

Caracterização Molecular de Microrganismos Isolados do Ecosistema Agrícola do Cerrado

I- Bactérias endofíticas do milho

*José Edson Fontes Figueiredo*¹

*Pablo Lopes Quintão*²

*Henrique Cestari De Paoli*²

*Vinícios Tadeu da Silva Coelho*²

*Wellington Bressan*³

*Claudia Teixeira Guimarães*³

*Eliane Aparecida Gomes*³

Os microrganismos exercem atividade relevante na produtividade agrícola, porém o conhecimento sobre a biodiversidade da comunidade microbiana dos agroecossistemas tropicais ainda é bastante incipiente (Di Castri & Yones, 1990). As práticas agrícolas modernas, baseadas no uso intensivo de agroquímicos, são responsáveis, ao mesmo tempo, pelo aumento da produtividade e pela redução da biodiversidade microbiana. Bancos de microrganismos preservam a diversidade e são estratégicos para a bioprospecção de genomas de interesse agrícola e biotecnológico.

O banco de microrganismos do ecossistema agrícola tropical da Embrapa Milho e Sorgo reúne uma coleção de isolados endofíticos (bactérias, actinomicetos e fungos), fitopatogênicos (*Coletothricum graminicola* e *Polysora sorghi*) e entomopatogênicos (baculovirus, *Nomuria*, *Beauveria*), organizada

por especialistas de diferentes áreas ao longo de 27 anos de existência dessa Unidade da Embrapa. Atualmente, esses microrganismos estão sendo amplamente estudados, para avaliar o potencial de sua utilização no sistema de produção agrícola. Ao mesmo tempo, é necessário identificar adequadamente as espécies, raças e estirpes que compõem o banco e conhecer a diversidade genética desses recursos. Esse conjunto de procedimentos irá possibilitar a exploração adequada do banco de microrganismos, com a identificação de estirpes úteis para o desenvolvimento de insumos para a agroindústria, a eliminação de réplicas e o desenvolvimento de etiquetas de DNA para registro e proteção dos novos produtos biotecnológicos. Esses valores agregados ao banco, contribuirão para preservar a biodiversidade microbiana dos agroecossistemas brasileiros e reduzir a evasão de recursos com a prática da "biopirataria".

¹Biólogo, Doutor, Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

²Estudante do Curso de Ciências Biológicas/Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, Caixa Postal 46, CEP 30160-012 Belo Horizonte, MG

³Eng. Agr., Doutor, Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Caracterização do Banco de Microrganismos

Métodos fenotípicos clássicos (morfologia, testes bioquímicos e sorológicos) utilizados para identificação de microrganismos são importantes, porém apresentam limitações que os tornam insuficientes, muitas vezes, para a discriminação acurada de espécies e estirpes (di Castri & Yones, 1990; IMI, 1995; Oliveira *et al.* 1999). Contudo, quando associados às técnicas de biologia molecular, os métodos taxonômicos clássicos tornam-se, em conjunto, poderosas ferramentas para a caracterização e a identificação inequívoca de germoplasma microbiano (Bruijn *et al.* 1996; Carbone e Kohn, 1993; Guimarães & Moreira, 1999; Gütler & Stanisich 1996; Honeycutt *et al.* 1995; Nour *et al.*, 1995; Oliveira *et al.* 1999, Welsh & McClelland, 1990; White, *et al.*, 1990; Williams, *et al.*, 1990).

Neste trabalho, foram empregadas diferentes técnicas de biologia molecular (eletroforese de proteínas por SDS-PAGE, RAPD-PCR, rDNA-PCR, ARDRA e seqüenciamento de genes ribossomais) para identificar e caracterizar 22 isolados de bactérias endofíticas do agroecossistema Cerrado, objetivando eliminar réplicas do Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo. Métodos morfológicos e

bioquímicos foram previamente utilizados para estudar esse grupo de bactérias, mas se mostraram inadequados para a identificação dos isolados (Figura 1) (Bressan, dados não publicados).

