesmo não foi observado com os perfis de bandas das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019, de

*Bradyrhizobium elkanii*, que foram muito semelhantes, exceto pela banda de aproximadamente 1100pb no perfil BOX da estirpe SEMIA 587, marcado na figura 7, e as bandas de 1100, 840 e 600pb no perfil ERIC da mesma estirpe, marcados na figura 8.



**FIGURA 8.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de ERIC-PCR das estirpes isoladas e das suas misturas. Canaleta 1: Marcador Molecular de 400pb; Canaletas 2 a 16: Estirpes isoladas e misturas; Canaleta 17: Controle negativo

As estirpes SEMIA 5080 e SEMIA 5079 apresentaram o mesmo perfil de amplificação que as suas SEMIAS parentais, SEMIAS 566 e 586, respectivamente, ou seja, 100% de similaridade nos perfis obtidos com as referidas amplificações. Resultados semelhantes foram encontrados por MENNA et al. (2009).

Quando analisados os perfis de bandas do DNA extraído das misturas das estirpes, observou-se que os mesmos não apresentavam

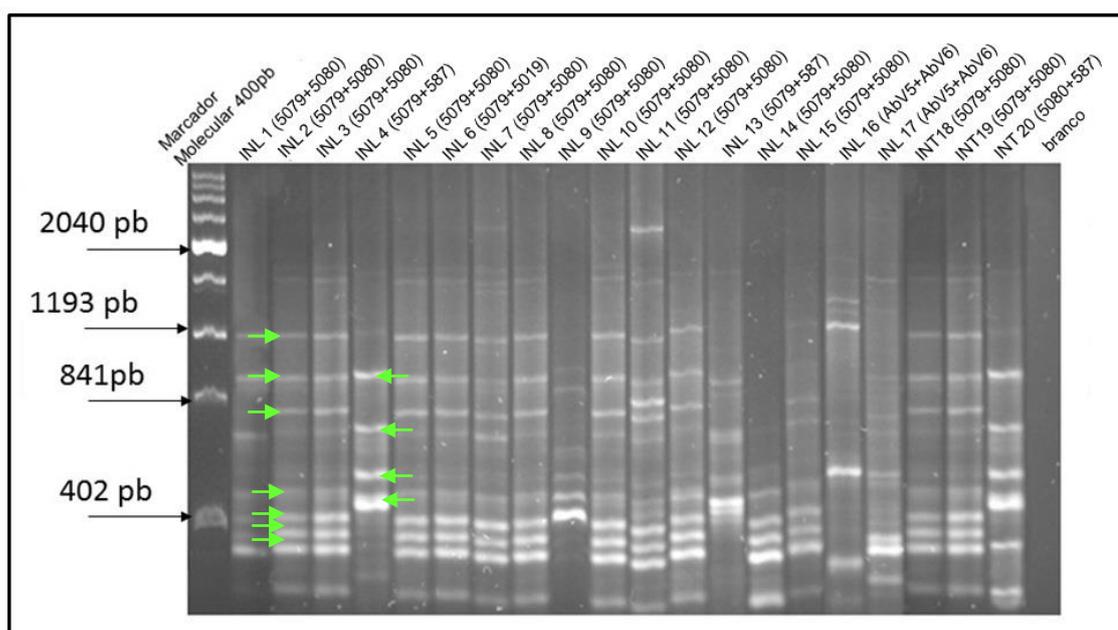
exatamente a união dos perfis das suas estirpes formadoras. No entanto, observando os perfis eletroforéticos das figuras 7 e 8, nota-se que a metodologia BOX-PCR parece apresentar fragmentos com maior semelhança entre os perfis das misturas e das estirpes puras. O perfil de amplificação da mistura das estirpes SEMIA 5080 + SEMIA 5079 para BOX-PCR apresenta fragmentos nos tamanhos 1200, 840 e três bandas abaixo de 402pb vindas da estirpe SEMIA 5080, e a banda de 740pb vinda da estirpe SEMIA 5079.

A mistura das estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 587 apresenta duas bandas de aproximadamente 2000pb que parecem derivadas da SEMIA 5079, e as bandas de aproximadamente 500 e 700 pb derivadas da SEMIA 587. Por sua vez, a mistura das estirpes SEMIA 587 + SEMIA 5019 apresenta o perfil sem a banda de 1100pb que difere as duas estirpes, quando amplificadas isoladamente.

A ausência de bandas quando em mistura pode se dar pelo fato das ampliações de rep-PCR serem aleatórias e devido à ampla variedade destas sequências nos genomas microbianos, o que faz com que nem sempre as mesmas sequências sejam amplificadas (Torres et al., 2012), embora aparentemente alguns fragmentos sejam continuamente amplificados podendo repeti-los com confiabilidade.

Os resultados obtidos com as estirpes isoladas e com as suas misturas mostram que a análise do perfil eletroforético por rep-PCR, principalmente com o oligonucleotídeo iniciador BOX, podem ser úteis na identificação das misturas de estirpes que estão nos produtos inoculantes.

Na figura 9, são apresentados os perfis de amplificação BOX-PCR obtidos dos produtos inoculantes. As amplificações dos inoculantes com a mistura das estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 5080 seguiram um padrão de identificação onde pode-se observar os fragmentos de tamanhos 1200, 900, 740, 500pb e três fragmentos abaixo de 402pb. Para fins de comparação com as estirpes isoladas, as bandas de 1200 e 900pb e as três bandas abaixo de 402pb corroboram com o perfil encontrado da estirpe SEMIA 5080, já o fragmento de 500 e 740pb corrobora com o perfil da estirpe SEMIA 5079. O fragmento de 700pb parece não amplificar em todos os perfis dos inoculantes.



**FIGURA 9.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de BOX-PCR dos produtos inoculantes.

Canaleta 1: Marcador Molecular de 400pb; Canaletas 2 a 21: Produtos inoculantes e misturas; Canaleta 22: Controle negativo

As amplificações contendo os inoculantes com a mistura das estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 587 apresentaram alguns fragmentos em comum (INL4 e INL13). Os fragmentos de 900 e 500pb concordam com o perfil encontrado para a estirpe SEMIA 5079 isolada e o fragmento de 600pb com a

SEMIA 587. Entretanto, a banda de 1100pb que diferenciaria a estirpe SEMIA 587 da SEMIA 5019 não foi amplificada (Figura 9).

