



## Uso da técnica de PCR em Tempo Real para quantificação de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 em raízes de milho inoculadas.

Luiz Eduardo Souza da Silva Irineu, Cleiton de Paula Soares, Fábio Lopes Olivares.

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria endofítica capaz de estabelecer associação benéfica com diversas culturas de importância econômica, tais como milho, arroz, sorgo, trigo e cana de açúcar. Entre os principais benefícios dessa bactéria está a capacidade de promover o crescimento vegetal através da fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitormônios e solubilização de fosfato. Com o uso de bioinoculantes avançando, tecnologias para acompanhar o estabelecimento das bactérias que compõem os bioinoculantes se tornam necessárias. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo identificar e quantificar *H. seropedicae* estabelecida em raízes de milho inoculadas, através da técnica de PCR em Tempo Real (qPCR). Para tal, sementes de Milho (var. Dekalb 7815) foram desinfetadas e germinadas em papel Gemitex por 72 horas em câmara BOD. Plântulas com radícula de 2,5cm foram transplantadas e cultivadas em potes de 2L com solução CaCl<sub>2</sub> 2mM e mantidas *in vitro* em câmara de crescimento. Após 24 horas de adaptação uma alíquota de 20mL de inóculo contendo  $2 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> de *H. seropedicae* estirpe HRC54 foi aplicada. Cinco dias após a inoculação as plântulas (triplicatas biológicas) foram coletadas e maceradas em nitrogênio líquido. As amostras de DNA foram isoladas com DNAzol utilizando aproximadamente 300 mg dos tecidos de raiz. Todas as amostras de DNA foram quantificadas no aparelho NanoDrop®, sendo padronizadas para a concentração final de 40ng.µL<sup>-1</sup>. Em seguida, 5µL de amostra, 0,3µL de primers específicos 16S rDNA de *H. seropedicae* 7,5µL de Sybr Green e 1,9µL de água foram empregados na reação de PCR em Tempo Real. Adicionalmente, foi realizada uma curva padrão utilizando diluições seriadas de DNA genômico de *H. seropedicae* estirpe HRC54. Os resultados mostraram que a população de *H. seropedicae* estirpe HRC54 em raízes de plântulas de milho inoculadas foi maior que no controle não inoculado, apresentando 10<sup>6</sup> e 10<sup>2</sup> células bacterianas por planta, respectivamente. Deste modo, a técnica de PCR em tempo real mostrou-se eficaz na detecção e quantificação de *H. seropedicae* estirpe HRC54, apresentando-se como uma ferramenta importante para monitorar a interação entre planta-bactéria.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, Bioinoculantes, qPCR.

Instituição de fomento: CAPES, FAPERJ, UENF, Newton Foundation