



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS ÁGRARIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ELIANE DE SOUZA SILVA**

**QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM PLANTAS  
DE SISAL UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL**

**CRUZ DAS ALMAS - BA**  
**NOVEMBRO - 2012**

**ELIANE DE SOUZA SILVA**

**QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM PLANTAS  
DE SISAL UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL**

Monografia apresentada ao curso de  
graduação em Ciências Biológicas, da  
Universidade Federal do Recôncavo da  
Bahia, como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em  
Ciências Biológicas

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Jorge Teodoro de Souza

**CRUZ DAS ALMAS – BA  
NOVEMBRO - 2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586

Silva, Eliane de Souza.

Quantificação de bactérias endofíticas em plantas de sisal utilizando PCR em tempo real / Eliane de Souza Silva. \_  
Cruz das Almas, BA, 2012.

26f.; il.

Orientador: Jorge Teodoro de Souza.

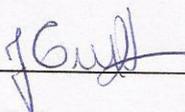
Monografia (Graduação) – Universidade Federal do  
Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias,  
Ambientais e Biológicas.

ELIANE DE SOUZA SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM PLANTAS DE SISAL  
UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL**

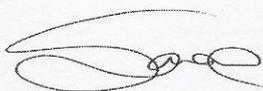
Aprovado em: 23 / 11 / 2012

**BANCA EXAMINADORA**



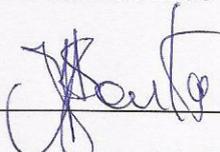
---

Orientador: Profº Dr. Jorge Teodoro de Souza  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - CCAAB



---

Membro Titular: Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira- EMBRAPA



---

Membro Titular: MSc. Adailson Feitosa de Jesus Santos  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – CCAAB

A minha família,  
meus pais: Elza e Antonio; meus irmãos: Antonia Edina, Antonio e Ivanildo.  
A todos os meus amigos, que me apoiaram e me deram força.  
Enfim, a todos os que acreditaram em meu potencial, e estiveram comigo a  
todo o momento!

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Ao grandioso DEUS, razão da minha existência!

A minha família, sem o apoio de vocês não teria conseguido.

Aos mestres de biologia, pelos ensinamentos. Em especial, uma das pessoas mais especiais e iluminadas que já conheci, Ana Karina, OBRIGADA POR TUDO, é muito bom ter sua amizade!

A todos os meus amigos de biologia, pelo convívio e amizade.

As amigas do meu coração: Jilcy, Kelly, Manu, Silvania, e Carine.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia: Adailson, Valter e Verinha.

A todas as técnicas, pela amizade e auxílio.

E ao meu orientador, Jorge Teodoro de Souza, pela oportunidade e apoio.

## QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM PLANTAS DE SISAL UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL

Autora: Eliane de Souza Silva

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Jorge Teodoro de Souza

### RESUMO

Bactérias endofíticas vivem no interior de plantas sem causarem sintomas visíveis. O uso destes organismos tem um grande potencial na agricultura devido aos seus efeitos de promoção de crescimento de plantas, indução de resistência a doenças, fixação de nitrogênio e controle biológico de fitopatógenos. Assim, realizou-se a quantificação de bactérias endofíticas cultiváveis e não cultiváveis nos tecidos aéreos de cinco plantas sadias de sisal. O estudo representa um primeiro passo para a utilização de bactérias endofíticas no controle biológico da doença conhecida como podridão vermelha, causada por *Aspergillus niger*. A análise foi realizada por meio da quantificação absoluta, utilizando-se a metodologia SYBR Green. Todas as plantas estudadas apresentaram resultados positivos quanto à presença de bactérias endofíticas associadas. As menores quantidades de DNA bacteriano foram encontradas no caule, enquanto que as maiores sempre foram encontradas em folhas e bulbilhos. Nos tecidos da flecha as quantidades de DNA foram similares, mas menores que em bulbilhos e folhas. Este estudo representa uma contribuição para o conhecimento das populações de bactérias endofíticas totais em plantas de sisal.

**Palavras-chaves:** Colonização endofítica, quantificação absoluta e *Agave sisalana*.

## QUANTIFICATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA IN SISAL PLANTS USING REAL-TIME PCR

### ABSTRACT

Author: Eliane de Souza Silva

Advisor: Prof<sup>o</sup>. Dr. Jorge Teodoro de Souza

Endophytic bacteria live inside plants without causing visible symptoms. The use of these organisms has great potential in agriculture because of their effect on plant growth promotion, induction of disease resistance, nitrogen fixation, and biological control of plant pathogens. The quantification of culturable and non-culturable endophytic bacteria in aerial tissues of five healthy sisal plants was performed. This study is a first step towards the use of endophytic bacteria for the biological control of the disease known as red rot caused by *Aspergillus niger*. The analysis was performed by absolute quantification using the SYBR Green methodology. All plant parts showed endophytic bacteria. The smaller amounts of bacterial DNA were found in stems, whereas the higher amounts were always found in bulbils and leaves. Sisal inflorescences had similar amounts of bacterial DNA and these concentrations were lower than the amounts observed in leaves and bulbils. This study represents a contribution to the knowledge of the total populations of endophytic bacteria in sisal plants.

**Keywords:** endophytic colonization, absolute quantification, *Agave sisalana*.

**LISTA DE FIGURAS**

	Página
FIG 1. Plantação de sisal no semi-árido nordestino .....	05
FIG 2. Produtos de uma reação de PCR utilizada para verificar a presença de DNA nas amostras de tecidos de partes aéreas de sisal .....	13
FIG 3. Curva de desnaturação ( <i>melting</i> ) dos primers BAC 338 e BAC 805 .....	14
FIG 4. Amplificação das amostras da flecha .....	15
FIG 5. Amplificação das amostras de DNA bacteriano obtidas de tecido aéreo de plantas saudáveis de sisal .....	16

