

Caracterização de Bactérias Endofíticas Isolados do Milho Cultivado no Agroecossistema Cerrado

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC

Coelho, V.T.S.¹; Quintão, P.L.¹; Paoli, H.C.¹; Melo, M.A.V.¹, Lage, G.A.¹; Fonseca, P.C.²; Bressan, W.³; Guimarães, C.T.³; Gomes, E.A.³; Figueiredo, J.E.F.³

¹Faculdades Metodistas Integradas Izabela Hendrix, Belo Horizonte, MG; ²Escola Superior de Agricultura e Ciências de Machado, Machado, MG; ³Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas, MG. jeff@cnpms.embrapa.br

SDS-PAGE, RAPD-PCR, rDNA, Sequenciamento, taxonomia

Endófitos são microrganismos que colonizam tecidos vegetais da parte aérea, sem causar danos à planta. Esse grupo de microrganismos coevoluiu e desenvolveu estreita relação com as plantas hospedeiras, influenciando mecanismos fisiológicos da planta. Sua importância na agricultura tem sido demonstrada pela melhoria no desempenho de plantas devido ao desenvolvimento de atividades antagonistas no controle de doenças bacterianas, insetos-praga e fitopatógenos. No presente estudo foram utilizadas as técnicas de SDS-PAGE, RAPD-PCR e rDNA (sequenciamento) para caracterizar 22 isolados de bactérias endofíticas do agroecossistema Cerrado com o objetivo de eliminar réplicas, determinar a variabilidade genética e estabelecer relações filogenéticas nesse importante grupo de microrganismos. A caracterização morfológica de colônias crescidas em meio D2, baseou-se na forma, elevação, brilho e cor. Dois grupos foram identificados: colônias circulares, de elevação ondulada, opaca e branca e, colônias circulares, de elevação achatada, transparente e amarela. A identificação da morfologia celular foi realizada por coloração de Gram, seguida de observação ao microscópio óptico (Figura 1). Todos os isolados apresentavam forma de bastonetes e reação de Gram positivas. Diferentes parâmetros bioquímicos foram utilizados para estabelecer os requerimentos nutricionais das bactérias isoladas. Utilizou-se o kit "BBL CRYSTAL™ Gram-Positive ID System / GP" usando parte das colônias isoladas de bactéria, crescidas em meio D2. Após ter sido misturado a 2,0mL de solvente BBL Crystal a amostra foi vertida em painel com 29 substratos enzimáticos e bioquímicos e incubado entre 35-37°C por três horas, verificando depois as reações de cores, positivas ou negativas. Tal caracterização possibilitou agrupar esses microrganismos mas não permitiu discriminar cada isolado (Tabela I). O perfil eletroforético de extratos de proteínas totais (SDS-PAGE) foi obtido de culturas em meio LB. Alíquotas de 1,5 ml de bactérias crescidas durante 18 horas foram centrifugadas por dois minutos a 13.000 rpm e após descarte do sobrenadante, os sedimentos foram lavados com tampão PBS 1M pH 7,4 (NaCl, KCl, Na₂PO₄, KH₂PO₄), ressuspensos em 200ul de água estéril e colocados no gelo por 15 minutos. Em seguida adicionou-se 200ul de tampão às amostras que foram fervidas por 15 minutos e centrifugadas a 13.000 rpm por 30 segundos. Alíquotas de 15ul foram resolvidas em minigel de acrilamida de 12,5% corrido a 100V por duas horas e corados com Comassie blue. O perfil proteico revelou a existência de polimorfismo entre os isolados de bactérias endofíticas e possibilitou a identificação de réplicas existentes na coleção

(Figura 2). A técnica de RAPD foi usada para estimar a variabilidade genética e estabelecer relações filéticas nesse grupo de bactérias. Foram utilizados 25 primers aleatórios (Operon) e as reações de amplificação foram realizadas com 10 ng de DNA genômico total extraído de colônias crescidas em meio LB. Cada reação, com volume de 25, µl, continha 2,5 mM MgCl₂, 25 uM dNTP, 2,5 mM Tris, 4,0 mM primer aleatório (10-mer), 1,5 U *Taq* DNA polimerase. A reação foi processada no termociclador "PTC-100™ (MJ Research. Inc.) programado com 15 segundos à 94°C para desnaturação do DNA, 30 segundos à 35°C para anelamento do primer e 30 segundos à 72°C para extensão da fita de DNA. Esse ciclo foi repetido 30 vezes e ao final acrescentou-se uma etapa de 10 minutos à 72°C. A resolução dos fragmentos amplificados foi feita em géis de agarose 1,2% e revelaram a existência de polimorfismo mesmo para isolados que apresentaram padrões morfológicos e bioquímicos similares (Figura 3). Os dados obtidos por RAPD-PCR confirmaram os achados de SDS-PAGE. Com base nesses resultados, optou-se por usar a técnica de SDS-PAGE para identificação de réplicas na coleção e empregar a técnica de RAPD-PCR para estimar a variabilidade genética e estudar as relações filogenéticas entre bactérias endofíticas de diferentes regiões agrícolas do Brasil. Análise por meio de amplificação e sequenciamento de genes ribossomais (16S e 23S) foi utilizada para estabelecer a identidade dos diferentes isolados de bactérias endofíticas (Figura 4). As condições das reações de amplificação foram as mesmas usadas para RAPD-PCR. Dados preliminares sobre o sequenciamento da região (518-928) do gene 16S possibilitou a identificação inequívoca de cada um dos isolados, identificação de réplicas e revelou espécies ainda não descritas (dados não mostrados). Todos os isolados analisados até a presente data (12) pertencem ao gênero *Bacillus* (*B. macroides*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *Bacillus* sp. *B. amiloliquefaciens*).

