

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *Methylobacterium mesophilicum* ASSOCIADO À INTERAÇÃO COM A PLANTA HOSPEDEIRA

Adriana Freitas de Almeida¹; Aline A. Camargo Neves²;
Wellington Luiz de Araújo³;

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: adrianafreitas92@hotmail.com ¹

Estudante de Doutorado em Biotecnologia na Universidade de São Paulo; e-mail: aacn.bio@gmail.com ²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wellingtonluiz@umc.br ³

Área do Conhecimento: Biotecnologia.

Palavras-chave: *Methylobacterium*; Genes; Soja;

INTRODUÇÃO

Bactérias pertencentes ao gênero *Methylobacterium* são comumente encontradas em interação com plantas, seja da forma endofítica ou epifítica, onde já foram descritas na literatura colonizações em citros, soja, cana de açúcar, entre outros, foi descrito a expressão do gene *mxoF*, que está associado à atividade metilotrófica (DINI-ANDREOTE, 2011). Durante associação endofítica *Methylobacterium* spp. captam compostos de carbono e em troca, liberam biopolímeros, ácidos orgânicos, coenzimas, vitaminas e toxinas que ajudam no controle de patógenos (BALACHANDAR *et al.*, 2008).

Dentro deste gênero se encontra a bactéria *Methylobacterium mesophilicum*, que é constituída por bactérias fastidiosas, do tipo bacilo, gram-negativas de coloração rósea, com crescimento lento, possui motilidade pela presença de um a três flagelos em seus polos (AUSTIN; GOODFELLOW, 1979), e que apresenta a capacidade de colonizar diferentes plantas hospedeiras (DOURADO, 2010)

Diferentes grupos de genes estão envolvidos na interação da bactéria com o meio em que vive e outros organismos, o gene *phoU*, por exemplo, codifica a proteína phoU e esta relacionado com processo regulatório do fosfato, a virulência da bactéria, expressão de genes de estresse e produção de antibióticos (DOURADO, 2010), o gene *crtI* codifica a enzima fitoeno desaturase, sendo um dos responsáveis pela síntese carotenóides, além de estar relacionado à respostas à estresse e ao metabolismo da planta (DOURADO, 2010), o gene *patatin* codifica a glicoproteína patatina, que confere a bactéria uma maior interação com o hospedeiro, adaptação a vários ambientes e uma maior resistência durante a competição com outros microrganismos (DOURADO, 2010), o gene *sqhC* é responsável pela síntese de hopanóides através da codificação da enzima Esqualeno-Hopano Ciclase, tendo papel importante na adaptação celular das bactérias (LÓPES-LARA *et al.*, 2003).

A espécie *M. mesophilicum* apresenta grande importância agrícola, devido ao fato de colaborar com o crescimento da planta, entretanto seus mecanismos moleculares envolvidos na interação bactéria-planta não foram completamente elucidados, sendo assim idealizou-se este projeto com o intuito de obter uma maior compreensão destes na interação entre a bactéria endofítica *M. mesophilicum* e a planta hospedeira, o que pode ajudar de forma significativa no entendimento do papel desta bactéria no interior da planta hospedeira.

OBJETIVOS

Estudar a expressão dos genes *sqhC*, *patatin*, *phoU* e *crtI* de *M. mesophilicum* linhagem SR1.6/6 durante a interação com a planta hospedeira.

METODOLOGIA

Foi utilizada a linhagem SR1.6/6 de *Methylobacterium mesophilicum*, previamente isolada de *Citrus sinensis* (ARAÚJO *et al.*, 2002). Quando necessário esta bactéria foi cultivada em meio CHOI3 (TOYAMA *et al.*, 1998) a 28° C por até 96 horas.

