

BIOTECNOLOGIA **aplicada à agricultura**

TEXTOS DE APOIO E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

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

BIOTECNOLOGIA aplicada à agricultura

TEXTOS DE APOIO E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

*Márcia do Vale Barreto Figueiredo
Hélio Almeida Burity
José de Paula Oliveira
Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos
Newton Pereira Stamford*
Editores Técnicos

***Embrapa Informação Tecnológica
Brasília, DF
Instituto Agrônomo de Pernambuco
Recife, PE
2010***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Informação Tecnológica

Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W3 Norte (final)
70770-901 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4236
Fax: (61) 3448-2494
vendas@sct.embrapa.br
www.embrapa.br/liv

Embrapa Agrobiologia

Rodovia BR 465, Km 7 (Antiga Rodovia Rio-São Paulo)
Caixa Postal 74.505
23890-000 Seropédica, RJ
Fone: (21) 2682-1230
Fax: (21) 3441-1560
sac@cnpab.embrapa.br
www.cnpab.embrapa.br

Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA)

Av. General San Martin, 1.371, Bongi
50761-000 Recife, PE
Fone: (81) 3184-7200
www.ipa.br

Embrapa Informação Tecnológica

Coordenação editorial: *Fernando do Amaral Pereira, Mayara Rosa Carneiro e Lucilene Maria de Andrade*
Supervisão editorial: *Wesley José da Rocha*
Revisão de texto: *Maria Cristina Ramos Jubé*
Normalização bibliográfica: *Márcia Maria Pereira de Souza e Lara Del Fiaco Rocha*
Projeto gráfico, editoração eletrônica e tratamento de imagens: *Júlio César da Silva Delfino*
Capa: *Paula Cristina Rodrigues Franco*

Fotos da capa (da esquerda para a direita): *Júlia Kuklinsky Sobral, Márcia do Vale Barreto Figueiredo, Marisângela Viana Barbosa e Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos*

1ª edição

1ª impressão (2010): 2.000 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Informação Tecnológica

Biotecnologia aplicada à agricultura : textos de apoio e protocolos experimentais / editores técnicos, Márcia do Vale Barreto Figueiredo, Hélio Almeida Burity, José de Paula Oliveira, Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos, Newton Pereira Stamford. – Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica ; Recife, PE : Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), 2010.
761 p. : il. ; 16 cm x 22 cm.

ISBN 978-85-7383-495-6 Embrapa Informação Tecnológica.

ISBN 978-85-60827-06-0 Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

1. Bioética. 2. Biossegurança. 3. Controle biológico. 4. Melhoramento genético vegetal. I. Figueiredo, Márcia do Vale Barreto. II. Burity, Hélio Almeida. III. Oliveira, José de Paula. IV. Santos, Carolina Etienne de Rosália e Silva. V. Stamford, Newton Pereira. VI. Embrapa Agrobiologia. VII.

CDD 631.5233

© Embrapa 2010

Agradecimentos

Ressaltamos que esta obra resultou do esforço conjunto de autores de várias instituições, que atenderam a nossa solicitação com grande empenho e venceram o desafio de adequar textos de apoio e protocolos à dinâmica dos novos conhecimentos na área de forma clara e objetiva. A eles nossos mais sinceros agradecimentos.

Estendemos nossos agradecimentos ao Dr. José Geraldo Eugênio de França (Diretor-Executivo da Embrapa), que não mediu esforços para a realização desta obra. Agradecemos também ao Dr. Eduardo Francia Carneiro Campelo (Chefe-Geral da Embrapa Agrobiologia), ao Dr. Júlio Zoé de Brito (Presidente do Instituto Agronômico de Pernambuco – IPA), ao Dr. Vanildo Alberto Leal B. Cavalcanti (Diretor de Pesquisa e Desenvolvimento do IPA), ao Dr. Élcio Oliveira Tenório de Lima (Presidente da CARHP), ao Dr. Josival Gomes de Almeida (Diretor de Pesquisa e Desenvolvimento Rural da Dipap/Seagri), ao Dr. Fernando do Amaral Pereira (Gerente-Geral da Embrapa Informação Tecnológica), à Dra. Mayara Rosa Carneiro (Gerente-Adjunta de Projetos Editoriais da Embrapa Informação Tecnológica) e a toda a sua equipe de editoração.

