

## DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE *Musa* sp.

ÁTILA SOUZA<sup>1</sup>; ANA MARA OLIVEIRA DA SILVA<sup>2</sup>; NELCIMAR REIS SOUSA<sup>3</sup>; ALDO RODRIGUES DE LIMA PROCOPIO<sup>4</sup>; GILVAN FERREIRA DA SILVA<sup>5</sup>; 1,4.MBT-UEA, MANAUS, AM, BRASIL; 2.PPGBIOTEC-UFAM, MANAUS, AM, BRASIL; 3,5.EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL, MANAUS, AM, BRASIL;

**Resumo:** Foram isoladas 23 bactérias endofíticas de tecido foliar da cultivar Pacovan. A análise da diversidade genética foi realizada por meio das técnicas de ERIC e BOX-PCR a partir das quais foram obtidas 16 e 21 bandas polimórficas respectivamente. Os dados de similaridade com base na análise polifásica obtido pelo Coeficiente de Dice variaram entre 10% a 90% indicando alta diversidade genética entre os isolados analisados. Utilizando 60% de similaridade como critério para formação de OTUs (Operational Taxonomic Units) foram identificadas 7 possíveis OTUs.

**Palavras-chave:** box-pcr, endofíticos, eric-pcr, operational taxonomic units

### Introdução

Os micro-organismos endofíticos são organismos presentes nos tecidos das plantas sem causar quaisquer danos à planta e sem produzir estruturas externas emergidas dos tecidos dos vegetais (AZEVEDO et al. 2007). A exploração de interação entre plantas e bactérias endofíticas pode resultar na promoção da saúde da planta e um papel significativo na agricultura sustentável tanto para a cultura de alimentos quanto para culturas não alimentares. Além disso, tem sido mostrado o potencial de bactérias endofíticas no processo de fitorremediação de solo contaminados, na fertilidade do solo através de solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio (RYAN et al. 2008). Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar a diversidade genética de bactérias endofíticas da cultivar Pacovan.

### Material e Métodos

A coleta de tecido foliar de uma única planta de bananeira (cultivar Pacovan) foi realizada na Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus- Amazonas). Para isolamento das bactérias endofíticas as amostras de tecido foram armazenadas a temperatura ambiente sendo processada no prazo de 24 horas após a coleta. A desinfestação e isolamento foram feito segundo Procópio et al. (2009). DNA bacteriano foi extraído de acordo com o protocolo de Sun et al. (2008) modificado.

Para análise molecular com o marcador ERIC-PCR foram utilizados os primers ERIC1R 5`-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3` e ERIC2 5`-AAGTAAGTGA CTGGGGTGAGCG-3` e as

reações realizadas com: 1X de tampão IO (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 1% de Triton X-100), 2 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de cada dNTP, 50 ng de DNA, 0,5 mM de cada primer e 1 U da Taq. Polimerase Phoneutria. As reações de PCR foram realizadas no termociclador Veriti Applied Biosystems com os seguintes ciclos. Desnaturação inicial 94°C por 2 minutos, 35 ciclos com desnaturação de 94°C por 1 min, anelamento 45,5°C por 1,5 min. Síntese 72°C 2 min. Síntese final: 72°C, por 8 minutos.