O desenho dos *primers* para os genes alvo deste estudo foi realizado com base no genoma de *Methylobacterium radiotolerans* JCM2831 por meio do programa *Primer3* (v. 3.0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu>), os *primers* foram validados através da PCR e os amplicons avaliados em eletroforese em gel de agarose (1,2%) e posteriormente sequenciados pelo método de Sanger (Laboratório de Genômica, IB, USP). Posteriormente foram analisados por meio da ferramenta BLAST no sítio do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparar a similaridade destas sequencias com espécies contidas no banco de dados deste sítio e então, foi utilizado o programa Mega (v. 4.0.2.8) para a construção de dendrogramas.

Para estudo da interação com a planta hospedeira, plântulas de soja (*Glycine max*) foram obtidas de sementes gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Natal Antonio Vello do Departamento de Genética (ESALQ/ USP), germinadas e cultivadas *in vitro* sob condições axênicas por 6 dias, utilizando o meio de cultura Ágar-Água). Plântulas com aproximadamente 10 cm de altura foram transferidas para frascos contendo 20 mL de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e inoculadas com de 2 mL de suspensão bacteriana em meio de cultura TSB (Himedia®) (10^8 UFC mL⁻¹) de *M. mesophilicum*. E como controle, foi adicionado 2 mL de suspensão bacteriana em frascos contendo somente 20 mL de meio MS sem a plântula. Após inoculação das bactérias, as plântulas foram mantidas por 72 horas a 28°C com fotoperíodos (8/16 – escuro/claro) para posterior extração do RNA bacteriano. Para a extração do RNA, células bacterianas foram coletadas do meio de cultura líquido por centrifugação (30 minutos a 4000 g), e a partir do pellet bacteriano o RNA foi extraído (RiboPure®, Ambion). A integridade do RNA foi verificada em gel desnaturante de agarose 1,2% em tampão FA 10X, contendo formaldeído (0,7%) e brometo de etídio (0,3 mg.mL⁻¹ de gel) e comparação com o marcador de 2 Kb. Após a eletroforese o gel foi fotodocumentado em luz UV. O RNA também foi quantificado (DO₂₆₀) em NanoDrop ND-1000. Todo o material utilizado para a obtenção e tratamento de RNA foi esterilizado e/ou tratado com DEPC para eliminação de RNase. O RNA extraído foi convertido em cDNA a partir do kit SuperScript™ I First-Strand Synthesis System for RT-PCR da Invitrogen e partir deste será realizada a técnica de PCR em tempo real para a análise da expressão dos genes de interesse.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os *primers* para os genes *phoU*, *crtI* e *patatin*, haviam sido previamente desenhados por Dourado (2010), mas para os genes *crtI* e *patatin* apresentaram baixa similaridade com isolados do gênero de *Methylobacterium* e desta forma, foi necessário o desenho de novos primers através do programa *Primer 3*. Para o desenho dos primers (*crtI*, *patatin* e *sqhC*) e amplificação do gene *sqhC* de *M. mesophilicum* foi utilizado como base o genoma de *Methylobacterium radiotolerans* JCM2831, estes primers foram validados através de análises moleculares *in silico*, onde foi simulada uma reação de PCR e um sequenciamento, as sequencias obtidas foram avaliadas através da ferramenta BLAST.

As sequencias obtidas pelos primers *sqhC* e *phoU*, foram também analisadas no programa Mega (v. 4.0.2.8) do qual resultou em um dendrograma para cada gene e de

acordo com estes a linhagem SR1.6/6 utilizada no presente trabalho se apresenta no mesmo clado que *M. radiotolerans* e se agrupa com outras espécies do mesmo gênero, o que demonstra uma maior similaridade entre essas.

Quanto ao material vegetal, foi realizada a padronização das condições de cultivo para soja (*Glycine max*), o que permitiu um bom crescimento das plântulas.

