

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA À RIZOSFERA DE PLANTAS SEMPRE-VIVA (*Syngonanthus elegans* var. *elegans*) ENDÊMICA DE CAMPOS RUPESTRES BRASILEIROS

SP0033
22060

José Edson F. FIGUEIREDO¹, Marta A. TEIXEIRA²; Guilherme V. C. LIMA³, Nathalia A. NEVES⁴, Leandro M. MARRA⁵, CLARA H. C. SILVA⁶; Stéfano, C. LOPES⁷, Ubiraci G. P. LANA⁸; Eliane A. Gomes⁹, Paulo H. GRAZIOTTI¹⁰, Áurea V. FOLGUERAS-FLATSCHART¹¹, Wellington BRESSAN¹²

^{1,2,3,6,7,8,9,11,12}Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil

^{4,5,10}Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM, Diamantina, MG, Brazil

¹jeff@cnpmms.embrapa.br, ²marta910@yahoo.com.br, ³guilherme611@yahoo.com.br,

⁴nathaliaaneves@yahoo.com.br, ⁵lmarciano3@hotmail.com, ⁶clarahelena10@yahoo.com.br,

⁷stefano.pf@hotmail.com, ⁸ubiraci@cnpmms.embrapa.br, ⁹eliane@cnpmms.embrapa.br,

¹⁰graziot@yahoo.com.br, ¹¹aureavff@cnpmms.embrapa.br, ¹²bressan@cnpmms.embrapa.br

RESUMO

Syngonanthus elegans, planta nativa dos Campos rupestres brasileiros, é uma espécie em risco de extinção pela intensa atividade comercial exploratória de suas inflorescências imaturas. Neste estudo, a comunidade bacteriana da rizosfera de *S. Elegans* foi isolada e estudada por meio de análise molecular. SDS-PAGE de extratos protéicos de 203 bactérias revelaram elevado polimorfismo e 17 isolados foram identificados como réplicas. Sequenciamento parcial de rDNA 16S revelou que 57 isolados eram Firmicutes, 129 eram Proteobacteria (2 Alphaproteobacteria, 47 Betabacteria, 80 Gamaproteobacteria) e um isolado pertencia ao grupo Actinobacteria (Micrococcaceae). Baseado em afiliação genética e testes preliminares, vários isolados mostram-se potencialmente úteis para uso agrônomo, tais como: controle biológico, biorremediação, solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e promotores de crescimento de plantas.

INTRODUÇÃO

O gênero *Syngonanthus* (Bong.) Ruhland (*Eriocaulaceae*) compreende cerca de 200 espécies distribuídas na África e nas Américas (Giulietti and Hensold, 1990). A maior concentração de espécies ocorre no Brasil, particularmente no ecossistema Campos Rupestres, considerado o Centro de diversidade dessas espécies. A seção *Eulepis* (Bong. ex Koern.) é exclusiva da América do Sul e concentra a maior parte das espécies "Sempre-Vivas" exploradas comercialmente, sendo *S. elegans* ("pé-de-ouro") a espécie mais conhecida e apreciada mundialmente. As inflorescências das Sempre-Vivas, vendidas com propósitos decorativos, gera divisas para o Brasil (Ramos *et al.*, 2005). Essa atividade representa importante papel social pois constitui o principal meio de sobrevivência para muitas Comunidades, onde geralmente famílias inteiras estão envolvidas na coleta das inflorescências. Contudo, devido a falta de métodos de cultivo planejado para finalidades comerciais, frequentemente, toda a planta é arrancada durante a colheita, sem nenhum planejamento ou controle. Essa coleta indiscriminada, que ocorre antes do período de produção das sementes, impede a reprodução da espécie, que foi incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção. Além disso, a espécie apresenta distribuição agrupada, e por isso, populações inteiras são disimadas a cada ano (Ramos *et al.*, 2005). Como consequência, da exploração desordenada, a área de distribuição das

Sempre-Vivas foi reduzida, várias espécies foram extintas de seu ambiente natural e a quantidade de inflorescências comercializadas declinou nos últimos anos. Apesar da grande importância Socio-Econômica da exploração das Sempre-Vivas, o conhecimento incipiente dos requerimentos para cultivo, ecologia e genética, bem como da microflora associada a esse grupo de plantas representam o grande desafio para o manejo sustentável dessa espécie.