O perfil eletroforético de extrato de proteínas totais (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) de bactérias crescidas em meio LB líquido foi suficiente para a identificação de réplicas existentes na coleção (Figura 2). A técnica de RAPD foi usada para estimar a variabilidade genética e relações filogenéticas nesse grupo de bactérias (Figura 3). Foram usados 20 primers aleatórios e os produtos amplificados revelaram, após a resolução dos fragmentos em géis de agarose 1,2%, a existência de polimorfismo mesmo para isolados que previamente apresentaram padrões morfológicos e bioquímicos similares. Os dados de RAPD também confirmaram os resultados de SDS-PAGE. O produto de amplificação de genes ribossomais (16S e 25S) de 13 isolados revelou o caráter policistrônico do rDNA e também foi útil para a identificação de réplicas (Figura 4). A análise de seqüências dos produtos de genes ribossomais amplificados por PCR (região 518-928 do gene 16S) possibilitou a identificação inequívoca de cada isolado e mostrou a ocorrência de espécies ainda não descritas na literatura (Figuras 5 e 6, Tabela I). Todas as espécies pertencem ao gênero *Bacillus* (*B. macroides*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *Bacillus sp.* *B. amiloliquefaciens*), confirmando a análise prévia de morfologia celular realizada com microscópio óptico.



Figura 1. Bactéria endofítica isolada do milho (Endo 05). Observação ao microscópio óptico (aumento 1000x) de células coradas pelo método de Gram.

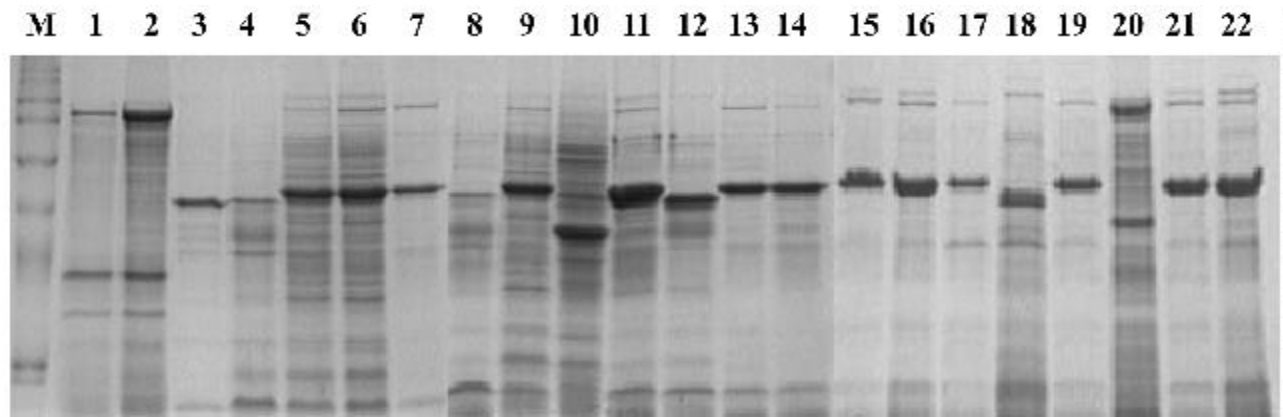


Figura 2. Perfil eletroforético de extrato protéico total de bactérias endofíticas isoladas do agroecossistema Cerrado. Os números de 1 a 22 indicam, respectivamente os isolados Endo 05 a Endo 26. **M** = marcador de peso molecular Rainbow (New England Biolabs).