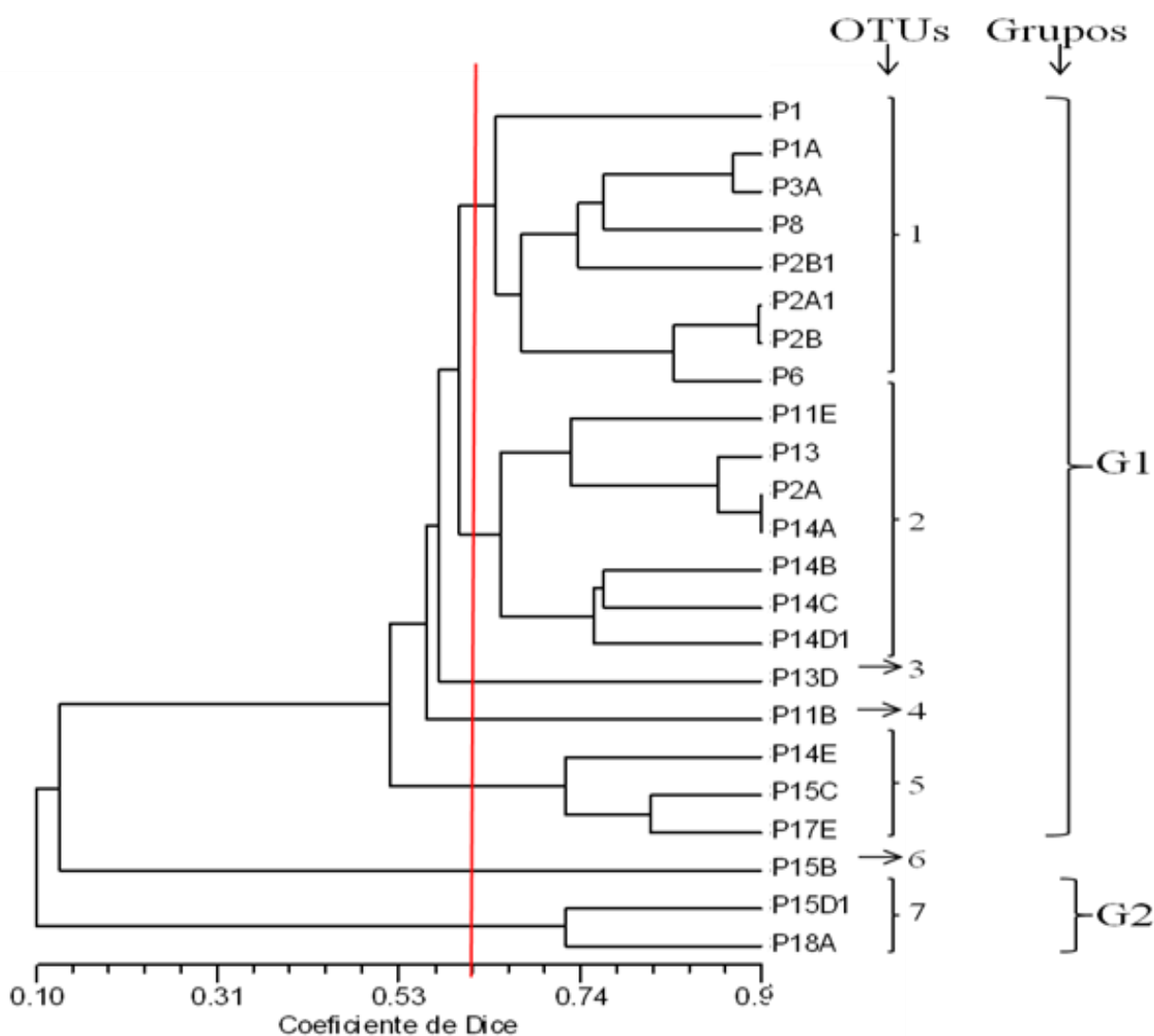
Para Box-PCR foi utilizado o primer BOX 1R 5'-CTCCGGCAAGGCGACGCTGAC -3' e as reações foram realizadas contendo 1X de tampão IO (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.4, 1% de Triton X-100), 3 mM de cloreto de magnésio, 0,25 mM de cada dNTP, 50ng de DNA, 2 mM de cada primer e 1U da Taq. polimerase Phoneutria. As reações de PCR foram realizadas no termociclador Veriti Applied Biosystems com os seguintes ciclos. Desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos com desnaturação de 94°C 1 min, anelamento 50°C por 1,5 min. Síntese 68°C, por 8 min. Síntese final 68°C por 8 minutos.

Para análise da diversidade, a matriz binária construída a partir do perfil de bandas obtidos foi analisada com base no coeficiente de Dice e o dendrograma gerado pelo método UPGMA com o auxílio de programa NTSys v.2.1.