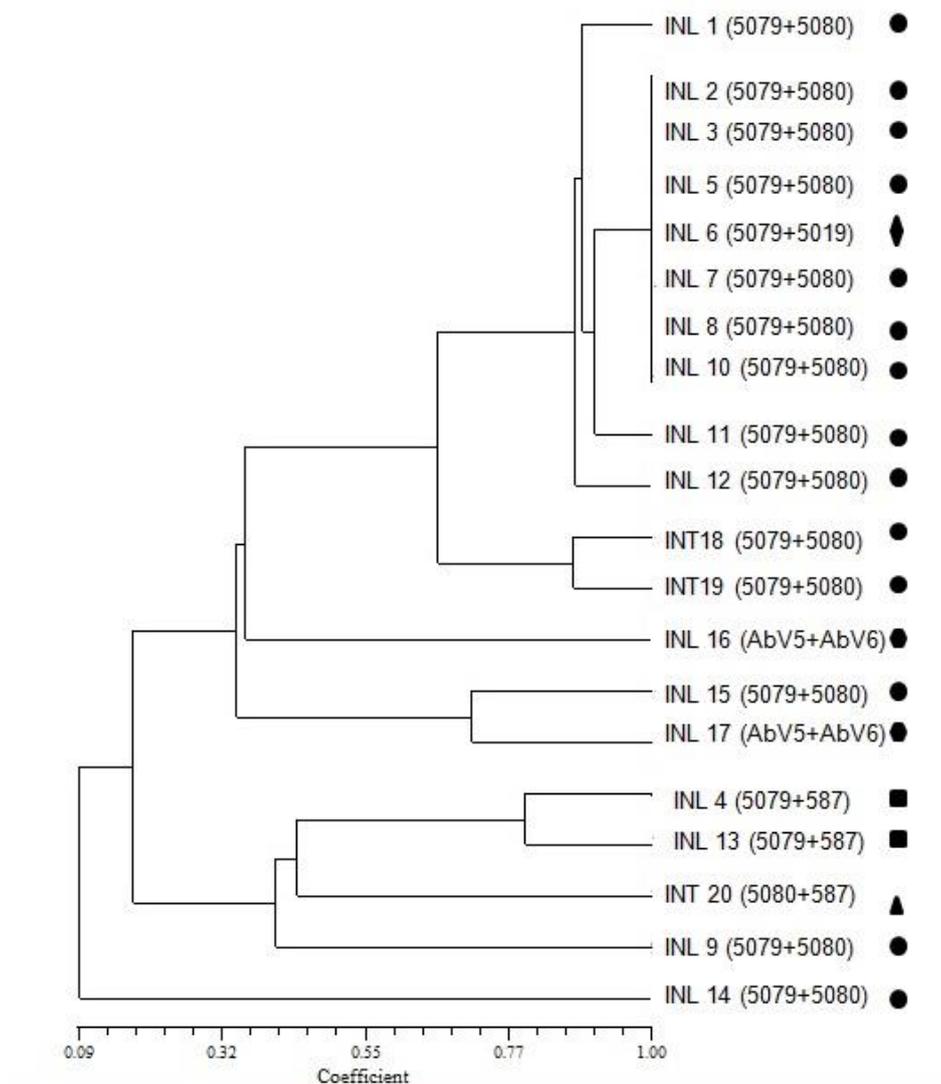
A amplificação com o inoculante contendo a mistura SEMIA 5079 + SEMIA 5019 (INL6) apresentou um perfil idêntico ao encontrado para a mistura entre as SEMIAs 5079 e 5080. E por sua vez, o INT 20, que contém a mistura SEMIA 5080 + SEMIA 587, apresentou fragmentos de 600 e 500pb semelhantes ao encontrado para SEMIA 587 e o fragmento de 900pb que poderia vir da SEMIA 5080, embora o perfil encontrado esteja semelhante ao perfil para a mistura SEMIA 5079 + SEMIA 587.

Os inoculantes de *Azospirillum* sp., INL16 e INL17, mesmo contendo a mistura das mesmas estirpes, não apresentaram o mesmo perfil de amplificação. E também não apresentaram semelhanças com os perfis das estirpes isoladas. Neste caso, este tipo de análise não poderia ser recomendado para identificação dos inoculantes destinados à promoção de crescimento.

Na figura 10 é apresentado o dendograma de similaridade dos perfis gerados com BOX-PCR. Observa-se que os produtos inoculantes formaram três *clusters* agrupados com aproximadamente 25% de similaridade, de maneira que pode-se observar a separação entre as misturas dos inoculantes.

A similaridade entre os inoculantes INL2, INL 3, INL5, INL6, INL 7, INL 8, INL 10 foi de 100%, e entre estes e os inoculantes INL1, INL11e INL12 foi de aproximadamente 85%. Já os inoculantes turfosos INT18 e INT19 agruparam com 60%. Poderia se dizer que este grande *cluster* agruparia os inoculantes com a mistura SEMIA 5080 + SEMIA 5079, entretanto,

estranhamente destaca-se o INL6, que em sua embalagem indicava a presença das estirpes SEMIAS 5079 e SEMIA 5019, mas que não se observa com este resultado (figura 9 e figura 10).



**FIGURA 10.** Análise de similaridade com índice de *Jaccard* e agrupamento por UPGMA dos inoculantes comerciais e as estirpes recomendadas.

Verifica-se que o inoculante INL 14 (SEMIA 5079 + SEMIA 5080) agrupou-se com menos de 10% de similaridade com os outros inoculantes. Pondera-se que contaminantes que não foram retirados na extração de DNA podem ter interferido nesta amplificação.

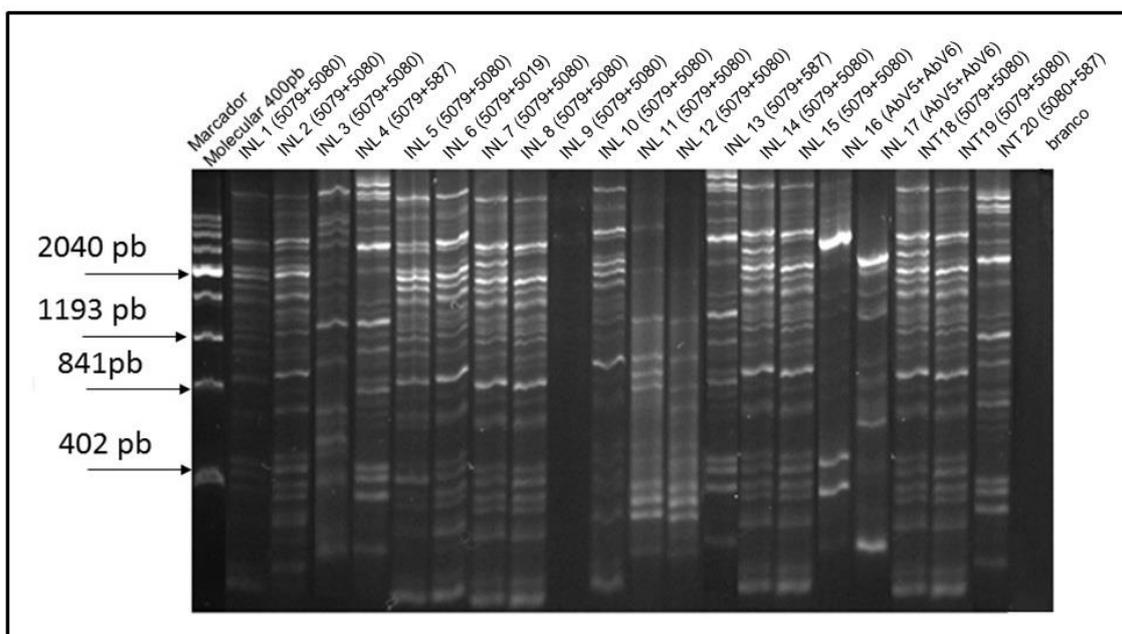
Os inoculantes com a mistura dos *Azospirillum sp.* agruparam-se com inoculantes contendo a mistura SEMIA 5079 + SEMIA 5080, mas não entre si, mesmo contendo a mesma mistura de estirpes.