Apresentação

Uma nova agricultura se faz necessária. Questões atuais, como mudanças climáticas globais, excesso de uso de agroquímicos, degradação do ecossistema, não são fatos isolados ou passageiros, fazem parte de uma agenda permanente incorporada às discussões das políticas necessárias para suporte ao desenvolvimento sustentável do negócio agrícola e às discussões sobre segurança alimentar e nutrição.

O planeta espera por mudanças radicais, desde que tais mudanças tragam sustentabilidade e o equilíbrio dos sistemas naturais. Fundamentos científicos associados ao desenvolvimento de uma biotecnologia segura e aplicada às demandas e necessidades da sociedade são sempre bem-vindos.

Um dos grandes desafios ao desenvolvimento de uma agricultura com práticas sustentáveis se dá exatamente na incorporação, no dia a dia de laboratórios, escolas, empresas e campos, das práticas atuais de biotecnologia voltadas ao melhoramento genético, ao controle biológico, ao uso eficiente de microrganismos na fixação biológica de nitrogênio, na biorremediação, nos processos fermentativos industriais, como o de produção de etanol, a partir de práticas comprovadamente seguras.

É nesse escopo que o conteúdo desta obra é fundamental, não apenas como uma atualização das técnicas e procedimentos biotecnológicos, mas como um convite à reflexão de formuladores de políticas públicas, cientistas, professores e gestores, no sentido de incorporarem às suas instituições projetos e programas que deem suporte à biotecnologia como agente inovador e transformador para a agricultura, a pecuária e a indústria de alimentos, insumos e matérias-primas neste século.

A obra mostra o envolvimento de inúmeras áreas do conhecimento e a oportunidade de utilização de disciplinas básicas como a enzimologia, a bioquímica, a química, a biologia e a bioinformática que em conjunto possibilitam o desenvolvimento de uma biotecnologia avançada, ainda pouco reconhecida pelo setor produtivo nacional.

José Geraldo Eugênio de França
Diretor-Executivo

Prefácio

A biotecnologia envolvendo a atuação de microrganismos vem merecendo destaque especial no desenvolvimento da ciência, na produção e eficiência de novas tecnologias, bem como em avanços dos conhecimentos modernos. O termo biotecnologia refere-se a um conjunto amplo de tecnologias que envolvem a utilização, alteração controlada e a otimização de organismos vivos, células e moléculas para a geração de produtos e processos. Seus resultados são aplicáveis e utilizados por setores de diversas áreas do conhecimento, como microbiologia, biologia molecular, fisiologia, bioquímica, química, genética, entre outras. Nesse sentido, faz-se da maior importância a edição de um livro que forneça as linhas básicas para a real qualificação de profissionais e estudantes da área, principalmente com vistas à divulgação e ao desenvolvimento de novos métodos e práticas de processos biotecnológicos.

A ideia de escrever este livro deveu-se principalmente à escassez de protocolos atualizados na maioria dos laboratórios de microbiologia e biotecnologia, o que gera muita dificuldade na execução de análises que usam técnicas mais recentes. Portanto, o livro é proposto com o intuito de facilitar o trabalho de pesquisadores, professores, técnicos e alunos de graduação e pós-graduação nas áreas de microbiologia, agronomia e biotecnologia.

O conteúdo deste livro procura refletir os diferentes temas da biotecnologia e contemplar técnicas recentes, e está dividido em 5 partes – Biossegurança e bioética; Enzimas; Técnicas moleculares e aplicação da genética nas áreas agrícolas; Microrganismos promotores do crescimento de plantas; e Técnicas biotecnológicas aplicadas à agricultura –, de modo que as investigações em cada capítulo são dirigidas a aspectos relacionados aos processos biológicos.

Espera-se que esta publicação sirva de estímulo para que surjam, cada vez mais, interessados em desenvolver pesquisas e aplicá-las em benefício do meio ambiente.