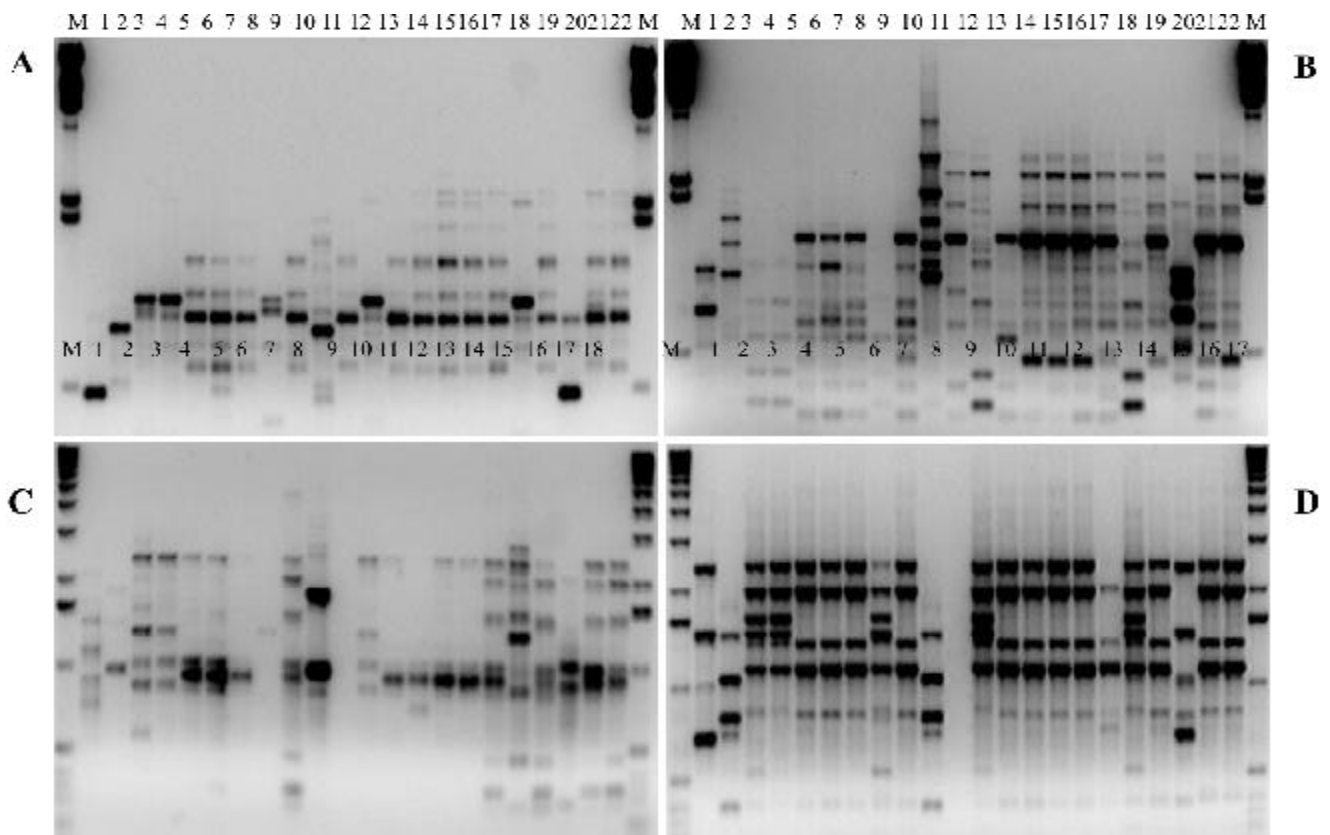


Figura 3. Perfil eletroforético de DNA genômico total de bactérias endofíticas amplificado por RAPD-PCR. Os números de 1 a 22 indicam os isolados Endo 05 a Endo 26, respectivamente, e as letras **A**, **B**, **C** e **D** são amplificações com os iniciadores OPA 12, OPA 16, OPA 19 e OPA 18. **M** = marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder.