Destaca-se que os inoculantes contendo a mistura SEMIA 5079 + SEMIA 587 agruparam-se com 80% de similaridade, e estes possuem 40% de similaridade com o INL 20, que contém a mistura SEMIA 5080 + SEMIA 587.

Na figura 11, são apresentados os perfis de amplificação de ERIC-PCR obtidos dos produtos inoculantes. O perfil das amplificações com o oligonucleotídeo ERIC mostrou-se mais diverso, e por isso distinguir fragmentos polimórficos torna-se mais complexo.

Da mesma maneira que nos perfis BOX, os inoculantes contendo a mistura das estirpes SEMIA 5080 + 5079 formaram perfis semelhantes de amplificação, excetuando-se o INL 3. Destaca-se o fragmento de aproximadamente 2000pb que condiz com o encontrado na estirpe SEMIA 5079 e o fragmento de aproximadamente 1200bp, encontrado na estirpe SEMIA 5080.

Os inoculantes INL 4, INL 13 e INT 20 apresentaram perfis semelhantes de amplificação, embora os primeiros contenham a mistura SEMIA 5079 + SEMIA 587; e o último a mistura SEMIA 5080 + SEMIA 587.



**FIGURA 11.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação de ERIC-PCR dos produtos inoculantes.

Canaleta 1: Marcador Molecular de 400pb; Canaletas 2 a 21: Produtos inoculantes e misturas; Canaleta 22: Controle negativo

Corroborando com os resultados encontrados nas análises com BOX, o perfil dos inoculantes contendo *Azospirillum sp.* não foram idênticos e o INL 9 apresentou poucos fragmentos.

Destaca-se o INL 14, que na amplificação com BOX apresentou poucas bandas, já com ERIC apresentou perfil semelhante aos inoculantes com a mistura SEMIA 5079 + SEMIA 5080.

Na figura 12 é apresentado o dendograma de similaridade dos perfis gerados com ERIC-PCR. Observa-se que quase todos os produtos inoculantes com mistura SEMIA 5079 + SEMIA 5080 ficaram agrupados num cluster com aproximadamente 50% de similaridade.

Os inoculantes com a mistura das estirpes SEMIA 5080 + SEMIA 5079 (INL5, INL7, INL8, INL 14, INT18 E INT19) agruparam-se com 100% de

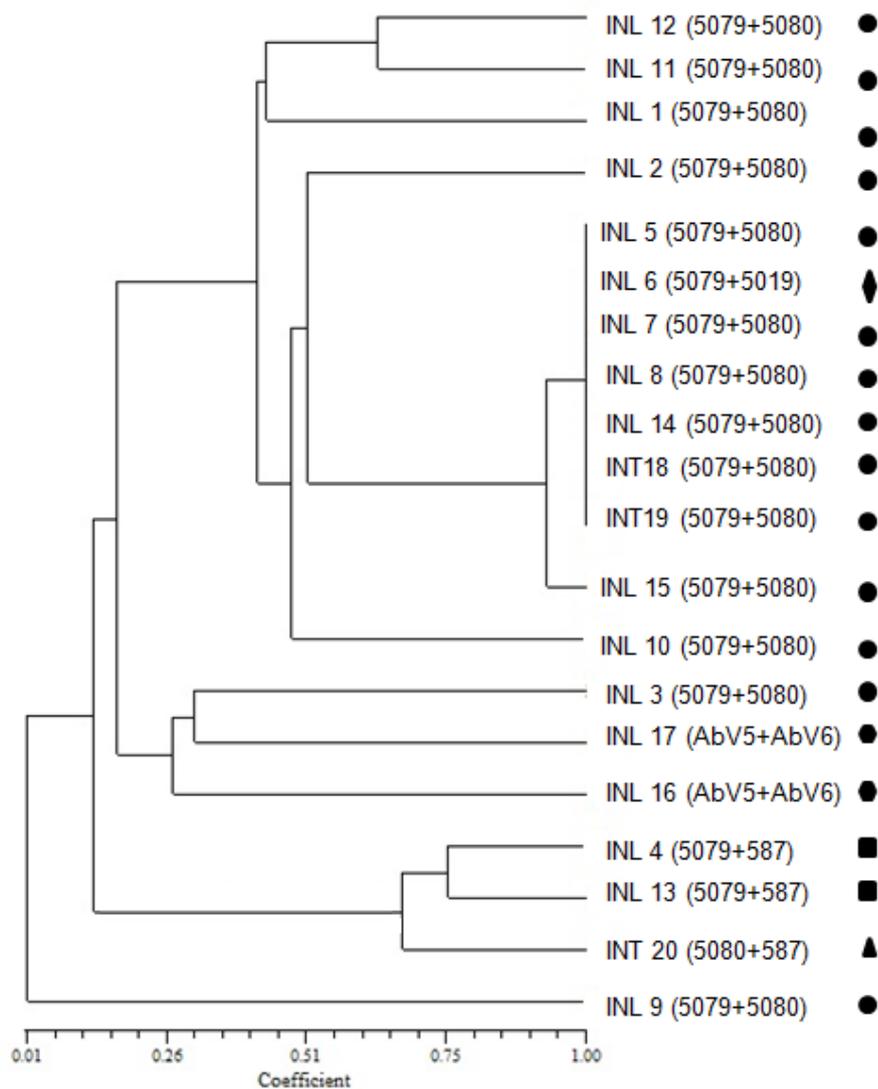
similaridade, incluindo novamente, o INL 6, cuja mistura não é a mesma. Os inoculantes INL11 e INL 12 agruparam-se com 60% de similaridade. No entanto, o INL 3 apresentou um perfil diferente dos demais.

Os inoculantes INL 4 e INL13 apresentaram 75% de similaridade. E quando o perfil destes é comparado com o INL20, observa-se que o padrão de fragmentos é muito semelhante, entretanto não está na mesma altura, e agrupou-se com similaridade de aproximadamente 60%. Esse efeito pode ter acontecido por um erro de alíquota do corante *Blue green* na coloração do gel.