Os Editores

Sumário

PARTE 1 - BIOSSEGURANÇA E BIOÉTICA	27
Capítulo 1 - Panorama brasileiro de biossegurança e bioética	29
PARTE 2 - ENZIMAS	59
Capítulo 1 - Ensaio enzimáticos de proteínas e inibidores de proteases envolvidos com a defesa de plantas a patógenos.....	61
Capítulo 2 - Redução de nitrato e assimilação da amônia em sistemas vegetais: mensuração de atividade enzimática e metabólitos.....	93
Capítulo 3 - Enzimas hidrolíticas extracelulares em microrganismos	125
Capítulo 4 - Avaliação da atividade enzimática em amostras de solo	153
PARTE 3 - TÉCNICAS MOLECULARES E APLICAÇÃO DA GENÉTICA NAS ÁREAS AGRÍCOLAS	189
Capítulo 1 - Técnicas moleculares aplicadas ao estudo da diversidade e à identificação de bactérias e fungos de interesse agrícola.....	191
Capítulo 2 - Métodos moleculares na análise da diversidade de fungos micorrízicos.....	223
Capítulo 3 - Análise <i>in silico</i> para o desenvolvimento de marcadores SNP-CAPS associados a características agronômicas	257
Capítulo 4 - Bioinformática aplicada ao estudo de genomas expressos (EST) em plantas.....	287
Capítulo 5 - Bioinformática como instrumento de apoio aos programas de melhoramento genético	313
Capítulo 6 - Transformação genética de cana-de-açúcar	333
Capítulo 7 - Análise do metagenoma do solo: acesso à diversidade genética de microrganismos e aplicações na Biotecnologia.....	357

PARTE 4 - MICRORGANISMOS PROMOTORES

DO CRESCIMENTO DE PLANTAS	385
Capítulo 1 - Bactérias promotoras do crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável	387
Capítulo 2 - Diazotróficos associativos e de vida livre: avanços e aplicações biotecnológicas	415
Capítulo 3 - Bactérias fixadoras de N ₂ e fungos micorrízicos arbusculares em espécies florestais: avanços e aplicações biotecnológicas	439
Capítulo 4 - Análise de imagens para acompanhamento da nodulação em leguminosas	479
Capítulo 5 - Abundância natural do ¹⁵ N para quantificação da fixação biológica do nitrogênio em plantas	505
Capítulo 6 - Proteína do solo relacionada à glomalina: uma alternativa para avaliação da qualidade do solo.....	519
Capítulo 7 - Inoculantes de fungos ectomicorrízicos	533
Capítulo 8 - Microrganismos solubilizadores de minerais.....	561
Capítulo 9 - Determinação da biomassa microbiana do solo ...	583

PARTE 5 - TÉCNICAS BIOTECNOLÓGICAS APLICADAS

À AGRICULTURA.....	607
Capítulo 1 - Produção de biolarvicidas à base de <i>Bacillus sphaericus</i> e <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> para o controle de insetos	609
Capítulo 2 - Controle biológico de pragas: considerações e aplicabilidade em Pernambuco	625
Capítulo 3 - Cultura de tecidos vegetais: técnicas utilizadas para multiplicação acelerada da palma forrageira.....	653
Capítulo 4 - Fermentação semissólida no enriquecimento proteico de produtos para a alimentação animal a partir da cana-de-açúcar, do sorgo sacarino e da palma forrageira	679
Capítulo 5 - Metodologia analítica para produtos naturais	711
Capítulo 6 - Caracterização da quitosana e sua aplicação na nanotecnologia.....	733

PARTE 1

**BIOSSEGURANÇA
E BIOÉTICA**

Capítulo 1

Panorama brasileiro de biossegurança e bioética

*Leda Cristina Mendonça Hagler
Deise Maria Fontana Capalbo
Olivia Márica Nagy Arantes
Eliana Maria Gouveia Fontes*

1. Introdução

A agricultura tem grande relevância para a economia brasileira. O setor gera um terço das exportações e do produto interno bruto (PIB) e emprega um quinto da mão de obra ativa. O melhoramento de plantas e sua adaptação aos diferentes ambientes foram conduzidos no Brasil como nos demais países de agricultura avançada, baseados em tentativa e erro. Com os avanços nas técnicas de melhoramento no início do século 20, foi possível desenvolver variedades que combinavam as prévias características a outras, como tolerância a estresses bióticos e/ou abióticos (COOK, 1999). Esse histórico de melhoramento demonstrou segurança dos produtos dele derivados: ensaios de campo antes do lançamento comercial foram usados, e as decisões quanto às variedades a serem lançadas comercialmente se mostraram adequadas, e/ou as práticas de manejo em uso se mostraram suficientes para mitigar qualquer risco associado com a nova variedade.

Nos últimos 30 anos, a aplicação das ferramentas de biologia molecular permitiu o desenvolvimento de plantas com novas características que não podiam ser introduzidas pelas técnicas de melhoramento convencional. Isso expandiu o cenário das características genéticas que podem ser agregadas às plantas; e apesar de a