

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE BANANEIRA “PRATA-ANÃ” PARA A SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO

Autores: LUANNA VANESSA DE SOUZA CANGUSSÚ, WELLINGTON SILVA GOMES

Introdução

O fósforo é um macronutriente essencial para as plantas, pois atua na transferência de energia, além de apresentar funções estrutural e funcional, portanto a sua deficiência pode limitar o crescimento das plantas. Em solos agricultáveis realizam-se regularmente adubações fosfatadas, entretanto grande parte desse fósforo inorgânico aplicado, na forma solúvel, é rapidamente adsorvido, tornando-se indisponível para a planta (IGUAL et al., 2001). Assim, a adubação fosfatada torna-se onerosa, além de poder provocar danos ao meio ambiente. Por isso, devem-se buscar alternativas que aumente a disponibilidade desse nutriente para as plantas, sendo que uma das possibilidades é a utilização de microrganismos solubilizadores de fósforo, como as bactérias endofíticas.

Os microrganismos endofíticos habitam o interior das plantas e não causam danos aos seus hospedeiros. Esta comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos e bactérias, que podem desempenhar funções importantes para a planta. Diversos gêneros de bactérias podem atuar no controle de pragas e doenças, no aumento da absorção de água e nutrientes minerais, como o fósforo, e na melhoria da disponibilização destes nutrientes (HALLMANN et al., 1997). As bactérias endofíticas solubilizadoras de fósforo realizam a hidrólise deste para a sua forma inorgânica, ficando assim disponível para as plantas. Estes processos ocorrem através de enzimas, como as fosfatases, produzindo ácidos orgânicos e inorgânicos e/ou redução do pH (NAUTIYAL, 1999).

Existem diversas técnicas moleculares que podem ser utilizadas para a detecção e o isolamento de bactérias eficientes no processo de disponibilização de fósforo à planta. As bactérias endofíticas solubilizadoras de fósforo possuem em sua constituição genética o gene *gabY* (BABU-KHAN et al., 1995). Dessa forma, é extremamente importante aplicar técnicas moleculares, como PCR, para identificar esses microrganismos solubilizadores.

Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença do gene *gabY*, através de *primers* específicos em isolados de bactérias extraídas de raízes de bananeira “Prata-anã”, por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Material e métodos

O trabalho foi realizado nos laboratórios de biotecnologia e fitopatologia da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), Campus Janaúba-MG. Para a realização do trabalho foram utilizadas bactérias endofíticas das raízes da bananeira “Prata-anã” previamente isoladas e caracterizadas por Souza et al. (2013).

A repicagem das bactérias foi realizada em frascos contendo 70 mL do meio líquido (Soybean-Casein Digest Medium), utilizando 100 µL de cada cepa bacteriana. Após a repicagem, as bactérias foram mantidas na incubadora em uma temperatura de 25°C e 120 rpm, por um período de 24 horas sob agitação constante. Após esse período foi realizada a extração do DNA das bactérias utilizando o kit de extração da marca Qiagen e, posteriormente, foi verificada a qualidade do DNA extraído e realizada a quantificação do mesmo utilizando o espectrofotômetro, em leituras de 260 e 280 nm, para estimar a quantidade de DNA e a contaminação de proteínas respectivamente. Em seguida foi realizada a diluição do DNA das cepas bacterianas.

As amostras foram submetidas às reações de amplificação compostas das seguintes concentrações finais: 1,2 µL de dNTPs (2 mM de cada), 0,4 µL de Taq DNA polimerase (5 U µL⁻¹), 3 µL de DNA (50 ng), 1,5 µL de tampão 10X, 1 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL de cada *primer* (5 Mm), 5,9 µL de água ultrapura, com volume final de 15 µL. As amplificações foram efetuadas em termociclador empregando-se um programa sob as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 52°C por 30 seg e 72°C por 30 seg, e alongação final de 72°C por 5 min. Os produtos resultantes das amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose e corados em solução de brometo de etídeo por um período de 20 minutos. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema digital UVP Life Science Software.

Foi testado o par de *primer gabY* 1F (5'-CTGCAGATCTGGCTGAAC-3') e *gabY* 1R (5'-AGTTCGAGATCGTCGTGA-3') em dez isolados de bactérias endofíticas do gênero *Agrobacterium*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Micrococcus* (Tabela 1). A análise foi realizada por visualização direta no gel, detectando a presença ou ausência da banda correspondente ao *primer*, com auxílio de marcador de peso molecular de 1 Kb.