Os inoculantes de *Azospirillum* sp., INL16 e INL17, mesmo contendo as mesmas estirpes, não apresentaram o mesmo perfil de amplificação, e apresentaram poucos fragmentos em comum e obtiveram 20% de similaridade.

Identificar a diversidade dos rizóbios pela técnica de rep-PCR vem sendo utilizado em diversos estudos (de Bruijn, 1992; Chen et al., 2000; Ferreira e Hungria; 2002; Hungria et al., 2006; Kaschuk et al., 2006; Menna et al., 2009), principalmente para acesso a distribuição taxonômica dos mesmos, pois as sequências repetitivas BOX e ERIC (Versalovic et al., 1994 e de Bruijn, 1992) são efetivas para detecção a nível de estirpe, podendo assim acessar uma grande diversidade.

Os resultados mostraram que é possível fazer a distinção entre as estirpes isoladas através de rep-PCR para as estirpes recomendadas para os inoculantes de soja (SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 587 e SEMIA 5019), bem como para as estirpes recomendadas para trigo/milho (Ab-V5 e Ab-V6), em ambas as metodologias (BOX-PCR e ERIC-PCR), legitimando a IN 30/2010 (Figura 7 e Figura 8).



**FIGURA 12.** Análise de similaridade com índice de *Jaccard* e agrupamento por UPGMA dos inoculantes comerciais e as estirpes recomendadas.

A referida Instrução Normativa, quando indica análises de sequencias repetitivas consenso (BOX, ERIC e REP), em seu artigo n°23, recomenda a amplificação do DNA extraído das estirpes isoladas, e a comparação do perfil de amplificação deve ser realizada com a estirpe SEMIA 5079. Entretanto, o processo de isolamento das estirpes dos inoculantes, em placas de petri em meio CRYMA (Vicent, 1970), seguidas do crescimento das

UFCs, pode levar até 7 dias quando se tratando de bradimirizóbios, tornando o processo de identificação mais lento.

A extração de DNA diretamente dos inoculantes agiliza o processo de identificação das estirpes presentes nos inoculantes comerciais. Os resultados com a amplificação diretamente do DNA extraído dos inoculantes mostraram perfis distintos e passíveis de reprodução.

A metodologia de BOX-PCR mostrou-se mais robusta que o ERIC-PCR, e a utilização da mesma para a identificação das estirpes recomendadas para a soja dentro dos inoculantes funcionou para os inoculantes que continham a mistura das estirpes SEMIA 5080 + 5079 (Figura 9). Essa metodologia poderia ser útil para comparação dos perfis obtidos da mistura das estirpes SEMIA 5080 + SEMIA 5079 em inoculantes destinados a soja, visto que mais de 90% dos produtos fabricados contém esta formulação.

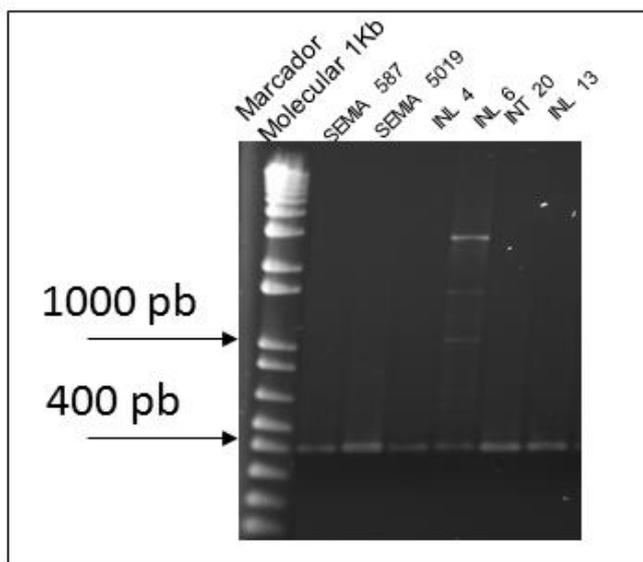
Os perfis dos inoculantes com a mistura das estirpes SEMIA 5079 + SEMIA 587 também apresentaram fragmentos polimórficos que permitiriam a sua identificação. No entanto, a metodologia não apresentou perfis confiáveis e condizentes com as estirpes isoladas para os inoculantes contendo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6.

#### **4.3.2 Sequências específicas para a separação das espécies *B. japonicum* e *B. elkanii*.**

Na figura 13 são apresentadas as amplificações com oligonucleotídeos específicos para a espécie *B. elkanii* dos inoculantes contendo as misturas SEMIA 5079 + SEMIA 587 (INL4, INL13) e SEMIA 5080 + SEMIA 587 (INT20). Já na figura 14, são apresentadas as amplificações com

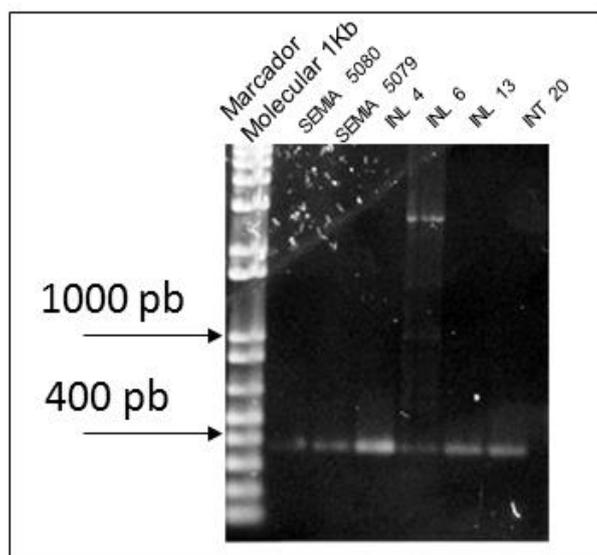
oligonucleotídeos específicos para a espécie *B. japonicum* para os mesmos inoculantes. Os fragmentos amplificaram na altura esperada de 401pb, indicando a presença de ambas às espécies nos inoculantes.

No entanto, o inoculante INL 6, que nas análises com rep-PCR apresentou 100% de similaridade com os inoculantes contendo a mistura SEMIA 5080 + SEMIA 5079, apresentou as ampliações na altura esperada de 401pb, para ambos os oligonucleotídeos, identificando-se também ampliações inespecíficas nas alturas de 1500, 2000 e 3000pb. Este resultado não condiz com os perfis encontrados nas análises com rep-PCR, e indica que na mistura há a espécie *B. elkanii*.