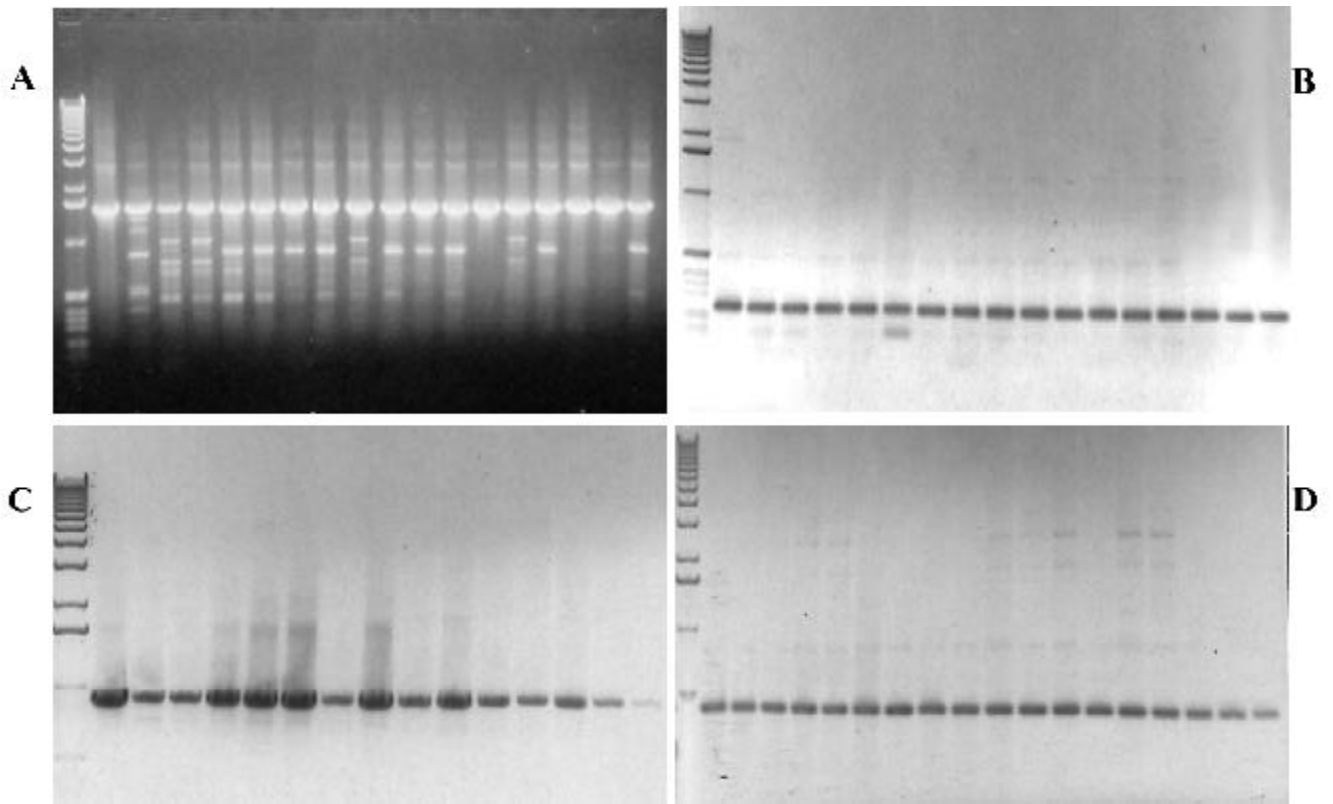


Figura 4. Perfil eletroforético de genes ribossomais (rDNA) de bactérias endofíticas do milho amplificado por PCR. As letras A, B, C e D indicam, respectivamente, ampliações dos genes 23S, ITS (16SF1536/23SR35), 16S (F27/R1542) e 16S (F27/R928). **M** = marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder.

Tabela 1. Identidade de seqüências de DNA de bactérias endofíticas isoladas do milho com seqüências de DNA ribossomal 16S de organismos depositadas no GeneBank.