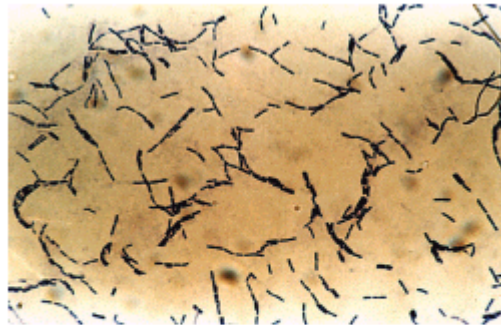


Figura 1 - Células de bactérias endofíticas em forma de bastonete sob microscopia óptica (1000X).

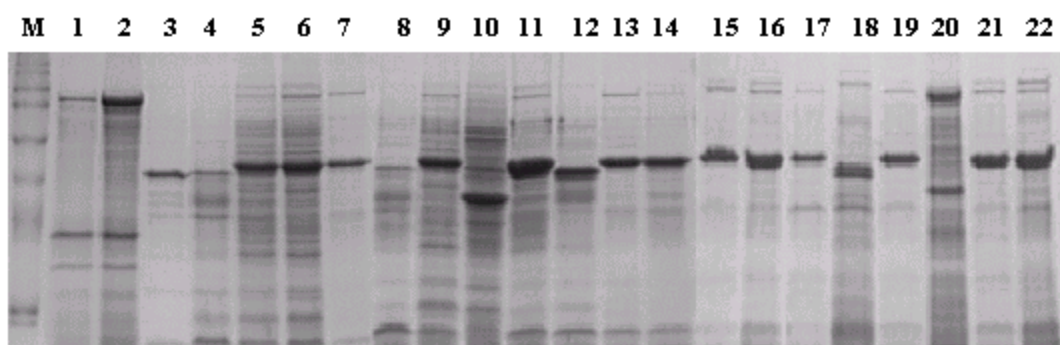


Figura 2. Perfil eletroforético de extrato protéico total de bactérias endofíticas isoladas do agroecossistema Cerrado. As indicações M e 1 a 22 são, respectivamente, Marcador Rainbow e os isolados Endo 05 a Endo26.