**FIGURA 13.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação específicos para *B. elkanii*.

Canaleta 1: Marcador Molecular de 1Kb; Canaletas 2 a 7: Produtos inoculantes

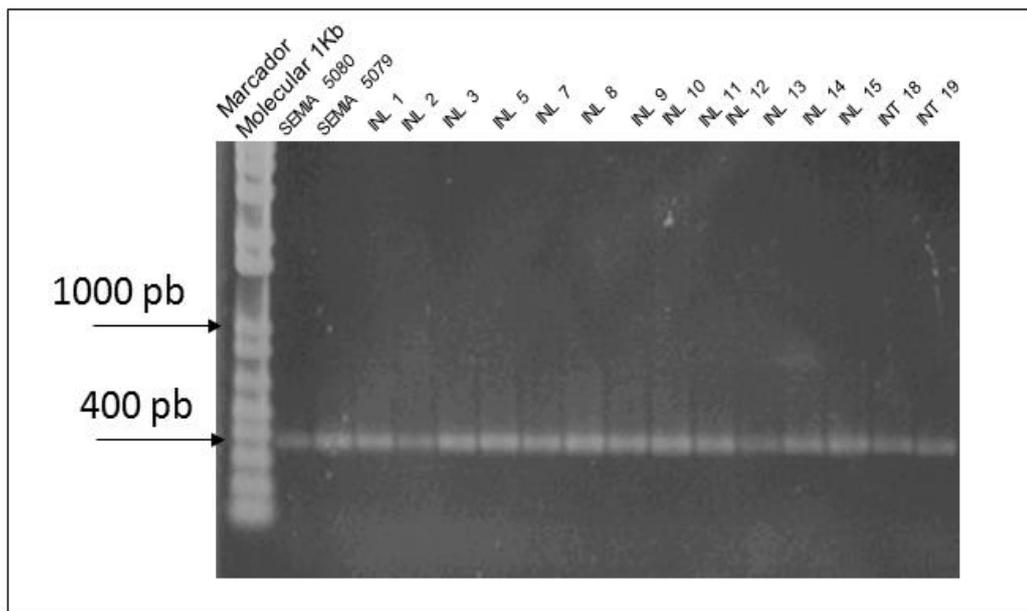


**FIGURA 14.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação específicos para *B. japonicum*.  
Canaleta 1: Marcador Molecular de 1Kb; Canaletas 2 a 7: Produtos inoculantes

Na figura 15, são apresentadas as ampliações dos inoculantes contendo a mistura SEMIA 5079 + SEMIA 5080 (INL1, INL2, INL3, INL5, INL7, INL8, INL9, INL10, INL11, INL12, INL14, INL15, INT18 e INT19), amplificados com o oligonucleotídeo específico para *B. japonicum*. Os inoculantes apresentaram amplificação na altura esperada, comprovando a existência desta espécie no produto.

Os resultados encontrados com essa metodologia indicam se as espécies de bradirrizóbios estão presentes no inoculante, entretanto não tem poder de discriminação entre as estirpes.

Testes foram realizados com os três oligonucleotídeos na mesma reação de PCR e corrida em eletroforese vertical em gel de poliacrilamida, a fim de obter fragmentos com tamanhos diferentes e assim conseguir a discriminação entre as espécies. Entretanto, os fragmentos apresentaram o mesmo tamanho, provavelmente diferenciando-se apenas na sequência da amplificação (dados não mostrados).



**FIGURA 15.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação específicos para *B. japonicum*.  
 Canaleta 1: Marcador Molecular de 1Kb; Canaletas 2 a 17: Produtos inoculantes

#### 4.3.3. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

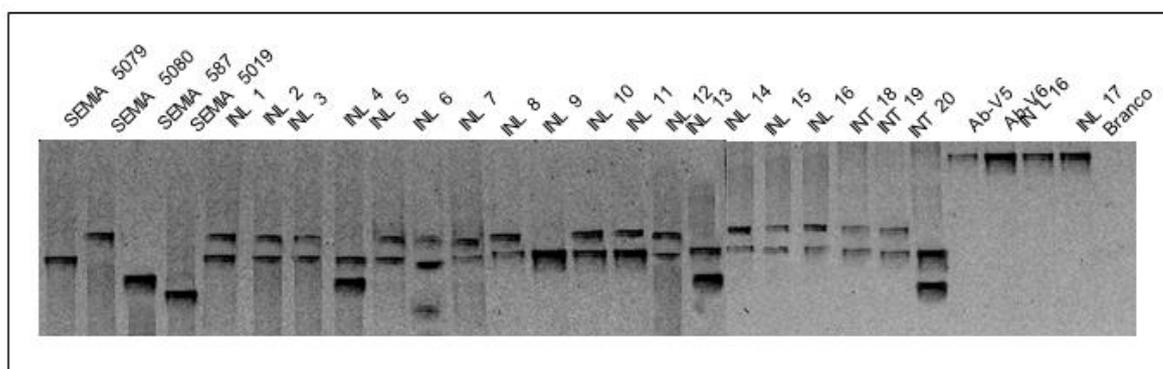
Os resultados da amplificação com DGGE apontaram fragmentos regularmente espaçados e com alturas específicas para as diferentes estirpes de soja - estirpes SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 587 E SEMIA 5019 (Figura 15). Da mesma forma, as misturas das estirpes encontradas nos inoculantes destinados à soja seguiram o perfil de separação, de maneira que foi possível identificar as estirpes presentes nos inoculantes com essa metodologia.

Dentre os resultados encontrados, destaca-se o INL 6, que em sua embalagem indicava as estirpes SEMIA 5019 + SEMIA 5079, no entanto nas análises anteriores apresentou perfis diferentes do esperado. No perfil do INL6 (Figura 15) visualiza-se 3 fragmentos, dois difusos, o primeiro na altura da

estirpe SEMIA 5080, e o segundo abaixo da SEMIA 5019. Já o terceiro, embora bem definido, não ficou na altura esperada para a SEMIA 5079, permanecendo entre as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 587. Concluindo-se então, que este inoculante provavelmente não apresenta as estirpes indicadas na sua embalagem.

O INT 20 também não apresentou fragmentos na altura esperada, pois a sua embalagem indicava a presença da mistura SEMIA 5080 + SEMIA 587, no entanto os fragmentos encontrados indicam a presença da SEMIA 5079 e a da SEMIA 587.

O INL9 apresentou somente uma amplificação na altura da estirpe SEMIA 5079. Este inoculante caracteriza-se como líquido-turfoso, e devido a presença de contaminantes oriundos da turfa, a amplificação pode ter sido prejudicada. As análises de rep-PCR do INL 9 também não apresentaram amplificações de boa qualidade.



**FIGURA 16.** Eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida e uréia (55 a 65%) dos produtos de amplificação da região V3 do 16S rDNA  
Canaleta 1 a 27: Produtos inoculantes; Canaleta 28: Controle negativo.

