

## ESTUDO DA DIVERSIDADE ECOLÓGICA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS, POR ANÁLISE MOLECULAR, EM GERMOPLASMAS DE MILHO TROPICAIS

SF0033

José Edson F. FIGUEIREDO<sup>1</sup>, Marta A. TEIXEIRA<sup>2</sup>, Guilherme V. C. LIMA<sup>3</sup>, Clara H. C. SILVA<sup>4</sup>, Stéfano C. LOPES<sup>5</sup>, Eliane A. GOMES<sup>6</sup>, Claudia T. GUIMARÃES<sup>7</sup>, Ubiraci G. P. LANA<sup>8</sup>, A. V. FOLGUERAS-FLATSCHART<sup>9</sup>, Wellington BRESSAN<sup>10</sup>

99057

1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas-MG, Brasil

<sup>1</sup>jeff@cnpms.embrapa.br, <sup>2</sup>marta910@yahoo.com.br, <sup>3</sup>guilherme611@yahoo.com.br, <sup>4</sup>clarahelena10@yahoo.com.br, <sup>5</sup>stefano.pf@hotmail.com, <sup>6</sup>eliane@cnpms.embrapa.br, <sup>7</sup>claudia@cnpms.embrapa.br, <sup>8</sup>ubiraci@cnpms.embrapa.br, <sup>9</sup>aureavff@cnpms.embrapa.br, <sup>10</sup>bressan@cnpms.embrapa.br

### RESUMO

Técnicas moleculares (SDS-PAGE e sequenciamento de rDNA) foram utilizadas para identificar 42 isolados bacterianos de milho doce tropical. Vinte e quatro isolados formaram seis grupos distintos, os demais foram considerados únicos. O sequenciamento amino-terminal de um polipeptídeo de 42 kDa, abundante na maioria dos isolados, revelou alta identidade com flagelina H de *Bacillus*. O sequenciamento parcial do gene ribossômico 16S revelou que todos os isolados pertencem ao gênero *Bacillus* spp, sendo que *B. subtilis* (15 isolados) e *B. pumilis* (12 isolados) foram mais frequentes. Os resultados indicaram que a técnica de SDS-PAGE constitui em procedimento rápido e barato para identificar réplicas de bactérias em coleções e bancos de germoplasmas e sequenciamento de rDNA foi preciso para identificar grupos taxonômicos.

### INTRODUÇÃO

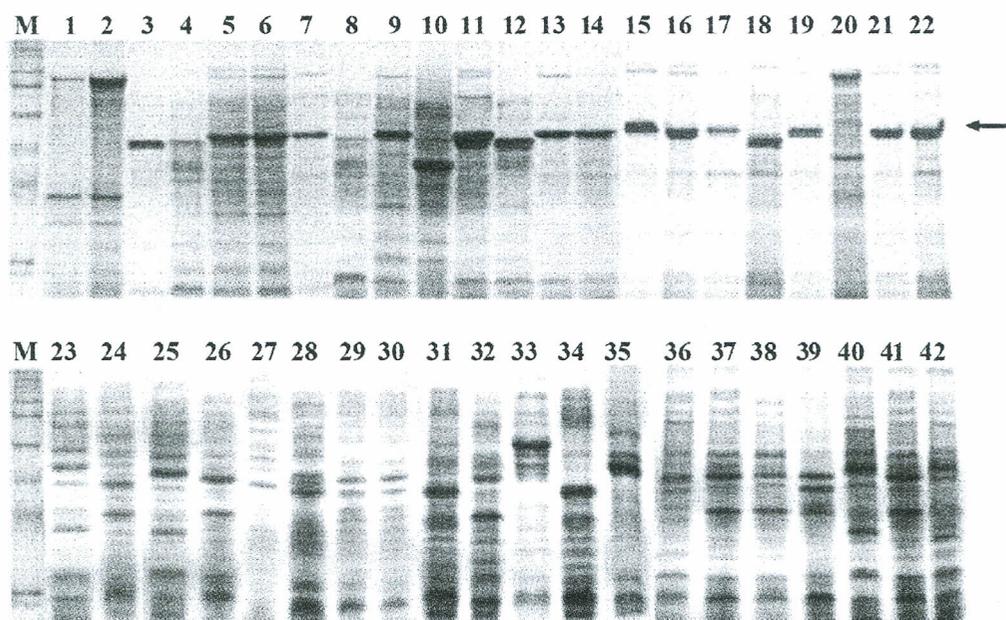
Atualmente, a diversidade biológica tem recebido grande importância, principalmente quanto a sua preservação, em vista aos processos de degradação dos ecossistemas naturais. A grande importância dos microorganismos em ecossistemas, e considerando que apenas uma parte dessa diversidade é conhecida, o desenvolvimento de estudos que explorem essa diversidade, através do isolamento, caracterização e utilização da microflora em processos agrícolas constitui-se um processo fundamental como fonte de materiais genéticos. O estudo da microflora em coleções e Bancos são importantes para identificar e preservar a variabilidade genética de espécies que apresentam importância sócio-econômica atual ou potencial para sua utilização em benefício do desenvolvimento agrícola sustentável. Microorganismos endofíticos não patogênicos, como bactérias não patogênicas, encontradas na rizosfera das culturas agrícolas e mesmo nos tecidos vegetais tem mostrado estimuladoras do crescimento das plantas, fertilizantes biológicos, agentes de controle biológico de fitopatógenos e agentes despoluentes do solo e águas. Além disso, microorganismos endofíticos tem mostrado potencial como novas fontes de genes, proteínas e compostos bioquímicos. O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade genética de bactérias endofíticas não patogênicas, em ecossistema de produção de milho, de germoplasmas tropicais, por meio da técnica SDS-PAGE e sequenciamento parcial do gene ribossômico 16S.