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	<b>vii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1.1 Justificativa .....	<b>12</b>
1.2 Objetivos .....	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	
2.1 A cultura do sisal ( <i>Agave sisalana</i> ) .....	<b>13</b>
2.2 Importância econômica do sisal .....	<b>15</b>
2.3 A podridão vermelha do sisal .....	<b>16</b>
2.4 Bactérias endófitas .....	<b>17</b>
2.5 PCR em tempo real.....	<b>19</b>
<b>3. METODOLOGIA</b>	
3.1 Coleta das amostras e extração do DNA.....	<b>20</b>
3.3 PCR convencional.....	<b>21</b>
3.4 PCR em tempo real .....	<b>21</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
4.1 Extração e quantificação do DNA bacteriano.....	<b>22</b>
4.2 PCR em tempo real.....	<b>23</b>
<b>5. Considerações finais</b> .....	<b>26</b>
<b>6. Referencias</b> .....	<b>26</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias constituem um dos grupos mais diversos do planeta Terra e podem compreender mais de um milhão de espécies (KENNEDY, 1999). Elas estão presentes em todos os ambientes terrestres e aquáticos, e através de suas atividades metabólicas, afetam as propriedades químicas e físicas dos ambientes onde atuam. As que habitam o interior de tecidos vegetais sem causar danos aparentes ao hospedeiro são consideradas endofíticas benéficas (HALLMANN et al., 1997). Segundo Hallmman et al., (1997), espécies endofíticas são provenientes do isolamento de tecidos superficialmente esterilizados, uma vez que esta prática elimina possíveis microrganismos epifíticos.

Dentro da planta as bactérias podem permanecer no ponto de entrada ou se dispersar de forma sistêmica (ZINNIEL et al., 2002). Estudos das interações entre plantas e microrganismos tem demonstrado a grande importância dessas associações nos processos de adaptação das plantas às mais diversas condições de estresses bióticos a abióticos (NETO et al., 2008). O estudo dos microrganismos endofíticos é de grande importância, pois estes organismos apresentam potencial no que diz respeito à promoção de crescimento de plantas e controle biológico de fitopatógenos, seja este pelo antagonismo direto da microbiota deletéria ou pela indução de resistência sistêmica (HALLMANN et al., 1997). Porém, apesar da grande importância destes microrganismos, o número de grupos microbianos conhecidos e descritos representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza. Tendo em vista os benefícios proporcionados por estes microrganismos à planta hospedeira, torna-se necessário a realização de estudos que possibilitem conhecer a sua diversidade e atividade no controle de fitopatógenos, bem como na promoção do crescimento e indução de resistência.

A diversidade e os níveis populacionais bacterianos presentes nas mais variadas espécies vegetais é um aspecto ainda pouco explorado (STROBEL et al., 2004). Parte das informações sobre comunidades endofíticas é obtida através de métodos de isolamento em meios de cultura. Segundo Lacava et al., (2006), a diversidade encontrada por essas técnicas não chega a 1% das

espécies bacterianas presentes nas plantas. Isto devido ao desconhecimento das condições e exigências para o crescimento de muitas bactérias. Sendo assim, tem-se dado atenção ao desenvolvimento de técnicas que viabilizem não só o estudo de espécies bacterianas cultiváveis, como também as não cultiváveis. O uso de ferramentas moleculares, que possibilitem a quantificação e identificação bacteriana em espécies vegetais vem sendo utilizada com frequência.

Dentre as técnicas utilizadas no estudo de microrganismos do ambiente, destaca-se o PCR quantitativo em tempo real (qPCR). A qPCR em tempo real é uma ferramenta altamente sensível capaz de detectar e quantificar os produtos de amplificação de uma reação de PCR, permitindo não apenas a realização de estudos qualitativos, mas também quantitativos. Esta técnica também permite a análise da colonização de bactérias endofíticas no tecido vegetal. Tornando possível detectar a concentração de uma determinada amostra de DNA, permitindo uma estimativa do número de células com rapidez.

O qPCR foi utilizado neste trabalho, para quantificação de bactérias endofíticas em tecidos aéreos de plantas sadias de sisal. Esta cultura é atacada pela doença podridão vermelha, causada pelo fungo *Aspergillus niger* (COUTINHO et al., 2006). Constituindo o principal problema fitossanitário da cultura. O estudo das populações endofíticas nesse trabalho é o primeiro passo para o futuro uso dessas bactérias no controle da doença.

### **1.1. Justificativa**

Os benefícios proporcionados às diversas espécies vegetais por meio de interações com bactérias endofíticas foram demonstrados em estudos realizados por diversos autores (NETO et al., 2008; MARIANO et al., 2004; CERIGIOLI, 2005; OLIVEIRA et al., 2003; AZEVEDO et al., 2000). O sisal é uma planta econômica e socialmente importante para o Estado da Bahia, que nas últimas décadas vem sofrendo danos devido ao ataque da podridão vermelha do caule, causada por *Aspergillus niger* (COUTINHO et al., 2006). Como um primeiro passo para o uso de bactérias endofíticas no controle

biológico da podridão vermelha, faz-se necessário conhecer as populações dessas bactérias no interior de plantas saudáveis. Esse estudo visa a determinação das densidades populacionais de bactérias endofíticas no interior das partes aéreas de sisal por meio da técnica de PCR em tempo real. Essa técnica permite a quantificação das bactérias cultiváveis e das não cultiváveis, superando a limitação dos meios de cultivo tradicionais usados em laboratório.

## 1.2. Objetivos

### ➤ Objetivo geral:

Quantificar bactérias endofíticas nos diferentes tecidos de plantas de sisal por PCR em tempo real

### ➤ Objetivos específicos:

- Estudar a técnica de PCR em tempo real e seu emprego na quantificação de bactérias.
- Quantificar as bactérias endofíticas associadas ao sisal.
- Comparar a população de bactérias endofíticas em diferentes tecidos da parte aérea de plantas de sisal (caule, folha, flecha e bulbilho).

