



Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp)

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

Verônica Massena Reis¹

Introdução

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

Metodologia

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

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

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

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

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

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