Os inoculantes contendo as estirpes de *Azospirillum sp*, Ab-V5 e Ab-V6 não apresentaram perfis polimórficos, não podendo assim diferenciá-los. Neste caso, acredita-se que o oligonucleotídeo iniciador utilizado para a amplificação em DGGE pode não ser polimórfico para as espécies de *Azospirillum sp* na região V3 e/ou o gradiente de desnaturação não foi suficiente para abrir o grampo GC, e por isso, as amostras não pararam em alturas diferentes.

Em consulta no genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com as indicações de hospedagem das sequências das estirpes SEMIA 5079 (acesso AF234888), SEMIA 5080 (acesso AF234889), SEMIA 587 (acesso AF234890) e SEMIA 5019 (AF237422) foi possível realizar a comparação entre as sequências da região V3, de aproximadamente 200pb, entre as estirpes. Os resultados mostram que as sequências diferem entre si em pequenas porcentagens, e a SEMIA 5080 possui o menor conteúdo GC nesta região, confirmando o resultado encontrado na análise de DGGE, onde fragmento desta estirpe aparentemente correu menos. Da mesma, as estirpes de *Azospirillum brasilense* também diferem entre si em pequenas porcentagens, o que leva a crer que a desnaturação aplicada às amostras não foi suficiente para separá-las.

A técnica de DGGE apesar de mais laboriosa permitiu a separação das estirpes de soja, identificando-se as estirpes presentes nos inoculantes. Acredita-se que esta metodologia possa ser utilizada para os demais inoculantes e suas estirpes recomendadas.

Da mesma forma que acredita-se que as análises dos inoculantes contendo as estirpes de *Azospirillum sp.* também poderão ser realizadas com essa técnica, mas com um gradiente de desnaturação diferente.

## 5. CONCLUSÕES

1. A extração de DNA recomendada pela IN 30/2010 foi eficiente para DNA de culturas puras, porém não foi eficiente para extração realizada diretamente do produto inoculante;

2. Foi possível identificar as estirpes recomendadas para inoculantes de soja, trigo e milho (SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 587, SEMIA 5019, Ab-V5 e Ab-V6) isoladas em culturas puras através de rep-PCR, tanto com o oligonucleotídeo BOX quanto com o oligonucleotídeo ERIC;

3. Os perfis de amplificação de rep-PCR foram reprodutíveis para as amostras de DNAs extraídos de culturas puras;

4. Foi possível fazer extração de DNA diretamente do produto inoculante e adquirir um DNA de qualidade capaz de amplificar em testes moleculares, principalmente através das extrações realizadas com Kit de DNA, para os inoculantes líquidos, e Kit para solo, para os inoculantes turfosos.

5. As amplificações realizadas diretamente do DNA extraído dos inoculantes mostraram perfis distintos para inoculantes contendo a mistura das estirpes SEMIA 5080 + SEMIA 5079 e a mistura SEMIA 5079 + SEMIA 5019 nas amplificações realizadas com o oligonucleotídeo BOX-PCR;

6. As estirpes de *Azospirillum* sp puderam ser identificadas somente quando isoladas, com a metodologia de rep-PCR;

7. O procedimento rotineiro para a identificação dos microrganismos presentes no produto inoculante destinado à soja contempla a extração de DNA diretamente do inoculante pela metodologia de Extração com Kit de DNA e Kit de Solo e amplificação dos DNAs com o oligonucleotídeo iniciador para a

região V3 do 16S rDNA, seguidas de eletroforese em gel de com gradiente desnaturante (DGGE), com gradiente entre 55 e 65%.

## **7. RECOMENDAÇÃO**

O presente trabalho fez parte do projeto aprovado pelo MAPA/CNPq, que previa estudos de comparação e otimização de metodologias de análise de inoculantes comerciais, o qual contemplava desde a etapa de controle de qualidade do inoculantes até a identificação das estirpes, em comparação a legislação vigente.

Como recomendação, no que se refere ao controle de qualidade de inoculantes, resultados encontrados por DAMASCENO (2011), indicam que para análise de riqueza dos inoculantes com contagem de concentração mínima de  $10^9$  células viáveis através de crescimento em meio CRYMA (Vicent, 1970) e análise de contaminação até a diluição de  $10^5$ , podem ser realizados com diluição seriada decimal com água destilada como diluente, e o método da gota como metodologia de inoculação, diminuindo-se a quantidade de material e tempo de preparo.

No que se refere ao controle da qualidade da quantidade mínima em sementes, o mesmo estudo indica que a avaliação deve ser realizada imediatamente após a inoculação, e que as sementes de soja podem ser

substituídas por esferas de vidro, atrelando praticidade na etapa de desinfecção e descarte de material (Damasceno, 2011).

E por fim, para análise de identificação das estirpes presentes nos inoculantes, realizado no presente trabalho, propõe-se que as análises devam ser realizadas com extração de DNA diretamente do produto inoculante, com Kits comerciais. A identificação das estirpes de soja podem ser realizadas com a metodologia de DGGE, com desnaturação entre 55 e 65%, e amplificação da região V3 do 16S rDNA.

## 8. REFERÊNCIAS

ALBAREDA, M.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N.; CAMACHO, M.; TEMPRANO, F.J. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. **Soil Biology and Biochemistry**. 40:2771-2779, 2008.

ANDREOTE, F.D.; CARNEIRO, R.T.; SALLES, J.F.; MARCON, J.; LABATE, C.A.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Culture-Independent assessment of Rhizobiales-related alphaproteobacteria and the diversity of *Methylobacterium* in the Rhizosphere and Rhizoplane of transgenic eucalyptus. **Microb Ecol**. 57:82-93, 2009.

ANPII, 2010. Fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijão: fundamentos e resultados recentes. IN: **I Simpósio de Nutrição e Adubação da Cultura do feijão: Piracicaba, ESALQ/USP**. Disponível em <http://www.anpii.org.br>. Acesso em 19/09/2011.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, 13:65-73 1992

BANGEL, E. **Caracterização de estirpes SEMIA de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja no Mercosul**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 114p, 2000.

BINDE, D. R.; MENNA, P.; BANGEL, E. V.; BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 83:897-908, 2009

BOROWSKY, L.; CORÇÃO, G.; CARDOSO, M. Mannanologosaccharide agglutination by *Salmonella enterica* strains isolated from carrier pigs. **Brazilian Journal of Microbiology**. 40:458-464, 2009

BURNS, R.C.; HARDY, R.W.F. Nitrogen fixation in Bacteria and higher plants. New York: **Springer-verlag**, 1975

CARCINELLO, R. S.; SILVA, R.F.; FIORINI, A. Descontaminação de resíduos de brometo de etídio gerados em procedimentos de biologia molecular. In: **Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Cesumar** ISBN 978-85-61091-01-9, Paraná – BR, 2008

CARVALHO, V.C.V.; MACÊDO, J.L.; LIMA, C.A.D.; LIMA, M.C.G.L.; HERÁCLIO, S.A. IFN-gamma and IL-12B polymorphisms in women with cervical intraepithelial neoplasia caused by human papillomavirus. **Molecular Biology Reports** 39:7627-7634, 2012.