MATERIAL E MÉTODO

A comunidade bacteriana da rizosfera, de 250 plantas de *S. Elegans*, foi estudada por métodos de isolamento e análise molecular (SDS-PAGE e sequenciamento parcial do gene rRNA 16S). Raízes e solo da rizosfera de plantas foram plaqueados em meio Luria-Bertani (LB) e D2 (Kado & Heskett, 1970). Culturas isoladas foram plaqueadas por 5 vezes consecutivas para assegurar culturas puras. Os isolados estão preservados em óleo mineral e em estoques de cultura a -80°C . A eletroforese (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com Laemmli (1970). O gene 16S rRNA foi amplificado por PCR utilizando primers universais (GURTNER & STANISICH, 1996) e o produto foi purificado com GeneClean kit. O sequenciamento parcial (forward e Reverse) da região 518-928 do DNA ribossomal foi feito em sequenciador ABI-Prism 3700. As sequências editadas foram comparadas com aquelas depositadas no Gene Bank.

RESULTADO E DISCUSSÃO

O perfil eletroforético de extratos protéicos totais (SDS-PAGE) de 203 bactérias revelaram polimorfismo elevado (dados não mostrados neste resumo) e 17 isolados foram identificados como réplicas. O sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S revelou que 57 isolados pertenciam ao grupo Firmicutes (*Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Brevibacillus*) (Tabela 1). No grupo Proteobacteria, foram identificados 129 isolados assim distribuídos: Alphaproteobacteria, 1 *Bradyrhizobiaceae* (*Rhodopseudomonas palustris*) e 1 *Acetobacteraceae* (*Acetobacter pasteurians*); Betaproteobacteria (47 isolados), sendo 36 *Neisseriaceae* (*Chromobacterium* spp.), 9 *Burkholderiaceae* e 2 *Oxalobacteriaceae*; Gamaproteobacteria (80 isolados) com 73 representantes de diferentes espécies de *Enterobacteriaceae* e 7 *Pseudomonadaceae*. Um único isolado representou o grupo Actinobacteria (*Micrococcaceae*). De acordo com a afiliação genética e testes preliminares, in vitro, vários isolados mostram-se potencialmente úteis para uso agrônômico, com aplicações no controle biológico, biorremediação, solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e promotores de crescimento de plantas.

Tabela 1. Grupos de bactérias associadas à rizosfera de *S. elegans*, identificadas por sequenciamento parcial de rDNA 16S.

FIRMICUTES	PROTEOBACTERIA	<i>Oxalobacteriaceae</i>
<i>Bacillaceae</i>	ALPHAPROTEOBACTERIA	<i>Collimonas</i> sp.
<i>Bacillus</i>	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Herbaspirillum</i> sp.
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	GAMMAPROTEOBACTERIA
<i>B. cereus</i>	<i>Acetobacteraceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>B. anthracis</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Aquamonas</i>
<i>B. pumilus</i>	BETAPROTEOBACTERIA	<i>Averyella dalhousiensis</i>
<i>B. sporothermodurans</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>B. acidicola</i>	<i>Chromobacterium</i> sp.	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>B. pichinotyi</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>
<i>B. ginsengihumi</i>	<i>Chromobacterium haemolyticum</i>	<i>Enterobacter cancerogenus</i>
<i>B. carboniphilus</i>	<i>Chromobacterium subtsugae</i>	<i>Grimontella senegalensis</i>
<i>B. fusiformis</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>B. sphaericus</i>	<i>Achromobacter</i> sp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Planococcaceae	<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>Kluyvera cryocrescens</i>
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Kluyvera intermedia</i>
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	<i>Burkholderia ambifaria</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Lysinibacillus lusiferensis</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>
Paenibacillaceae	<i>Burkholderia seminalis</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Brevibacillus brevis</i>	<i>Burkholderia metallica</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>
Clostridiaceae	<i>Ralstonia</i> sp.	<i>Yokenella morganii</i>
<i>Clostridium</i>		Pseudomonadaceae
		<i>Pseudomonas huttiensis</i>
		<i>Pseudomonas teessidea</i>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GIULIETTI, A.M.; HENSOLD, N. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de *Eriocaulaceae*, Acta Bot. Bras. 4 (1990), pp. 133-158.
- GURTLER, V., STANISICH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria by using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiology, 142, 3-16, 1996.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopatology, 60, 969-976, 1970.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- SCATENA, V.L.; VICH, D.V.; PARRA, L.R.. Anatomia de escapos, folhas e brácteas de *Syngonanthus* sect. *Eulepis* (Bong. ex Koern.) Ruhland (*Eriocaulaceae*). Acta Bot. Bras. 18(4): 825-837. 2004.
- RAMOS, C.O.C.; BORBA, E.L.; FUNCH, L.S. Pollination in Brazilian *Syngonanthus* (*Eriocaulaceae*) Species: evidence for entomophily instead of anemophily. Annals of Botany 96(3): 387-397, 2005.