Resultados e discussão

O par de *primer* testado gerou produto de amplificação de peso molecular de aproximadamente 2500 pb, em todas as cepas bacterianas avaliadas (Figura 1), indicando assim que essas bactérias do gênero *Bacillus* possuem o gene (*gabY*), envolvido na produção de ácido glucônico e na solubilização de fosfato mineral (Babu-Khan et al., 1995). A partir desses resultados, pode-se inferir que as cepas de bactérias, extraídas das raízes da bananeira Prata-anã, que foram avaliadas neste trabalho, apresentam potencial de solubilização de fosfato. Em trabalho realizado por Liu et al. (1992), a expressão do gene *gabY* levou à solubilização do fosfato mineral através da produção de ácido glucônico em *Escherichia coli*. Ainda segundo o autor, em geral, os genes que codificam as fosfatases ácidas são capazes de funcionar bem no solo, fator esse muito importante para obtenção de sucesso na inoculação das bactérias, bem como para o desenvolvimento de biofertilizantes.

De acordo com Santos e Varavallo (2011), as bactérias endofíticas pertencentes aos gêneros *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, entre outros, têm sido frequentemente utilizadas em promoção de crescimento de plantas, por meio da solubilização de nutrientes. Hameeda et al. (2008), em trabalho avaliando a promoção do crescimento do milho inoculado com bactérias isoladas de compostos e macrofauna, também observaram a capacidade de solubilização de fosfato por bactérias do gênero *Bacillus*.



A inoculação com microrganismos solubilizadores de fósforo têm apresentado efeitos positivos no crescimento de plantas. Esses efeitos foram relatos por Fernández et al., (2007), em soja, Hameeda et al. (2008), em milho e Kang et al. (2009), em pepino e repolho.

Dessa forma, as bactérias caracterizadas neste trabalho apresentam potencial para o desenvolvimento de biofertilizantes de baixo custo, possibilitando a redução da utilização de fosfatos solúveis, que além de possibilitar a manutenção da produtividade das plantas de uma forma mais sustentável, reduzirá o custo de produção.

Conclusão

O gene *gabY* está presente nas cepas bacterianas testadas neste trabalho, verificado por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Agradecimentos

A Fapemig pelo apoio financeiro e a UNIMONTES pela estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências bibliográficas

- BABU-KHAN, S. et al. Cloning a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 3, p. 972-978, 1995.
- FERNÁNDEZ, L. A. et al. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. **Biology Fertility Soils**, v.43, p.805-809, 2007.
- HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 895-914, 1997.
- HAMEEDA, B. et al. Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological Research**, v.163, p.234-242, 2008.
- IGUAL, J. M. et al. Phosphatesolubilizing bactéria as inoculants for agriculture: use of update molecular techniques in their study. **Agronomie**, v. 21, p. 561-68, 2001.
- KANG, S. M. et al. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. **Biotechnology Letters**, v.31, p.277-281, 2009.
- LIU, T. S. et al. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: Nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 5814-5819, 1992.
- NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.
- SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Application endophytic microorganisms in agriculture and production of substances of economic interest. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011.
- SOUZA, S. A. et al. Endophytic bacterial diversity in banana 'Prata Ana' (*Musa spp.*) roots. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 252-264, 2013.
- SOBRAL, J. K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 108p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