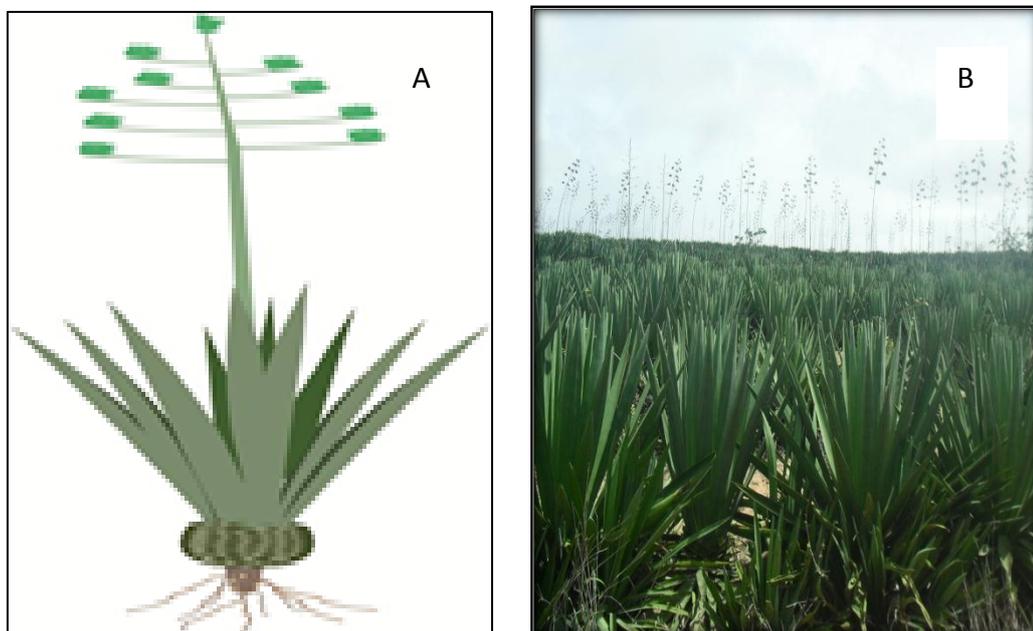
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A cultura do sisal (*Agave sisalana*)

O sisal (*Agave sisalana*) é uma monocotiledônea pertencente à família *Agavaceae*, subfamília *Agavoidea*. Esta planta herbácea e perene floresce apenas uma vez durante o ciclo vegetativo (SILVEIRA, 2009). Possui folhas lanceoladas, com pontas afiadas, destituídas de pecíolos, podendo medir

aproximadamente dois metros de altura (Figura 1). Outras características morfológicas, como folhas carnosas e epiderme fortemente cutinizada permitem que o sisal seja adaptado a regiões semi-áridas (SILVA, 1999; CNA, 2004). Além disso, apresenta metabolismo fotossintético do tipo CAM, abrindo os estômatos à noite, para não perder água via transpiração durante o dia e se beneficiar do orvalho.

As plantas de sisal apresentam facilidade de cultivo e crescimento rápido (CHAND, 1988). A planta produz em torno de 200 a 250 folhas durante o seu ciclo e cada folha contém cerca de 1000 a 1200 feixes de fibra, sendo composta por 4% de fibras, 0,75% de cutícula e 8% de água (MURHERJEE; SATYANARAYANA, 1994). O principal produto desta cultura é a fibra do tipo dura, com elevados teores de celulose e lignina, que oferecem inúmeras aplicações.



**Figura 1.** Caracteres morfológicos da planta (A). Plantação de sisal no semi-árido nordestino (B);

**Fotos:** Adailson Feitoza (A)

**Fonte:** valenteemnoticias.com (B)

## 2.2. Importância econômica do sisal

O Brasil é o maior produtor de sisal do mundo. A região do Nordeste brasileiro se destaca, tendo a Bahia como o maior produtor nacional, contribuindo com aproximadamente 94% da produção. Na Bahia a região de Conceição do Coité (Santa Luz, Queimadas, Retirolândia, Valente) é tida como principal produtora de sisal do estado. Nestas regiões, o sisal é a principal cultura, com grande importância sócio-econômica, principalmente no contexto da agricultura familiar, devido à sua adaptação ao clima seco. Nesse Estado, o sisal chega a empregar aproximadamente 700 mil trabalhadores, ocupando uma área de 260.044 hectares (IBGE, 2009).

A fibra de sisal é tida como uma importante fonte de divisas no Estado da Bahia, através de sua exportação e/ou comercialização interna, rendendo cerca de 80 milhões de dólares em divisas para o Brasil. Além de gerar mais de meio milhão de empregos na sua cadeia de serviços, tendo início nas atividades de manutenção das lavouras: colheita, desfibramento e beneficiamento da fibra e termina com a industrialização e a confecção de artesanato (SINDIFIBRAS, 2011).

Sendo assim, esta cultura torna-se importante não só pela geração de empregos e renda, beneficiando famílias das mais carentes do Brasil, mas também porque seus produtos especialmente a fibra são importantes fontes de divisas.

Segundo Secex (2009), no período correspondente a safra 2008/2009 foram exportadas 78,6 mil toneladas de fibra de sisal gerando uma receita de 88,6 milhões de dólares. O Brasil, com 47% da produção, seguido da Tanzânia (15%), China (15%) e Quênia (12%) são os maiores produtores mundiais de sisal. Os Estados Unidos e China são os principais importadores, absorvendo 45% e 22% da produção brasileira, respectivamente.

### 2.3. A podridão vermelha do sisal

Apesar de ser considerado uma planta rústica e pouco suscetível ao ataque de pragas, tem-se observado uma elevada devastação dos plantios de sisal devido à podridão vermelha do caule, que resulta na morte da planta e perda da qualidade da fibra (ABREU, 2010). A doença foi constatada pela primeira vez no Brasil no Estado da Paraíba, segundo dados de Machado (1951), citado por Medina (1954). Na Bahia, foi observada pela primeira vez na fazenda Mandacaru, município de Santaluz, em um plantio comercial de 500 hectares (LIMA et al. 1998).

O fungo mitospórico *Aspegillus niger* foi identificado como o agente causal da podridão vermelha do sisal nos estados da Paraíba e Bahia (COUTINHO et al., 2006; SOARES et al., 2006). Este é um fungo filamentosos, pertencente à ordem Eurotiales, Família Tricomaceae e Filo Ascomiceto (DEEPAKE, 2009). Apresenta crescimento aeróbico e é encontrado na serrapilheira e na matéria orgânica em decomposição (SCHUSTER et al., 2002). Este fungo é considerado oportunista, uma vez que não penetra em tecidos não injuriados do hospedeiro, necessitando de lesões de origem mecânica ou fisiológica para que ocorra a infecção (LIMA et al., 1998). Segundo Roger (1953), citado por Souza Filho et al., (1979), a capacidade de penetração e colonização de *A. niger* depende do estado em que se encontra o hospedeiro pois, quando submetidas a algum tipo de estresse, as plantas ficam mais predispostas à infecção.