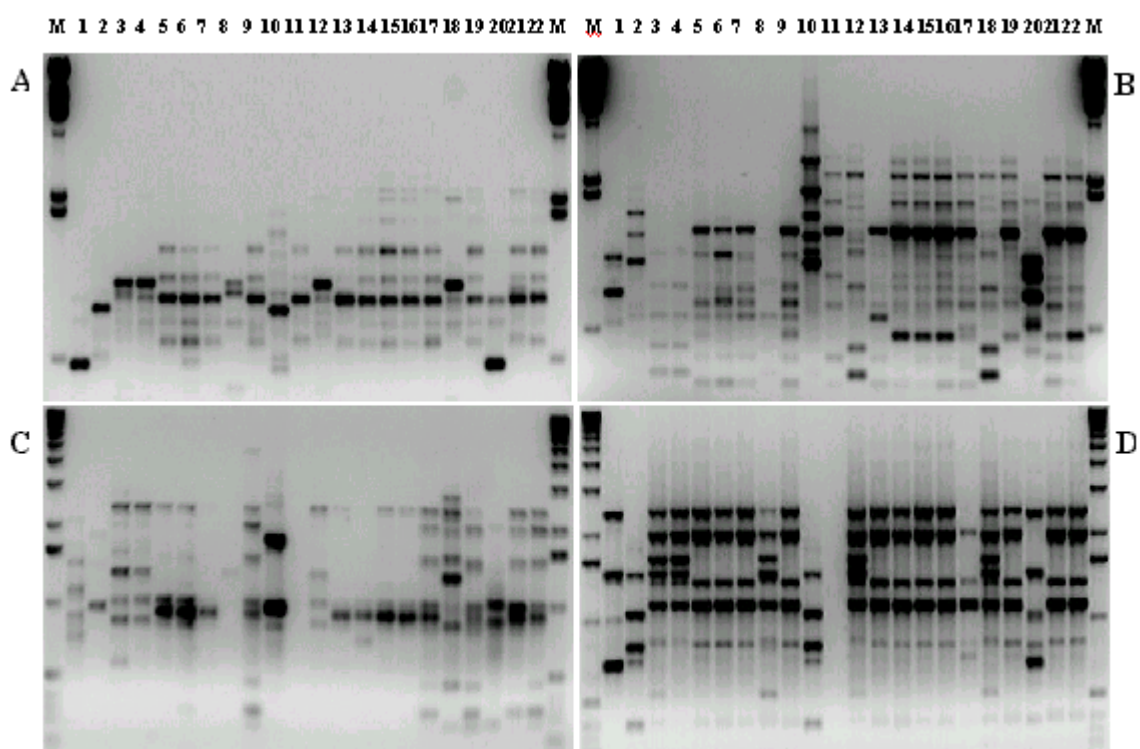


Figura 3. Perfil eletroforético de DNA genômico total de bactérias endofíticas amplificado por RAPD-PCR. Os números representam os isolados Endo05 a Endo26 respectivamente de 1 a 22, e M=Marcador 1Kb Leader. As letras A, B, C e D são, nesta ordem, ampliações com os primers OPA12, OPA16, OPA19 e OPA18.

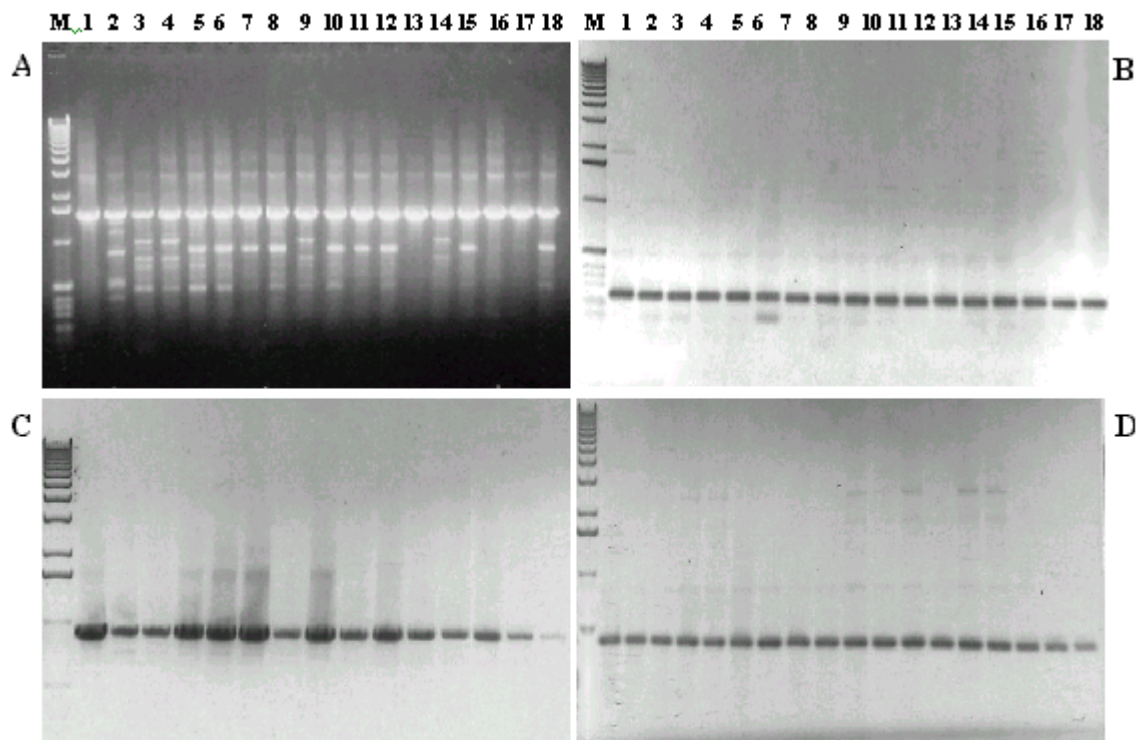


Figura 4. Perfil eletroforético de genes ribossomais (rDNA) de bactérias endofíticas amplificados por PCR. As letras A, B, C e D representam, respectivamente, 16S (F27/R1542), 23S, 16S (F27/R928) e 16S (F527/R1542). Em A pode ser evidenciado o caráter policistronico de gene 16S em alguns isolados. M= Marcador 1kb. M=Marcador 1kb.