Image not found or type unknown

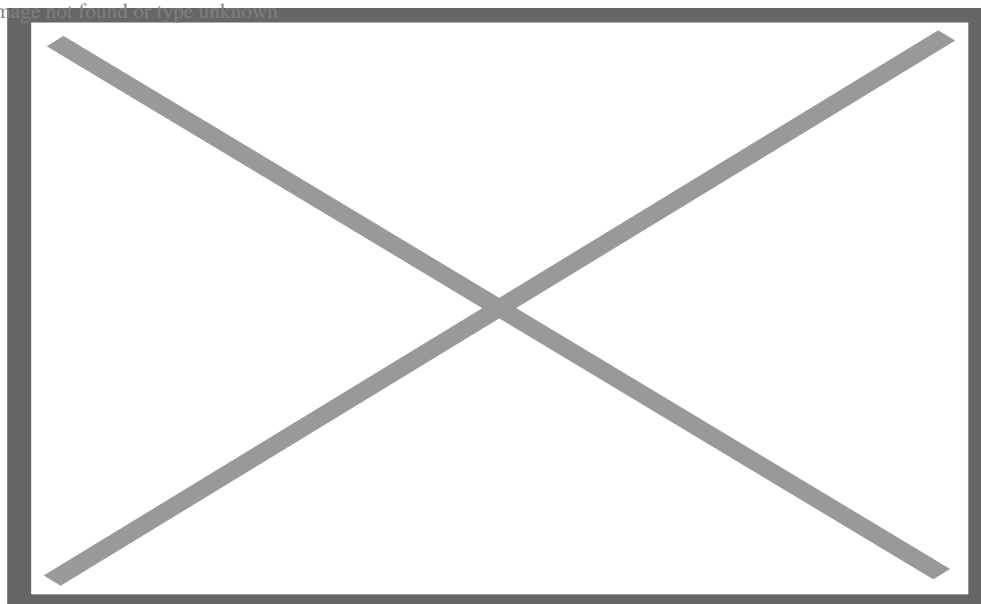


Image not found or type unknown



Apoio Financeiro: FAPEMIG

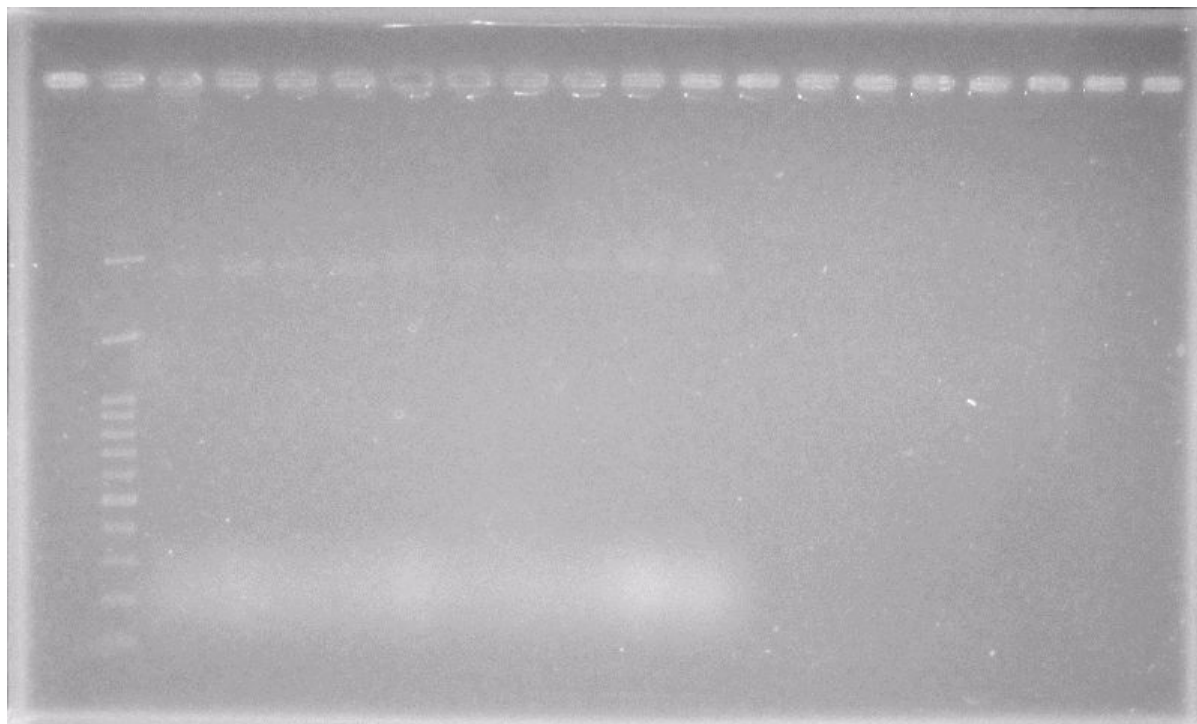


Figura 1. Produto da amplificação de 10 isolados de bactérias, extraídas de bananeira “Prata-Anã”, utilizando o par de *primer gaby* (1F) e *gaby* (1R), com produto de amplificação de peso molecular de aproximadamente 2500 pb, em gel de agarose 1,2% e tampão TBE 1X.

Tabela 1. Bactérias endofíticas isoladas de bananeira “Prata-Anã”, pertencente ao banco de germoplasma do laboratório de fitopatologia da UNIMONTES-Campus Janaúba, MG.

Isolado	Gênero/espécie	Número de acesso no GenBank
EB. 07	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GU784794.1
EB. 06	<i>Bacillus subtilis</i>	JF926531.1
EB. 33	<i>Bacillus</i> sp.	GQ340503.1
EB. 39	<i>Streptomyces</i> sp.	FJ951435.1
EB. 42	<i>Bacillus</i> sp.	JN082266.1
EB. 45	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	JN215512.1
EB. 61	<i>Bacillus</i> sp.	AF332386.1
EB. 97	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	AB301022.1

Realização:



SECRETARIA DE
DESENVOLVIMENTO
CIENTÍFICO, TECNOLÓGICO
E INOVAÇÃO SUPERIOR



Apoio:



EB. 98

Micrococcus luteus

FJ380958.1

EB. 102

Bacillus pumilus

EU977790.1