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

CHUEIRE, L. M. O.; NISHI, C. Y. M.; LOUREIRO, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação de estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas de soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com “primers” aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**. 4:80-95, 2000.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para a cultura de soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.27, p. 833-840, 2003.

DAEKER, R. ROUGHLEY, J.R; KENNEDY, I. Legume seed inoculation technology – a review. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, 36: 1275-1288, 2004.

DAMASCENO, R.G. **Comparação e desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de inoculantes**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 65p., 2011

De BRUJIN, F. J. Use of repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 2180-2187, 1992.

DENARDIN, N. D.; FREIRE, J. R. J. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 215-217, 2000.

ELBOUTAHIRI, N.; THAMI-ALAMI, I.; ELHOUSSINE, Z.; UDUPA, S. Genotypic characterization of indigenous *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium sllae* by reo-PCR, RAPD and ARDRA analyses. **African Journal of Biotechnology**. 8:979-985, 2009.

FANG., G.; HAMMAR,S. GRUMET, R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. **Biotechniques**, 13:52-54, 1992.

FERNANDES JR., P. I.; ROHR, T.G.; OLIVEIRA, P.J.; XAVIER, G.R. RUMJANEK, N.G. Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 44:1184-1190, 2009.

FERREIRA, M.C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Field Crops Res.** 79:139-152, 2002.

FREIRE, J.R.J.; VERNETTI, F.J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbios e a produção de inoculantes no Brasil. **Artigo de Revisão**, 1999.

FIGUEIREDO, B. **Identificação de estirpes de rizóbios por sequenciamento parcial dos genes 16S rDNS e nifH**. Dissertação (mestrado) Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho” - Jaboticabal, 139p. 2008

GAO, J.L.; TEREFOK, Z.; CHEN, W.; LINDSTROM, K. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. **J Biotech** 91:155-168, 2001.

GERMANO, M.G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F.L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the RNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from thirty-three legume species. **Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.** 56:217-229, 2006.

GIONGO, A. (2007) **Diversidade de Bradyrhizobium elkanii e B. japonicum que nodulam soja em solos do Rio Grande do Sul**. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. 168p.

GIONGO, A.; AMBROSINI, A.; FREIRE, J. R. J., BONADESI-ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. M. P. A strategy based on amplification of 16S rDNA sequences to differentiate *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 24:1456-1461, 2007.

GÖTTFERT M.; ROTHLSBERGER, S.; KUNDIG, C.; BECK, C.; MARTY, R.; HENNECKE, H. Potencial symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410 kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. **J Bacteriol.** 183:1405-1412, 2000.

GRANADA, C.E. **Seleção de rizóbios e estudo da compatibilidade simbiótica em *Desmodium incanum* e *Lotus spp.*** Dissertação (mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, UFRGS, 70p., 2010

HAN,G-M.; SONG, F-Q.; ZHANG, Z-J, NI,S. TIAN, X-J. An economic and efficient method for further purification of crude DNA extracted from forest soils. **Journal of Forestry Research** 21:246-250, 2010

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: **ARAUJO & HUNGRIA**. Microorganismos de importância agrícola. Brasília, Embrapa, 9-89, 1994.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo **Doc. Embrapa**. 36p. 2005

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.M.O.; MEGÍAS, M.; LAMRABET, Y.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, F.J.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of indigenous tropical fast growing rhizobia isolated from soybean nodules. **Plant and Soil**, 288: 343 – 356, 2006.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.M.O.; MENNA, P.; BANGEL, E.V. Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR. **Doc. Embrapa**. 12p, 2008.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. Inoculantes microbianos: situação no Brasil. In: IZAGUIRRE-MAYORAL, M.L.; LABANDERA,C.; SANJUAN, J. (Ed). **Biofertilizantes en Iberoamérica:visión, técnica, científica y empresarial**. Motevideo: Cytel/Biofag,. 22-31, 2007.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA,E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil** 331:413-425, 2010.

HONG, H.; PRUDEN, A.; REARDON, K.F. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. **Journal of Microbiological Methods**. 69: 52-64, 2007.

HYNES, R.K.; CRAIG, K.A.; COVERT, D.; SMITH, R.S.; RENNIE, R.J. Liquid rhizobial inoculants for lentil and field pea. **Journal Producer Agriculture**. 8:547-552, 1995.

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

LAGUERRE, G.; ALLARD, M.R.; REVOY, F. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. 60:56-63, 1992

LAGUERRE, G.; van BERKUN, P.; AMARGER, N. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied Environmental and Microbiology**. 63:4748-4758, 1993.

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P., ALLARD, M-R.; CHARNAY, M-P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S-I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of Rhizobia by PCR DNA Fingerprinting and PCR-restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Chromosomal and Symbiotic Gene Regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its Different Biovars. **App. Environ. Micro.** 62: 1563-1572, 1996.

LEMOS, E.G.M. **Classificação e identificação de bradirrizóbios que nodulam soja por análise de padrões isoenzimáticos, sorologia, morfologia de colônias e atividade de hidrogenase.** Tese (doutorado) Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho UNESP Jaboticabal, 108p, 1994

LONG, S.R. Rhizobium genetics. **Annu. Rev. Genet.** 23:483-506, 1989.

LUPSKI, J.R.; WEINSTOCK, G.M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **J Bacterial** 174:4525 – 4529, 1992.

LUPWAYI, N. Z.; RICE, W. A.; CLAYTON, G. W. Rhizobial inoculants for legume crops. **Journal of Crop Improvement**, 15:289-321, 2005.

MACHADO, R. **Promoção de crescimento em gramíneas forrageiras por rizóbios isolados de *Lotus Corniculatos*** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 77p., 2011.

MAPA, 2010 – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Instrução Normativa nº30/2010 Disponível em [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acesso 18 de setembro de 2011.

MAPA, 2011 – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Instrução Normativa nº13/2011. Disponível em [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acesso 18 de abril de 2011.

MARTIN, R.; HUMBERT, O.; CAMARA, M. A highly conserved repeated DNA element locate in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nuclei Acid Research.** 20: 3479-3483, 1992.

MARTINS, A. F.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SAMPAIO, J.A.T.; ARAÚJO, J. H. B.; TURCATEL, A. T.; DIEMER, G.D.; SÁ, E. L. S. Diversidade genética, tolerância aos fatores de acidez e eficiência simbiótica de rizóbios para cornichão de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciências do Solo.** 35:1885-1864, 2011.

MEYERS, R.M.; SHEFFIELD, V.C.; COX, D.R “Genome Analysis: A Practical Approach,” Ed. K Davies, **IRL Press**, Oxford. 95-13, 1988.