Isolado	Localidade	Identidade de seqüência	Sequência
Endo 01	União do Sul, município de Dilerma	Sequência isolada	gi 2209053 dbj AB004761.1
Endo 02	com G+G-GTC-TG-positivos característicos	Sequência isolada	gi 18149254 cbj AB074701.1
Endo 03	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 143425 gb K00637.1
Endo 04	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 143425 gb K00637.1
Endo 05	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 7107443 gb AF234862.1
Endo 06	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 7107438 gb AF234851.1
Endo 07	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 18569754 gb AF489581.1
Endo 08	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 7107438 gb AF234849.1
Endo 09	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 7107438 gb AF234851.1
Endo 10	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 17646587 gb AF447803.1
Endo 11	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 7107438 gb AF234849.1
Endo 12	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 143425 gb K00637.1
Endo 13	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 7107438 gb AF234851.1
Endo 14	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 17646587 gb AF447803.1
Endo 15	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 17646587 gb AF447803.1
Endo 16	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 17646587 gb AF447803.1
Endo 17	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 7107438 gb AF234851.1
Endo 18	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 7107438 gb AF234851.1
Endo 19	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 17646587 gb AF447803.1
Endo 20	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 17646587 gb AF447803.1
Endo 21	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 17646587 gb AF447803.1
Endo 22	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 17646587 gb AF447803.1
Endo 23	Sequência isolada	Sequência isolada	gi 17646587 gb AF447803.1