### **Resultados e Discussão**

Foram isoladas 23 bactérias endofíticas, a diversidade genética e a obtenção de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacional) foram avaliadas por meio da análise comparativa entre os padrões gerados pela amplificação de sequências conservadas e repetitivas do DNA genômico por meio das técnicas ERIC e BOX-PCR.

Os dados indicam alta diversidade genética na comunidade de bactérias endofíticas. A partir dos resultados em conjuntos dos marcadores (BOX e ERIC-PCR), baseado na estrutura dos grupos formados pelo coeficiente de Dice, observa-se a formação de dois grupos e um isolado com perfil único (P15B), onde o grupo 1 foi formado por vinte isolados e o grupo 2 por dois isolados (Figura 1). Alta diversidade genética também foi descrita por Lira-Cadette et al. (2012) por meio de BOX-PCR, analisando a diversidade de bactérias diazotróficas associada à cana-de-açúcar capaz de solubilizar fosfato inorgânico.



**Fig. 01.** Dendrograma de similaridade calculado por meio do Coeficiente de Dice e agrupado utilizando o algoritmo UPGMA com base nos dados de ERIC e BOX-PCR dos 23 isolados de bactérias endofíticas da cultivar Pacovan.

Foram obtidas sete possíveis OTUs (Figura 1), considerando 60% de similaridade como ponto de corte, de acordo com Yang et al. (2004). Elevado número de OTUs foi identificado em bactérias endofíticas isoladas de diferentes plantas hospedeiras por Torres et al. (2008) que analisando uma amostra de 53 bactérias endofíticas de diferentes plantas hospedeira identificou a formação 23 OTUs. A presença de sete OTUs encontradas no presente estudo indica que os 23 isolados analisados são composto por sete possíveis espécies diferentes, uma vez que OTUs individuais podem ser definidas como espécies em potencial (YANG et al. 2004). Nas OTUs encontradas destacam as OTUs, 1 e 2 por serem formadas por oito e sete isolados respectivamente, as OTUs 3, 4 e 6 foram formadas por perfis únicos, a OTU 5 foi formado por três isolado e a OTU 7 por dois isolados.

## Conclusão

A análise pela técnica BOX e ERIC-PCR, indicou alta diversidade genética na comunidade de bactérias endofíticas da cultivar Pacovan.

Por meio da formação de OTUs podemos concluir que os 23 isolados corresponde a sete espécies diferentes.

## Agradecimentos

Á Capes pela concessão da Bolsa, a Fapeam pelas passagens e a Embrapa Amazônia Ocidental pela infraestrutura.

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. (2007) Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. **Fungi: multifacetated microbes**. Boca Raton: CRC Press, Anamaya Publishers, p. 189-207.
- LIRA-CADETE, L., FARIA, A. R. B., SOUZA, A. P., COSTA, D. P., FREIRE, F. J., KUKLINSKY-SOBRAL, J., (2012) Variabilidade Genética de Bactérias Diazotróficas Associadas a Plantas de Cana-de-Açúcar Capazes de Solubilizar Fosfato Inorgânico. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, p. 122-129.
- PROCÓPIO R.E.L., ARAÚJO W.L., MACCHERONI Jr W.. and AZEVEDO J.L. (2009) Characterization of an endophytic bacterial community associated with Eucalyptus spp. *Genetics and Molecular Research* 8 (4): 1408-1422.
- RYAN, R. P., GERMAINE, K., FRANKS, A., RYAN D. J., DOWLING, D. N., (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *Federation of European Microbiological Societies* 278, 1–9.
- SUN, L., QIU, F., ZHANG, X., DAI, X., DONG, X., SONG, W., (2008) Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis, *Microb Ecol* (2008) 55:415–424.
- TORRES, A. R., ARAÚJO, W. L., CURSINO, L., HUNGRIA, M., PLOTTEGHER, F., MOSTASSO, F. L., AZEVEDO, J. L., (2008) Diversity of Endophytic Enterobacteria Associated with Different Host Plants. *The Journal of Microbiology*, p. 3 73-379.