### MATERIAL E MÉTODO

Bactérias endofíticas foram isoladas de germoplasma tropicais de milho doce. Folhas de plantas de milho foram coletadas, lavadas e superficialmente desinfestadas. Pedacos da folha (2-3 cm) foram plaqueadas em Meio D2 (Kado & Heskett, 1970) e incubadas a 28 C por 48-72 horas. Colônias foram isoladas, purificadas e inoculadas em plantas de fumo para testes de patogenicidade. Quarenta e dois isolados não patogênicos foram identificados por técnicas moleculares SDS-PAGE (Laemmli, 1970; Jackman, 1985) e sequenciamento de rDNA. A extração de DNA genômico foi efetuada de acordo com Gurtler & Stanisich (1996). As seqüências parciais do rDNA 16S foram depositadas no EMBL/GenBank/DDB e analisadas no GenBank database usando o algoritmo BLASTN e CLUSTAL W para identificação dos isolados. O polipeptídeo de aproximadamente 42 kDa, presente na maioria dos isolados foi purificado por eletroeluição e a extremidade aminoterminal foi determinada por degradação de Edman em seqüenciador automático (Applied BioSystems 477A).

## RESULTADO E DISCUSSÃO

Os perfis eletroforéticos (Figura 1) foram utilizados para comparação dos 42 isolados, sendo distribuídos em 6 grupos: grupo 1 (Endo 1; Endo 2); grupo 2 (Endo 5, Endo 6); grupo 3 (Endo 3, Endo 7, Endo 9, Endo 13, Endo 14, Endo 15, Endo 16, Endo 17, Endo 19, Endo 21, Endo 22); grupo 4 (Endo 29, Endo 30); grupo 5 (Endo 31, Endo 34); grupo 6 (Endo 32, Endo 36, Endo 37, Endo 38, Endo 41). O sequenciamento aminoterminal do polipeptídio de aproximadamente 42 kDa (figura 1) mostrou alta identidade com flagelina H de *Bacillus*. Os dados gerados pela sequência parcial do gene 16S mostraram que os 42 isolados pertencem ao gênero *Bacillus* sendo *B. subtilis* o mais prevalente (15 isolados). Os demais isolados foram: como *B. pumilis* (12 isolados), *B. licheniformes* (7 isolados), *B. cereus* (5 isolados) e *B. amiloliquefascens* (3 isolados). e confirmou os dados de SDS-PAGE, indicando que o perfil protéico é um método eficiente e de baixo custo para identificar réplicas em coleções de *Bacillus* spp. quando um grande número de isolados deve ser identificado.



**Figura 1.** Perfil eletroforético (SDS-PAGE) de extrato protéico total de 42 bactérias endofíticas (1-42) isoladas do milho doce brasileiro. Polipeptídio de 42 kDa (seta). M = marcador de peso molecular Rainbow Pharmacia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GURTLER, V., Stanisich, V. A 1996. New approaches to typing and identification of bacteria by using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, 142, 3-16.
- JACKMAN, P.J.H. 1985. Bacterial taxonomy based on eletrophoretic whole-cell protein patterns. In: Goodfellow, M., Minnikin, D.E. (eds.) *Chemical Methods in bacterial systematics*. Academic Pres, London, UK, p. 115-129.
- KADO, C.I.; Heskett, M.G. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopatology*, 60, 969-976.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.