A podridão vermelha do sisal afeta plantas em qualquer estágio de desenvolvimento e induz a descoloração avermelhada dos tecidos internos do caule, evoluindo para podridão, resultando na morte da planta. Externamente as folhas ficam amarelas e murchas (COUTINHO, 2006).

Dados observados por Abreu (2010) demonstram uma variação de 5% a 35% de incidência da podridão vermelha do sisal, e uma prevalência de 100% em municípios da região sisaleira baiana.

Embora seja uma doença que causa a morte da planta, o sisal infectado consegue sobreviver por algum tempo, uma vez que o apodrecimento resultante da colonização da planta pelo fungo ocorre geralmente de forma lenta (CANTALINO et al., 2007).

## 2.4. Bactérias endofíticas

Bactérias endofíticas são aquelas associadas às plantas, colonizando-os de forma ativa, local ou sistêmica, ou em estado latente. Esse tipo de interação planta-bactéria parece ocorrer na maioria, das espécies vegetais (MISAGHI; DONDELINGER, 1990). Esses microrganismos podem ser isoladas ou extraídas de tecidos vegetais superficialmente esterilizados (HALLMANN et al., 1997).

O termo endófito foi mencionado pela primeira vez no início do século XIX, para definir todos aqueles organismos que colonizam tecidos internos de plantas. Mas foi Bary em 1866, quem primeiro delineou uma possível distinção entre eles e patógenos de plantas.

Segundo Huang (1986), a entrada de bactérias no tecido vegetal pode ocorrer via estômatos, lenticelas, ferimentos, áreas de emergência de raízes laterais e radículas em germinação. Entretanto, as principais portas de entrada de bactérias parecem ser os ferimentos, os pelos radiculares ou entre as células epidérmicas intactas (HALLMANN et al., 1997). Bactérias endofíticas produtoras de celulases e de pectinases também podem penetrar de forma ativa, por degradarem enzimaticamente à parede celular de células vegetais (HALLMANN et al., 1997).

A infecção e colonização das plantas é um processo dinâmico que envolve a movimentação das bactérias em direção a planta hospedeira, sua adesão à superfície das plantas e posterior penetração e multiplicação no seu interior (STEENHOUDT ; VANDERLEYDEN, 2000).

A movimentação dos microrganismos em direção às raízes ocorre quando existe um reconhecimento químico, quimiotaxia. Inicialmente ocorre uma adsorção reversível, e em seguida um ancoramento irreversível, controlado por proteínas extracelulares de origem bacteriana. Esta etapa é comandada por sinais moleculares emitidos pelas raízes da planta hospedeira, e a sobrevivência do microrganismo depende de fatores bióticos e abióticos (DOBBELAERE et al., 2003).

Com o acúmulo de informações sobre a interação planta-endófitos (AZEVEDO et al., 2000; ARAÚJO et al., 2001), e com a determinação das

diferentes funções desses microrganismos no interior da planta, tem sido dada atenção ao estudo de bactérias endofíticas, que podem atuar no controle biológico de inúmeras doenças (M'PIGA et al., 1997), na promoção de crescimento vegetal (ULRICH et al., 2008; TAGHAVI et al.; 2009), e na biorremediação de áreas poluídas (NEWMAN e REYNOLDS, 2005).

Vários são os exemplos desta associação benéfica com espécies vegetais. Sendo assim, com relação à promoção do crescimento de plantas, elas podem atuar por meio de mecanismos diretos e indiretos. Fixação de nitrogênio e/ou produção de fitohormônios; antagonismo contra patógenos ou resistência a drogas respectivamente (NETO et al., 2008).

Dentre os gêneros mais isolados incluem-se: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (HALLMANN et al., 1997). Oliveira et al., (2002), encontraram cerca de dez gêneros de microrganismos endofíticos associados a plantas de citros. *Pantoea agglomerans* e *Sphingomonas sanguinis* foram isoladas como endofíticas em batata-doce (ADACHI et al., 2002). Zinniel et al., (2002) identificaram, pela primeira vez o hábitat endofítico de *Microbacterium testaceum* em várias plantas hospedeiras.

Dentre as técnicas utilizadas para avaliar a comunidade endofítica de plantas, não se permite o estudo de microrganismos não cultiváveis, restringindo os estudos a espécies cultivadas, que na maioria são conhecidas. Com o objetivo de melhorar a caracterização e a análise destas comunidades, independentemente do cultivo das espécies que as compõem, o interesse tem sido focado no desenvolvimento de técnicas de biologia molecular capazes de permitir o estudo da comunidade endofítica em seu habitat. A análise do gene de 16S rRNA tem sido utilizada no estudo de microrganismos do ambiente (AMANN et al., 1995). Em bactérias este gene é amplamente utilizado, sendo considerado uma das moléculas mais importantes para o estudo de filogenia e ecologia microbiana (BECKER et al. 2004). O gene 16S pode ser usado para a detecção de bactérias, por meio da técnica de FISH. Esta técnica consiste na utilização de sondas de oligonucleotídeos, geralmente com 15 a 30 nucleotídeos de comprimento, complementares às regiões 16S rRNA. (AKARSUBASI et al., 2005).

## 2.5. PCR EM TEMPO REAL

A PCR em tempo real (qPCR) é uma ferramenta altamente sensível capaz de detectar e quantificar os produtos de amplificação de uma reação de PCR. Esta detecção é possível devido ao uso de marcadores fluorescentes presentes na reação de amplificação. O marcador fluorescente mais utilizado é o corante SYBR Green, o qual possui a capacidade de se intercalar à dupla fita de DNA e emitir o sinal fluorescente, quando excitado, nos comprimentos de onda de 494 a 521 nm. O sinal emitido é então quantificado e utilizado para determinar a quantidade de amplificação presente na reação (ANDREOTE, 2007).

De acordo com Malorny (2008), a PCR em tempo real permite não apenas a realização de estudos qualitativos, mas também, quantitativos. Segundo Ledur et al., (2004) esta técnica permite a detecção direta dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação, combinando amplificação e detecção em uma só fase. Ao contrário do que ocorre em PCR convencional, onde a detecção ocorre apenas ao final da reação e a interpretação dos resultados é feita pela análise da amostra amplificada em eletroforese em gel de agarose (MATA, 2009).