A extração de RNA da suspensão bacteriana em interação ou não com a planta foi feita de forma satisfatória, resultando em amostras integras e puras de acordo com o gel desnaturante de agarose 1,2% em tampão FA, contendo formaldeído (0,7%) e brometo de etídio (0,3 mg.mL⁻¹ de gel. O RNA também foi quantificado por DO₂₆₀ em NanoDrop ND-1000, no qual apresentou uma boa relação da absorbância do comprimento de onda 260/280, próximo a 2, indicando que não havia impurezas no RNA total obtido, além de indicar a obtenção de 6 ug de RNA na amostra sem interação com a planta e 13 ug de RNA na amostra com interação com a planta. Embora a quantidade obtida seja suficiente para a realização das análises de PCR em tempo real, serão realizadas mais extrações para obtenção da ratificação do resultado final através de novas reações de PCR em tempo real. O RNA extraído foi convertido em cDNA e serão utilizadas em reações de PCR em tempo real para avaliação da expressão dos genes.

Em estudos anteriores, DOURADO (2010) estudou a expressão dos genes *crtI*, *phoU* e *patatin* de *M. mesophilicum* utilizando como planta hospedeira arroz e eucalipto, neste estudo foi observado que houve repressão da expressão do gene *crtI*, principalmente durante a interação com plantas de eucalipto e foi sugerido que a repressão desse gene nas condições avaliadas, está associada ao fato de que durante esta interação, a planta hospedeira não ativa o seu sistema de defesa e portanto, a bactéria não reconhece a planta como um ambiente estressante. Já a expressão do gene *patatin* não apresentou diferença significativa nas condições avaliadas, o que confirmou que *M. mesophilicum* é um endófito, não patogênico e que no interior da planta coloniza preferencialmente os espaços intercelulares, indicando que não apresenta atividade lipolítica, como ocorre em patógenos, assim como a expressão do gene *phoU* que também apresentou variação em sua expressão, mostrando que essa bactéria endofítica não expressa genes de virulência, confirmando assim como observado para o gene *patatin*, uma limitada capacidade de patogênese nas condições em que foram avaliadas.

O gene *sqhC* é responsável pela produção de hopanóides e em estudos de Dini-Andreote (2011) foi observada a ativação da expressão de genes relacionados a síntese de hopanóides na associação de *M. mesophilicum* com soja e sugeriu que este padrão está associado a adaptação da bactéria ao meio.

CONCLUSÕES

Os *primers* desenhados apresentaram boa amplificação dos genes de interesse e demonstraram haver uma alta similaridade entre a linhagem SR1.6/6 e *M. radiotolerans*. O RNA desta linhagem foi extraído com sucesso, sendo de boa qualidade e integro, porém ainda é necessária a extração de mais RNA para a ratificação da pesquisa.

A partir dos resultados que serão obtidos espera-se encontrar padrões de expressão que confirmem o papel destes genes na interação com a planta hospedeira, bem como os mecanismos envolvidos na colonização da planta por *M. mesophilicum* SR1.6/6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI-JR, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of Endophytic Bacterial Population and Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.10, p.4906-4914, Julho 2002.

AUSTIN, B.; GOODFELLOW, M. *Pseudomonas mesophilica*, a New Specie of Pink Bacteria Isolated from Leaf Surfaces. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, England, v.29, n.4, p. 373-378, Outubro 1979.

BALACHANDAR, D.; RAJA, P.; SUNDARAM, S. P. Genetic and Metabolic Diversity of Pink-Pigmented Facultative Methylophs in Phyllosphere of Tropical Plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, vol.39, n.1, p.68-73, Janeiro 2008

DINI-ANDREOTE, Francisco. **Análises genômica e transcriptômica de *Methylobacterium mesophilicum* SR1.6/6 em interação com a planta hospedeira.** 2011. 80 f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

DOURADO, Manuella Nóbrega. **Ecologia de *Methylobacterium* spp. na Planta Hospedeira.** 2010. 132 f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

LÓPEZ-LARA, I. M.; SOHLENKAMP, C.; GEIGER, O. Membrane Lipids in Plant-Associated Bacteria: Their Biosyntheses and Possible Functions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, vol.16 n.7, p.567-579, Junho 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, n.3, p.473-497, Julho 1962.

TOYAMA, H.; ANTHONY, C.; LIDSTROM, M.E. Construction of Insertion and Deletion mxa Mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 by Electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.166, n.1, p.1-7, Janeiro 1998.