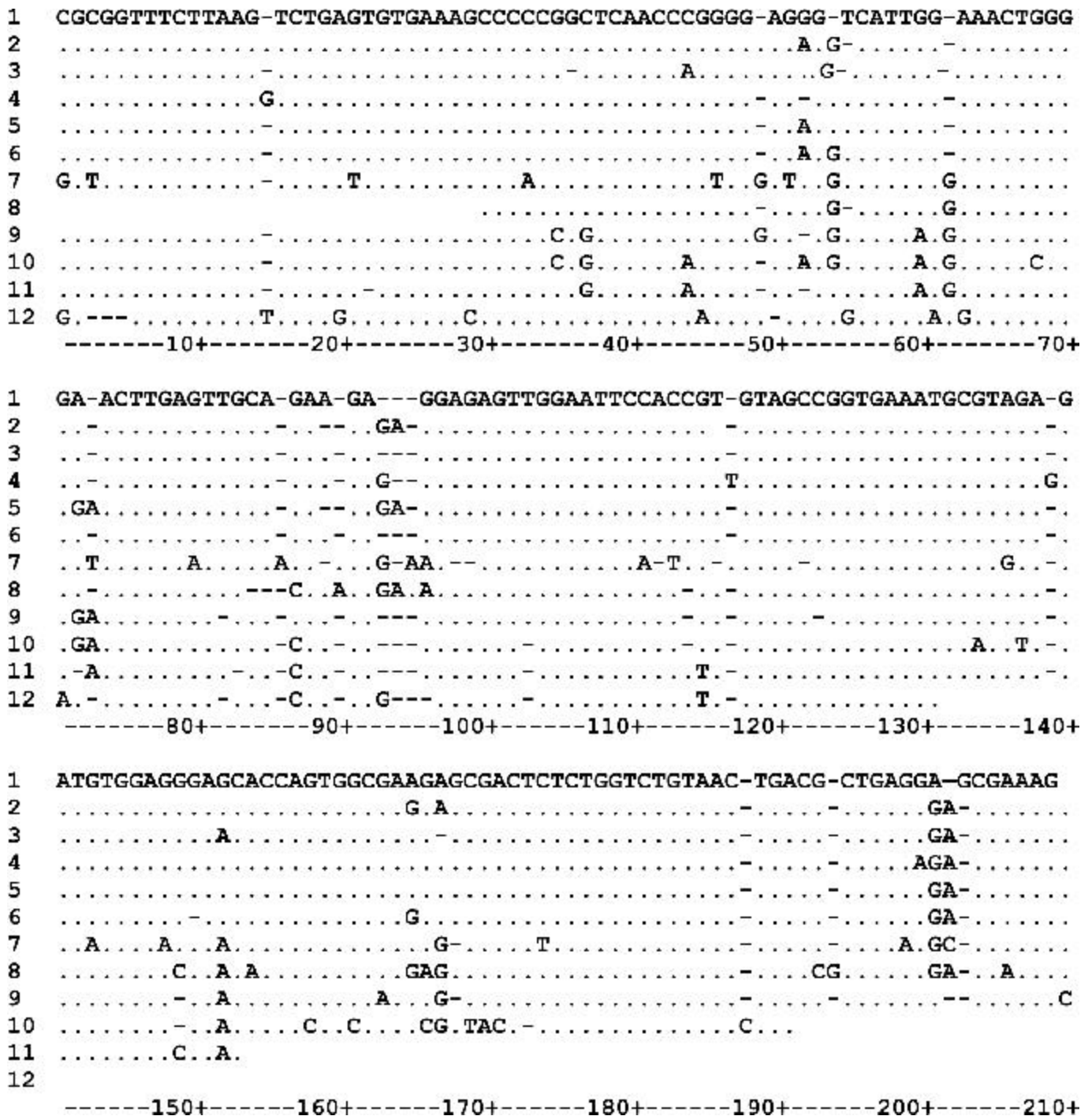


Figura 5. Alinhamento de seqüências de rDNA 16S de bactérias endofíticas isoladas do milho. Os pontos (.) representam nucleotídeos idênticos aos da seqüência apresentada na linha 1, enquanto apenas os nucleotídeos diferentes foram assinalados. Os traços (-) representam "gaps" que foram introduzidos para possibilitar o melhor alinhamento das seqüências. As reações de seqüenciamento foram realizadas com o primer 16SF-589.

Figura 5. Continuação

```
1 CGTGGGGAGCGAACAGGGATTAGATACCCT-GGTAGTCCAC-GCC-GTAAACGATGAGTTGCTAAGTTGT
2 .....-.....C.....G.....-.....
3 .....-.....GC.....G.....-.....
4 .....-.....G.....G.....-.....
5 .....-.....C..C.....T.....-.....
6 .....-.....GC.....T.....-.....
7 .....A.....T.....G.....T..C.....-.....
8 .....-.....T.....G.....G.....
9 ...C...C.....-.....C.....
```

11
12

-----220+-----230+-----240+-----250+-----260+-----270+-----280+

```
1 TAGG-GGGTTTCCGCCCC-TTAGTTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGG-CGC
2 .....-.....T...
3 .....--CG...C.....-.....T...
4 .....-CG...C.....C...
5 .G.....-.....T...
6 .....T.....T...
7 ...AA...-C.....T-.....A.T-.....
8
9
10
11
12
```

-----290+-----300+-----310+-----320+-----330+-----340+-----350+

```
1 AAGACTGAAACTCAAAGGAGTTGAAGGGG
2 .....
3 .....A...G..A.
4 .....A....G
5 .....
6 .....
7
8
9
10
11
12
```