Através da técnica de qPCR vários grupos e espécies de bactérias têm sido alvos de quantificação. Segundo Oliveira et al., (2002), a bactéria patogênica de citros *Xylella fastidiosa* foi quantificada por meio da aplicação desta técnica. A quantificação de bactérias não patogênicas associadas as plantas, também podem ser realizada por qPCR, como por exemplo a colonização endofítica de boa-noite (*Catharanthus roseus*) por *Methylobacterium mesophilicum* (LACAVA et al., 2006). Em couve (*Brassica oleracea*), a população bacteriana de *Enterobacter radicincitans*, foi monitorada por meio de qPCR combinada com hibridação *in situ* (RUPPEL et al., 2006). A combinação destas técnicas permitiu não apenas avaliar a quantidade de bactérias na planta hospedeira, como também identificar sua localização no interior da mesma.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Coleta das amostras e Extração de DNA

Cinco plantas sadias de sisal foram coletadas no município de Valente, pertencente à região sisaleira do Estado da Bahia.

Fragmentos de cada tecido foram armazenados em isopor com gelo, até seu processamento no laboratório.

O DNA bacteriano foi extraído de amostras de caule, folha, flecha e bulbilho. Antes de realizar-se a extração do DNA, os tecidos foram superficialmente desinfestados a fim de evitar possíveis contaminações de microrganismos exógenos. A desinfestação consistiu-se na imersão em etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio 1% por 2 min e 3 sucessivas lavagens em água destilada esterilizada.

As amostras desinfestadas foram maceradas em almofariz com nitrogênio líquido, em seguida, transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 720 µL de tampão de extração pré-aquecido (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl e 1,25% SDS). As amostras foram homogeneizadas e então incubadas a 65°C por 15 min. Logo após, foram submetidas à centrifugação a 10000 rpm por 10 min. O sobrenadante remanescente foi adicionado ao um novo tubo. Para precipitação das proteínas foi adicionado 225 µL de acetato de potássio 5 M e incubado por 20 min em gelo. As amostras foram novamente centrifugadas 10000 rpm por 5 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado adicionando 2\3 do volume de isopropanol gelado, e os inibidores remanescentes removidos por precipitação do DNA com 300 µL de etanol gelado 70%. O DNA foi ressuspendido em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e estocado a -20°C.

### 3.2. PCR convencional

Para atestar a eficiência da extração de DNA, foi realizada uma reação de PCR utilizando o par de primers universal 8 FN (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'), tendo como gene alvo o rDNA 16S (TURNER et al., 1999). Esta é uma região altamente conservada entre as bactérias (BECKER et al. 2004) e é considerada uma metodologia de referência para a identificação bacteriana (NOLTE; CALIENDO 2003).

Na reação de amplificação utilizou-se 2,5 µl de PCR Buffer (10X); 2,0 µl dNTPs (10mM); 2,0 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 0,75 µl de cada primer (10 µM); 0,3 µl de Taq DNA Polimerase (5 U\ µl), cerca de 30 ng de DNA e água ultra pura para volume final de 25 µl. As condições de termociclagem foram: 94°C por 2 min, seguida de 9 ciclos iniciais de 45 s 94°C, 45 s a 58°C; 1 min a 72°C; e mais 29 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s 58°C, e 1 min 72°C. Também foi programada uma extensão final de 5 min a 72°C. Após a amplificação, o produto foi quantificado utilizando o Qubit 2.0 Fluorometer. Em seguida, o DNA foi padronizado para 30 ng/µl.

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1 %. Após eletroforese, os géis foram fotografados em transiluminador de UV e fotodocumentados.

### 3.3. PCR em tempo real

Para detecção do gene 16S rRNA em DNA extraído dos diferentes tecidos de plantas de sisal, foi utilizado o par de primers BAC 338 (5'ACT CCT ACG GGA AGG CAG 3'), (YU et al., 2005a) e o BAC 805 (5'GAC TAC CAG GGT ATC TAA TCC 3'), (YU et al., 2005b).

Para construção da curva padrão, foram utilizados produtos de uma reação de PCR convencional com um isolado de *Rizhobium* e os primers BAC 338 e BAC 805. Em seguida, diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ), do DNA deste isolado foram realizadas para construção desta curva e determinação do valor de Ct (Cycle threshold). Esta reação foi conduzida no equipamento ABI PRISM® 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems). O valor de Ct obtido na

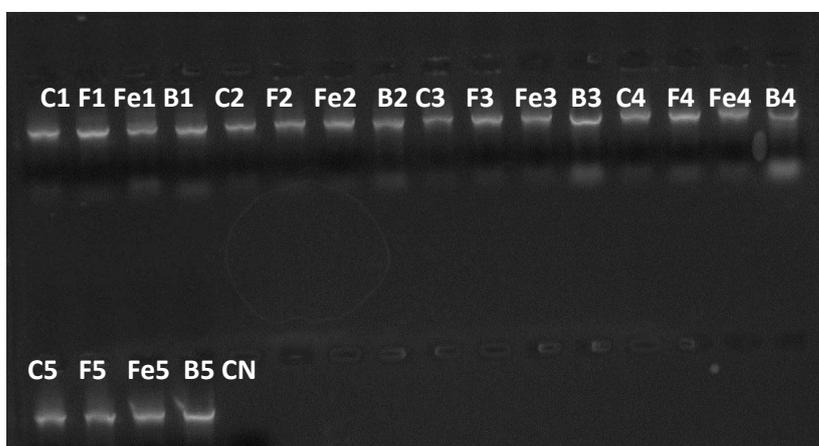
curva padrão foi então comparado ao produto amplificado em nogramas (ng), permitindo quantificar o gene alvo nas amostras obtidas das plantas. A curva padrão foi calculada utilizando a seguinte fórmula:  $y = mx + b$ , onde “y” corresponde ao Ct ; “m” representa a inclinação da curva e “b” corresponde ao ponto de intercessão dos eixos da curva (função da eficiência da PCR). Uma reação 100% eficiente produzirá um aumento de 10 vezes no produto da PCR a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação ( $\log_2 10 = 3,3219$ ).