Tabela I - Ingredientes ativos dos 29 substratos enzimáticos e bioquímicos do kit BBL CRYSTAL GP para as bactérias endofíticas. A primeira coluna contém os substratos enzimáticos e bioquímicos. A primeira linha contém as bactérias endofíticas Endo 05 a Endo 26 representadas, respectivamente, na tabela pelos números 5 a 26. O sinal de positivo na tabela indica reação com o substrato e o sinal de negativo indica que não houve reação.

	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
Controle de fluorescência negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4MU-beta-D-glicosídeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-valina-AMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fenilalanina-AMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4MU-alfa-D-glicosídeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-ácido-pirrolidônico-AMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-triptofano-AMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arginina-AMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4MU-N-acetil-beta-D-glicosaminida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4MU-fosfato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4MU-beta-D-glicoronídeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-isoleucina-AMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil-alfa & beta-glicosídeo	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Manitol	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Maltotriose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Frutose	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
p-nitrofenil-beta-D-glicosídeo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-nitrofenil-beta-D-celobiosídeo	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Prolina & Leucina-p-nitroanilida	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
p-nitrofenil-fosfato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
p-nitrofenil-alfa-D-maltosídeo	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
o-nitrofenil-beta-D-galactosídeo (ONPG) & p-nitrofenil-alfa-D-galactosídeo	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Uréia	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

REFERÊNCIAS

- ASH, C.; FARROW, J.A.E.; WALLBANKS, S.; COLLINS, M.D. Heterogeneity of the *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.13, p. 202-206, 1991.
- BRADBURY, J.F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Slough: CAB International Mycological Institute, 1995. 332 p.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.171, p.248-254, 1976.
- BRUIJN, F.J.; RADEMAKER, J.; SCHNEIDERL, M.; ROSSBACHL, U.; LOUWSL, F.J. Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analysis. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTION, 8., 1996, Knoxville. **Biology of plant-microbe Interaction** - proceedings. St. Paul: APS Press, 1996. p.497-502. Editado por B.Stacey; B. Mullin; P. Gresshoff.
- Di CASTRI, F.; YONES, T. Ecosystem function and biological diversity. **Biology International**, Paris, n.22, 1990. Special issue
- FAHEY, J.W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. In: CUTLER, H.O (Ed.) **Biologically active natural products: potential use in agriculture**. Washington: American Chemical Society, 1988. p.120-128 (American Chemical Society Symposium Series, 380)
- FISHER, P.J.; PETRINE, O.; SCOTT, H.M.L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, Oxford, v.122, p.299-305, 1992.
- GILSON, E.; CLEMENT, J.M.; BRUTLAG, D.; HOFNUNG, M. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. **EMBO Journal**, Oxford, v.3, p.1417-1421, 1984.
- GÜTLER, V.; STANISICH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, New York, v.142, p.3-16, 1996.
- HONEYCUTT, R.J.; SOBRAL, B.W.S.; MCCLELLAND, M. tRNA intergeneric spacers reveal polymorphisms diagnostic for *Xanthomonas albilineans*. **Microbiology**, New York, v.141, p.3229-3239, 1995.

HUANG, Z.-Y.; SMALLEY, E.B.; GURIES, R.P. Differentiation of *Mycosphaerella dearnessii* by cultural characters and RAPD analysis. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, p.522-527, 1995.

CENSO AGROPECUÁRIO 1995. Rio de Janeiro: IBGE, 1998.

INTERNATIONAL MYCOLOGY INSTITUTE. **Modern techniques in the identification of bacterial and filamentous fungi**. Eghan, UK, 1995.

JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.M.; GABRIELSON, D.A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.63, p.1262-1265, 1985.

KNOCH, T.R.; FAETH, S.H.; ARNOTT, D.L. Endophytic fungi alter foraging and dispersal by desert seed-harvesting ants. **Oecologia**, Berlin, v.95, p.470-473, 1993.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-684, 1970.

TISSERAT, N.A.; HULBERT, S.H.; SAUER, K.M. Selective amplification of rDNA internal transcribed spacer regions to detect *Ophiosphaerella korrae* and *O. herpotricha*. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, p.478-482, 1994.

TÖR, M.; MANTEL, S.H.; AINSWORTH, C. Endophytic bacteria expressing β -glucuronidase cause false positives in transformation of *Dioscorea* species. **Plant Cell Reports**, New York, v.11, p.452-456, 1992.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELICK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p.6531-6535, 1990.

XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo - 01 a 05 de setembro de 2002 - Florianópolis - SC