-----360+-----370+-----380+

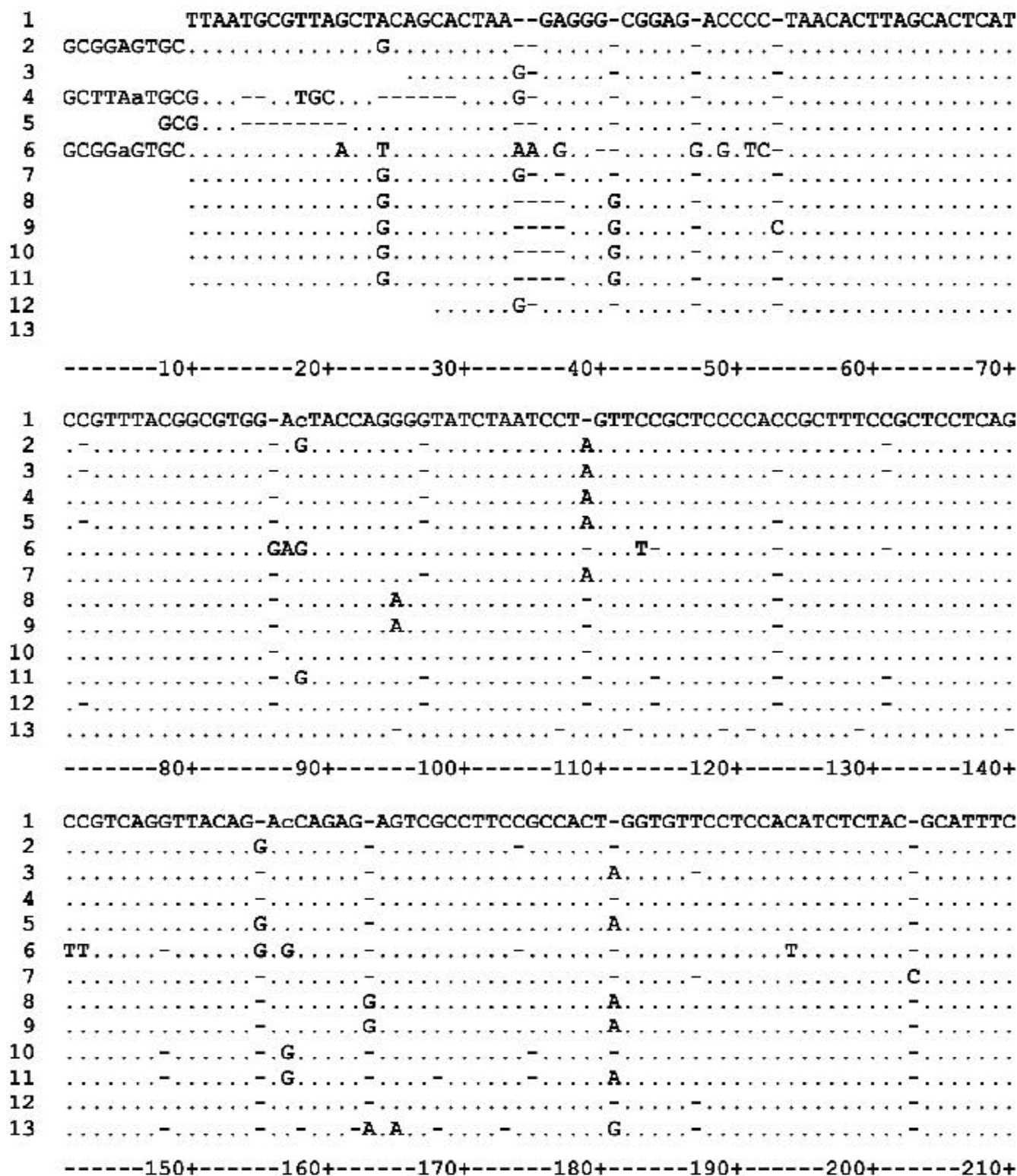


Figura 6. Alinhamento de seqüências de rDNA 16S de bactérias endofíticas isoladas do milho. Os pontos (.) representam nucleotídeos idênticos aos da seqüência apresentada na linha 1, enquanto apenas os nucleotídeos diferentes foram assinalados. Os traços (-) representam "gaps" que foram introduzidos para possibilitar o melhor alinhamento das seqüências. As reações de seqüenciamento foram realizadas com o primer 16SR-958.

Figura 6. Continuação

```
1 ACC-GCTACAC-GTGGGAATTCCTACTCTCTCTCTCT-TGCAC1CAAGG1C-CCCAG-TTTTCCAATGA-CC1C
2 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....C.....
3 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....C.....
4 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....C.....
5 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....
6 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....
7 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....
8 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....
9 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....
10 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....
11 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....
12 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....C.....
13 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....C.....
-----220|-----230|-----240|-----250|-----260|-----270|-----280|
```

```
1 CCC-GGTTGAGCCGGGGG--TTTCACATCAG-AcTTAAGAAACC-GCCTCCGAGCCC--TTTACGCCCAA
2 ..A.....C...GC.....G.....G.....C.....G.....C.....C.....
3 ..A.....-...GC.....G.....C.....C.....C.....C.....
4 .....-...G.....G.....C.....-.....C.....-...
5 ..A.....-...C.....C.....C.....C.....
6 .A.-.....C.T.GC.....G.....G.....A.....-...GC.....C.-...
7 ..A.....-C.....G.....G.....-...-...
8 .....-...G.....G.....A.....-...
9 .....-...G.....G.....A.....-...
10 .....-...GC.....C.....-...
11 .....-...G.....G.....-...
12 ..A.....-...GC.....-...
13 .....-...A.....GC.....
-----290+-----300+-----310+-----320+-----330+-----340+-----350+
```

```
1 TAATTCGGGAC-AACGCTTGCACCTACGTATTACC-GCGCC-TCCTGCC
2 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....C.....I.....
3 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
4 .....G.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....G.....
5 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....
6 .....T.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
7 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....C.....GT.....
8 .....G.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....
9 .....C.....G.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....G.....
10 .....C.GAC...C.....
11 .....G.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
12 .....G.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....C.....G1...
13 .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....
-----360+-----370+-----380+-----390+-----400+
```