A colonização de bactérias endofíticas foi analisada por meio da quantificação absoluta, utilizando a metodologia SYBR Green, que tem a capacidade de intercalar fitas duplas de DNA, emitindo fluorescência durante a ligação. As reações de amplificação consistiram de 25  $\mu$ l contendo 12.5  $\mu$ l de GoTaq® q-PCR Master Mix 2x (Promega), 1  $\mu$ l de cada primer, 8,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O e 2  $\mu$ l DNA. Foram realizadas três repetições de cada amplificação, todos os experimentos incluíram controle negativo (água, sem DNA molde).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Extração do DNA bacteriano

A eficiência da extração foi atestada por meio de uma reação de PCR convencional. O resultado mostrou que o par de *primers* utilizado amplificou o produto esperado, sendo observado a presença de banda em todos os tecidos analisados (figura 2).

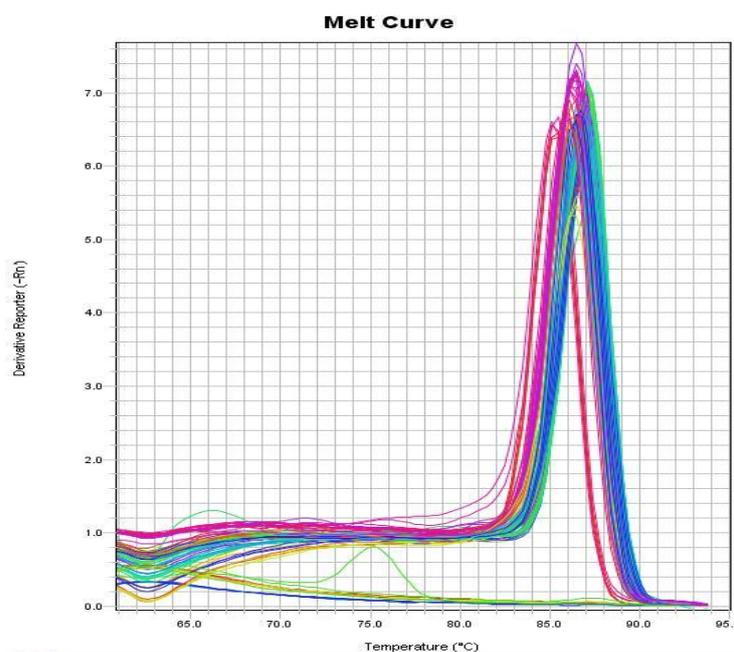


**Figura 2.** Produtos de uma reação de PCR convencional utilizada para verificar a presença de DNA nas amostras de tecidos de partes aéreas de 5 plantas de sisal, utilizando o par de primers universal 8 FN e 1494r, que amplificam um fragmento de aproximadamente 1500 pb, onde: C= caule; F= folha; Fe= flecha; B= bubilho e CN= controle negativo.

## 4.2. PCR em tempo real

Neste estudo, análises de qPCR foram realizados para quantificar bactérias endofíticas totais em cinco plantas saudáveis de sisal, utilizando o par de primers BAC 338 e BAC 805, que amplificam um fragmento de aproximadamente 400 pb.

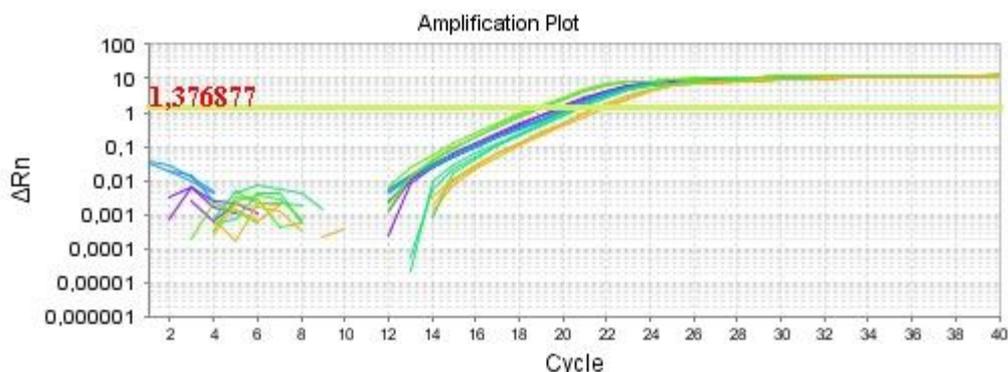
Na reação de qPCR, a especificidade do oligonucleotídeo iniciador é especialmente importante, principalmente quando a reação está associada ao SYBR Green. Este corante intercalador não é específico e detecta todos os fragmentos de DNA dupla fita como dímeros de oligonucleotídeos ou produtos de amplificação de DNA não específicos. Dissociações são geradas no fim da reação qPCR por aumento progressivo da temperatura na reação, calculando a proporção de emissão da fluorescência (STROPA, 2009). O nível de especificidade do oligonucleotídeo é obtido indiretamente através da desnaturação do amplicon gerado (figura 3).



**Figura 3.** Curva de desnaturação (*melting*) dos primers BAC 338 e BAC 805, utilizados na quantificação absoluta de bactérias endofíticas totais em tecidos de sisal.

Neste estudo, todas as amostras analisadas apresentaram resultados positivos, isto devido à amplificação do fragmento utilizado, sendo possível a visualização do Ct (Cycle threshold), momento em que a fluorescência é

detectada na reação. Na figura exemplificada abaixo, o Ct pôde ser observado entre os ciclos 18 e 20.



**Figura 4.** Exemplo de amplificação do tecido sadio de sisal (flecha) por qPCR, utilizando os primers BAC 338 e BAC 805. A figura mostra o CT das amostras de flechas de cinco plantas em triplicata.

Segundo Becker et al., (2004), o gene rRNA ribossomal 16S é altamente conservada entre as bactérias, sendo considerado adequado para o estudo da diversidade microbiana em amostras ambientais (MUYZER, 1999).

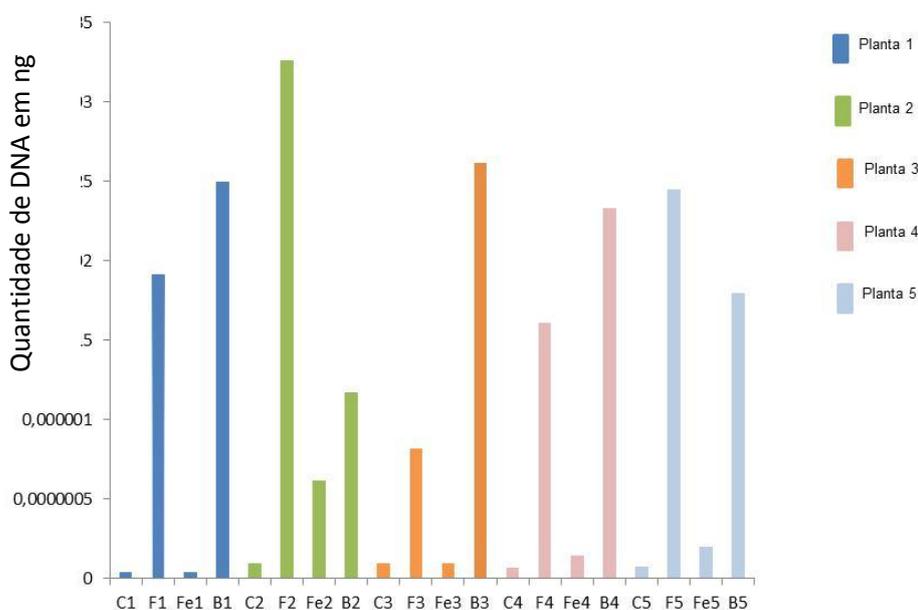
Maiores quantidades de DNA foram observadas em folhas e bubilhos de sisal (Figura 5). Entretanto, apesar de não terem sido feitas análises estatísticas, foi observado que as plantas 1, 3, 4 apresentaram bubilhos com maiores quantidades de DNA, quando comparados com as folhas. Enquanto que as folhas apresentaram maiores quantidades de DNA que os bubilhos em duas plantas (figura 5).

No geral, todas as plantas apresentaram quantidades de DNA similares em amostras de flecha, com exceção da planta 2. Essa planta também foi a que mostrou a maior concentração de DNA bacteriano nas folhas. Amostras de caule apresentaram as menores concentrações de DNA.

Esses resultados contrastam com os obtidos por Silva (2012), que encontrou maiores densidades de bactérias endofíticas cultiváveis em amostras de caule do que em amostras de folhas de sisal, com  $10^5$  e  $10^4$  UFC  $g^{-1}$  do tecido seco, respectivamente. Esse mesmo autor, realizando quantificação absoluta de bactérias endofíticas totais cultiváveis e não

cultiváveis por qPCR em amostras sadias e doentes de caule de sisal, constatou que a quantidade de bactérias presentes no caule são influenciadas pela presença do patógeno. Neste estudo as densidades populacionais em plantas sintomáticas foram de  $9,2 \times 10^7$ , enquanto que em plantas assintomáticas foram de  $4,5 \times 10^7$  células/g de tecido. Esses resultados mostram que as populações de bactérias endofíticas totais em caule de sisal determinadas por qPCR são aproximadamente 450X maiores do que é detectado com meios tradicionais de cultivo.

O próximo passo desse trabalho será a quantificação de bactérias endofíticas em plantas doentes de sisal para comparar com os dados obtidos para plantas sadias.



**Figura 5.** Quantidade de DNA em nanogramas resultantes da amplificação das amostras de DNA bacteriano obtidas de tecido aéreo de plantas sadias de sisal, utilizando os primers BAC 338 e BAC 805, para quantificação de bactérias endofíticas totais. Onde: C=caule; F=folha; Fe=flecha; B=bubilho.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos no presente trabalho são importantes para o conhecimento da microbiota associada ao sisal. Neste estudo realizou-se a quantificação de bactérias endofíticas cultiváveis e não cultiváveis associadas a esta cultura. Porém, é necessário conhecer a densidade e diversidade desses microrganismos para sua aplicação na agricultura, tendo em vista os benefícios proporcionados à planta hospedeira. Dentre estes benefícios destacam-se: o controle biológico de fitopatógenos, fixação de nitrogênio e melhor adaptação das plantas as condições de estresse. O sisal vem sendo objeto de diversas pesquisas, principalmente no que se refere ao controle biológico, uma vez que esta cultura vem sendo atacada por *Aspergillus niger*, causador da podridão vermelha do caule.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABREU, K. C. L. M. **Epidemiologia da podridão vermelha do sisal no Estado da Bahia**. 117p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2010.
- ADACHI, K.; NAKATANI, M.; MOCHIDA, H. Isolation of an endophytic diazotroph, *Klebsiella oxytoca*, from sweet potato stems in Japan. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 48, p. 889-895, 2002.
- AKARSUBASI, A. T.; INCE, O.; KIRDAR, B.; OZ, N. A.; ORHON, D.; CURTIS, T. P.; HEAD, I. M.; INCE, B. K. Effect of wastewater composition on archeal population diversity. **Water Research**, v. 39, p. 1576-1584, 2005.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 143-169, 1995.
- ANDREOTE, D. F. Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 184 p. **(Tese de doutorado)**, Piracicaba, 2007.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; ELSAS, J.D.; VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interactions with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4906-4914, 2001.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, JR., W. ; PEREIRA, J. O. ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. In: **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p.445-461, 2000.

BARY, A. de. Morphologie Physiologie der Pilze. Flechten, und Myxomyce- ten. Vol. II. Holmeister's Hand- book of Physiological Botany, **Leipzig**, 1866.

BECKER K., HARMSSEN D., MELLMANN A., MEIER C., SCHUMANN P., PETERSBG. & von Eiff C. Development and evaluation of a quality controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA based identification of *Staphylococcus* species. **J. Clin. Microbiol.** v. 42, n. 11, p. 4988-4995, 2004.

CANTALINO, A. L.; LEÃO, A. L.; LOBO, A. C. O.; STARLING, A. L. de L. et al. **O Sisal do Brasil: Brazilian Sisal**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007.

CERIGIOLI, M. M. **Importância de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de milho**. (Tese de doutorado). Universidade Federal de São Carlos, 149 p. 2005.

CHAND, N.; TIWARY, R. K.; ROHATGI, P. K. Bibliography resource structure properties of natural cellulosic fibres an annotated bibliography. **Journal of Materials Science**, v.23, p.381-387, 1988.

CNA. **Sisal: problemas e soluções**. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 5 fev. 2004.

COUTINHO, W.M.; SUASSUNA, N.D.; LUZ, C.H.; SUINAGA, F.A.; SILVA, O.R.R.F. Bole rot of sisal caused by *Aspergillus niger* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 605, 2006.

DEEPAKE, U., Aero-microbiological studies of Moisture Affected Buildings in the Indoor Environment. **Journal of Young Investigators**. Vol. 19, Issue 11. 2009.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, 43:895-914, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA- IBGE. Disponível em < [www.ibge.br](http://www.ibge.br) > Acesso em 06 out. 2009.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, ecosystems and Environment**, v. 74, p.65-76, 1999.

LACAVA, P. T.; LI, W. B.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; HARTUNG, J. S. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 65, 2006.

LEDUR, M.C.; NONES, K.; ALVES, H.J.; BERTANI, G.R. A importância do conhecimento do genoma para a produção de aves. In: Reunião Anual da

Sociedade Brasileira Zootecnia, Campo Grande. **Anais...** [on line]. Campo Grande: UFMT, 2004.

LIMA, E.F.; MOREIRA, J. de A.N.; BATISTA, F.A.S.; SILVA, O.R.R.F.da; FARIAS, F.J.C.; ARAÚJO, A.E. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.2, n.2, p.109-112, 1998.

M'PIGA, P.; BÉLANGER, R.R.; PAULITZ, T.C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicalislycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.50, 1997.

MALORNY, B.; LÖFSTRÖM, C.; WAGNER, M.; KRÄMER, N.; HOOFFAR, J. Enumeration of *Salmonella* Bacteria in Food and Feed Samples by Real- Time PCR for Quantitative Microbial Risk Assessment. **Applied and environmental microbiology** [online], v. 74, n. 5, p. 1299–1304, 2008.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, B. E.; ASSIS, P. M. S.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, P. R. A.; DONATO, S. T. M. V. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, vol. 1, p.89-111, 2004 .

MATA, G.M.S.C. **Comparação de métodos para pesquisa de Salmonella sp. e Listeria sp. e avaliação microbiana e físico-química em queijo minas artesanal**. 110 f. Dissertação (Magister Scientiae) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

MEDINA, J. C. **O Sisal**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Diretoria de Publicidade Agrícola, 286p, 1954.

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom- free cottonplants. **Phytopathology** 80, 808–811, 1990.

MURHERJEE, P. S.; SATYANARAYANA, K. G. Structure and properties of some vegetable fibres, part 1. Sisal fibre. **Journal of Materials Science**, v.19, p.3925-3934, 1994.

MUYZER, G. DGGE\TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 317-322, 1999.

NETO, P.C.S.P.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: interações com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, p 62-76, 2008.

NEWMAN, L.A.; REYNOLDS, C.M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.6-8, 2005.

NOLTE F.S.; CALIENDO A.M. Molecular detection and identification of microorganisms, p.234-256. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller

M.A. & Yolken R.H. (Eds), **Manual of Clinical Microbiology**. 8th ed. ASM Press, Washington, 2003.

OLIVEIRA, A. C.; VALLIN, M. A.; SEMIGHINI, C. P.; ARAÚJO, W. L.; GOLDMAN, G. H.; MACHADO, M. A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, 2002.

OLIVEIRA, M. L. A.; URQUIAGA, S.; BALDANI, I. J. Processos e mecanismos envolvidos na influencia de microrganismos sobre o crescimento vegetal. **Documentos 161, Embrapa**. Seropédica, Rio de Janeiro, 2003.

RUPPEL, S.; RUHLMANN, J.; MERBACH, W. Quantification and localization of bacteria in plant tissues using quantitative real-time PCR and on line emission fingerprinting. **Plant and Soil**, The Hague, v. 286, 2006.

SCHUSTER E, DUNN-COLEMAN N, FRISVAD J, VAN DIJCK P. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 59, Numbers 4-5, p. 426-435, 2002.

SECRETÁRIA DE COMÉRCIO EXTERIOR – SECEX. Exportações Brasileiras, 2009. Disponível em: [www2.desenvolvimento.gov.br](http://www2.desenvolvimento.gov.br) Acesso em: 17 de julho de 2009.

SILVA, M. C. A. **Quantificação da população de bactérias endofíticas em sisal por meio de PCR em tempo real**. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. p. 77-91, 2012.

SILVA, O. R. R. da. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 1999.

SILVEIRA, R. X. da. **Influência do resíduo líquido do sisal (*Agave sisalana* Perrine) sobre o desenvolvimento, in vitro, de nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos**. 2009. 85p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

SINDIFIBRAS. Estatísticas Nacionais – Exportação – sisal e derivados por Estados - 2006 / 2008. Disponível em: <http://www.brazilianfibres.com.br/>. Acesso em 19 jan 2011.

SOARES, A. C. F.; SALOMÃO, M. S.; ALMEIDA, N. de S.; PEREZ, J. O.; GARRIDO, M. da S. *Aspergillus niger* como agente causal de manchas foliares e podridão do pseudocaule do sisal. In: **XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Salvador, BA, 2006.

SOUZA FILHO, F.B.; SANTOS FILHO, H.P.; ROBBS, C.F. Etiologia da queima das folhas do coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.4, n.1, p.5-10, 1979.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 24, p. 487-506, 2000.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLOU, U.; Harper, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Products**, Washington, v. 67. p. 257-268, 2004.

STROPA, C. K. **Enumeração celular pela quantificação absoluta por pcr em tempo real de culturas de bradirrizóbios (Tese de mestrado).**

Universidade estadual paulista “Júlio de Mesquita Filho”. p.108, Jaboticabal, São Paulo, 2009.

TAGHAVI S. et al. Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting a Beneficial Effect on Growth and Development of Poplar Trees.

**Appl. Environ. Microbiol**, 748–757, 2009.

TURNER, S. PRYER, K. M.; MIAO, V. P. W.; PALMER, J. D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, p. 327-338, 1999.

ULRICH K. et al . Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. **FEMS Microbiol Ecol**. 169–180, 2008.

YU, Y. C. LEE, C, KIM, J, HWANG S. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic community es using quantitative real-time poly-merase chain rection. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 670-679, 2005a.

YU, Y. C. LEE, S.; HWANG. Analysis of community structures in anaerobic processes using a quantitative real-time PCR method. **Water Science & Technology**, v.52, p. 85-91, 2005b.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, N.; HARRIS, B.; FENG, Z.; KUEZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G.; VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2198-2208, 2002.