MENDES, I.; VARGAS, M.A.; HUNGRIA, M. Estabelecimento de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*/*B. elkanii* e seus efeitos na reinoculação da soja em solos do cerrado. **Doc. Embrapa** 18p., 2000.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTINEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Sist. Apply. Microbiol.** 24: 315-332, 2006.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTINEZ-ROMERO, E. rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis.** 48: 315-332, 2009.

NISHI, C.Y.M.; BODDEY, L.H.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Morphological, physiological and genetic characterization of two new *Bradyrhizobium* strains recently recommended as Brazilian commercial inoculants for soybean. **Symbiosis**, 20:147-162, 1996.

NIMNOI, P.; LUMYOUNG, S.; PONGSILP, N. Impact of Rhizobial inoculants on rhizosphere bacterial communities of three medicinal legumes assessed by denaturin gradient gel electrophoresis (DGGE). **Annals of Microbiology**, 61:237-245, 2010

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** 8:1383-1389, 2011.

OLIVE, D.M., BEAN, P. Minireview: Principles and applications of method for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 37, p. 1661-1669, 1999.

OLSEN, P.E.; RICE, W.A. Rhizobium s. strain identification and quantification in commercial inoculants by immunoblot. **Applied and Environmental Microbiology** 55:520-522, 1983.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. **Seropédia: Embrapa Agrobiologia**, 40p. 2003.

RAYMOND, J. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution.** 21:541-554, 2004.

RIBEIRO, R.A.; BARCELLOS, F.G.; THOMPSON, F.L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian rhizobium microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology.** 160: 297-306, 2009.

ROHR, TG. **Estudo reológico da mistura carboximetilcelulase/amido e sua utilização como veículo de inoculação bacteriano.** (Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 98p. 2007

ROMA NETO, I.V.; RIBEIRO, R.A.; HUNGRIA. Genetic diversity of elite rhizobial strains of subtropical and tropical legumes based on the 16S rRNA and glnII genes. **World J. Microbiol Biotechnol.** 26:1291-1302, 2010.

ROSADO, A.S; DUARTE, G.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, JD. Genetic diversity of nifH genes sequences in *Paenibacillus azotofixans* strains and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified genes fragments. **Appl Environ Microbiol** 64:2770 – 2779, 1998.

RUMJANEK, N.G.; DOBERT, R.C.; van BERKUM, P.; TRIPLETT, E.W. Common soybean inoculants strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. **Applied and Environment Microbiology** 59:4371-4373, 1993.

SANTOS, I.L.V.L.; SILVA, P.G.; LIMA JÚNIOR, S.F.; SOUZA, P.R.E.; TABOSA, J.N.; MAIA, M.M.D. Utilização de RAPD na caracterização molecular de acessos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) recomendados para o semi-árido de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** 5: 60-66, 2010.

SANTILLANA, N.; ARELLANO, C.; ZÚÑIGA, D. Capacidade del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). **Ecología Aplicada**, Lima, v. 4, p. 47-51, 2005.

SATO, M. L.; GARCÍA-BLÁSQUEZ, C.; VAN BERKUN, P. Verification of strains identity in Brazilian soybean inoculants by using the Polymerase Chain Reaction. **World Journal of Microbiology & Biotechnology.**15: 387-391, 1999.

SCHUH, C.A. **Biopolímeros como suporte para inoculantes.** (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, 81p., 2005

SAMBROOK, J.; RUSSEL D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor**, New York, 2001.

SCHNEIDER, M.; DE BRUJIN, F. J. rep-PCR mediated fingerprinting of rhizobia and computer-assited phylogenetic patterns analysis. **World J. Micobiol. Biotechnol.** v.12, p. 163-174, 1996.

SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. Selected Topics in biological control. **Ann. Revi. Microbiol** 35:453-476, 1981.

SILVA, M.F.S. **Uso de inoculante polimérico contendo bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar.** Tese (doutorado). Universidade Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 91pb, 2009.

STEPHENS, J.H.G.; RASK, H. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**. 56:249-258, 2000.

STROSCHEIN, M.R.D. **Seleção de rizóbios e efeito do nitrogênio na simbiose com alfafa e cornichão**. (Tese de Doutorado - Pós-graduação em Ciências do Solo) UFRGS, 140p., 2011

TAREFEWORK, Z.; KAIJALAINEN, S.; LINDSTROM, K. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*. **J. Biotechnol.** 91: 169-180, 2001.

TORRES, A. R.; KASCHUK, G.; SARIDAKIS, G.P.; HUNGRIA. Genetic variability in *Bradyrhizobium japonicum* strains nodulating soybean [Glycine mas (L.) Merrill]. **World J Microbiol Biotechnol** 28:1834-1835, 2012.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Phylogeny of sym plasmids of Rhizobia by PCR-based sequencing of nodC segments. **J Bacteriol.** 177: 468-472, 1995.

VANYSACKER, L.; DECLERCK, S.A.J.; HELLEMANS, B.; MESTER, L.D.; VANKELECOM, I.; DECLERCK, P. Bacterial community analysis of activated sludge: an evaluation of four commonly used DNA extraction. **Appl Microbiol Biotechnol.** 145:1569-1579, 2011

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, 19: 6823-6831, 1991.

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 Cell Biology.** 5:25-40, 1994.

VALEZ, D.; MACMILIAN, J.D.; MILLER, L. Production and use of monoclonal antibodies for identification of *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Canadian Journal of Microbiology.** 34:88-92, 1988.

VICENT, J.M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. **International Biological Programme Handbook Nº15**. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford, 1970.

VINUESSA, P.; RADEMAKER, J.L.W.; de BRUIJN F.J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulation endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-RFLP of genes encoding 16S rRNA and 16S-23S rDNA intergenic spacers, REP-PCR genomic fingerprinting and partial 16S rDNA sequencing. **Appl Environ Microbiol.** 64:2096-2104, 1998.

VINUESSA, P.; SILVA, D.; WERNER, D.; MARTINEZ-ROMERO, E.; Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. **Mol Phylogenet. Evol.** 34:29-54, 2005.

YOUNG, J.P.W.; DOWNWE, H.L.; EARDLU, B.D Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTail by polimerase chain reaction-based sequencing of 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology.** 173:2271-2277, 1991.

WILLIAMS, J.G.K.; JUBELIK, A.R.; LIVAK, K.L. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nuclei Acids Research.** 18:6531-6535, 1990.

WILLEMS, A.; COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology.** 43:305-313, 2000.

ZILLI, J.E; SMIDERLE, O. J.. FERNANDES JUNIOR, P. I. Eficiência agronômica de diferentes formulações de inoculantes contendo *Bradyrhizobium* na cultura da soja em Roraima. **Revista Agro@mbiente On-line.** 4:6-61, 2010.