Conclusões

As diferentes técnicas de biologia molecular testadas para a caracterização de bactérias endofíticas se mostraram úteis para a identificação de réplicas de isolados de bactérias endofíticas existentes no banco de microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo e revelaram a existência de novas espécies.

Com base nos resultados e na relação custo/benefício, sugere-se: 1) utilizar a técnica de SDS-PAGE para a identificação de réplicas do banco; 2) empregar a técnica de RAPD-PCR para estimar relações filogenéticas entre os diferentes isolados de bactérias endofíticas; 3) utilizar a análise de seqüências de rDNA para identificar gêneros, espécies e estirpes.

Referências Bibliográficas

- BRUIJN, F.J.; RADEMAKER, J.; SCHNEIDER, M.; ROSSBACH, U.; LOUWS, 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.
- BRUNS, T. D.; VILGALYS, R.; BARNES, S. M.; GONZALES, D.; HIBBETT, D. S.; LANE, D. J.; SIMON, L.; STICKEL, S.; SZARO, T. M.; WEISBURG, W. G.; SOGIN, M. L. Evolutionary relationships within the fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v.1, p. 231-241, 1992.
- CARBONE, I.; KOHN, L. M. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer I of the *Sclerotiniaceae*. **Mycologia**, New York, v. 85, p. 415-427, 1993.
- DI CASTRI, F.; YONES, T. Ecosystem function and biological diversity. **Biology International**, Paris, n.22, 1990. Special issue.
- 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.
- GUIMARÃES, C.T.; MOREIRA, M.A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 715-740.
- 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.
- INTERNATIONAL MYCOLOGY INSTITUTE. **Modern techniques in the identification of bacterial and filamentous fungi**. Eghan, 1995.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p. 680-684, 1970.
- NOUR, S.M.; CLEYET-MAREL, J.C.; NORMAND, P.; FERNANDEZ, M.P. Genomic heterogeneity of strains nodulating chick-peas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rizobium mediterraneum* sp. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p. 640-648, 1995.
- OLIVEIRA, V.M.; COUTINHO, H.L.C.; SOBRAL, B.W.S.; GUIMARÃES, C.T.; VAN ELSAS, J.D.; MANFLIO, G.P. Discrimination of *rhizobium tropici* and *R. leguminosarum* strains by PCR-specific amplification of 16S-23S rDNA spacer region fragments and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.28, p.137-141, 1999.
- 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.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p. 7213-7218, 1990.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR Protocols**, a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 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.

Comunicado Técnico, 66

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Caixa Postal 151 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: 0xx31 3779 1000
Fax: 0xx31 3779 1088
E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

1ª edição
1ª impressão (2003) Tiragem: 200

Comitê de Publicações

Presidente: Ivan Cruz
Secretário-Executivo: Frederico Ozanan Machado Durães
Membros: Antônio Carlos de Oliveira, Arnaldo Ferreira da Silva, Carlos Roberto Casela, Fernando Tavares Fernandes e Paulo Afonso Viana

Expediente

Supervisor editorial: José Heitor Vasconcellos
Revisão de texto: Dilermando Lúcio de Oliveira
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa