

IDENTIFICAÇÃO DE GENES RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS EM *Bacillus amyloliquefaciens*

Cecilia Armesto, Fernando Pereira Monteiro, Flavio Henrique Vasconcelos de Medeiros, Carolina da Silva Perez, Erick Willy Weissenberg Batista & Camila Cassante de Lima

RESUMO

Bacillus amylolicifaciens tem potencial para redução da severidade de importantes doenças do feijoeiro, mas ainda pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais a bactéria exerce o controle da doença. A determinação dos mecanismos de controle da doença é importante para potencializar o controle. Estas bactérias endofíticas são intimamente relacionadas com a planta, uma vez no seu interior, as bactérias podem se comportar de diferentes maneiras, dependendo da fonte de nutriente disponível. Podem produzir uma série de diferentes compostos dentro da planta. Devido às interações destes compostos com moléculas estruturais das plantas, como a membrana celular, não se consegue quantificar lipopeptídeos dentro da planta, mesmo comprovando que a bactéria esteja presente em altas populações e proporcionando o controle da doença. Dentre as substâncias bioativas, os lipopeptídeos são os mais comumente relatados como moléculas associadas ao biocontrole, mas nenhum trabalho tem provado ainda o seu papel no controle biológico durante a colonização endofítica. Temos estudado a diversidade e abundância da produção de lipopeptídios por *Bacillus amylolicifaciens* ALB629, que produz *in vitro* surfactina, fengicina e iturina usando seiva ou exsudatos da raiz como substrato. Com mutações por inserção de transposon, pode-se tornar não funcionais, genes envolvidos na produção de lipopeptídios (surfactina, fengicina e iturina) principais moléculas relacionadas ao controle de fungos e bactérias) e, com isso, comprovar a essencialidade dos genes para o controle da doença. Portanto, o objetivo deste projeto será a transformação de *B. amylolicifaciens* inserido transposon aleatoriamente no genoma das bactérias inativando genes ao acaso, para perda de função de genes envolvidos na produção de lipopeptídeos para determinar a essencialidade dos genes no biocontrole da murcha de curto bacterium do feijoeiro, entre outras doenças.

Palavras-chave: Canamicina, feijoeiro, bactéria, controle biológico.

INTRODUÇÃO

Bacillus spp. é um gênero de bactérias presentes principalmente em solos cultivados. Este microorganismo pode atuar em diferentes ambientes exercendo forte influência na sua dinâmica. O uso industrial é vastamente empregado para a produção de algum metabólito através de cepas específicas. Na agricultura, tem sido empregado como agente de controle biológico. Dentro deste grupo, *Bacillus subtilis* é um dos procariontes mais conhecidos referentes à biologia molecular e celular, e por isso tornou-se um modelo para estudar procariontes. Formulações comerciais baseada em espécies do gênero *Bacillus* são de uso corrente na agricultura, empregados na proteção de plantas em vários patossistemas.

B. amyloliquefaciens estreitamente relacionado ao grupo *B. subtilis*, destaca-se pelo seu potencial aplicação na proteção de plantas. Esta bactéria possui diferentes mecanismos de ação, sendo que o antagonismo direto, a promoção de crescimento e indução de resistência, estão entre os mais comumente relatados. Entre as substâncias produzidas por espécies de *Bacillus* spp., os lipopeptídeos cíclicos são os principais responsáveis pelo controle biológico. Essa classe de metabólitos secundários é originada em função de uma cadeia de polipeptido, em geral, constituída por sete aminoácidos e um ácido graxo 3-hidroxil ou 3-amino, ligado em dois locais, formando uma estrutura cíclica (ROMANO et al. 2013). Essas moléculas são caracterizadas pela presença de péptidos ligados a ácidos graxo, sendo que os aminoácidos estão frequentemente dispostos numa estrutura cíclica.

Entre muitas moléculas produzidas pela biossíntese de lipopeptídio, surfactina, fengicina e iturina são os mais frequentemente estudados no controle biológico de fungos e bactérias. Sistemas complexos e quorum sensing regulam a biossíntese de lipopeptídio (DUTMAN et al, 2007). Como os lipopeptídeos são moléculas bioativas contra fungos e bactérias, estes determinam a dinâmica da população bacteriana, sendo dependente da diversidade e abundância dos lipopeptídeos presentes. Em geral, a expressão do gene que codifica para surfactina está associada com o aumento da densidade celular e ocorre na transição entre a fase estacionária de crescimento exponencial, enquanto que a biossíntese de fengicina e iturina ocorrem mais tarde na fase estacionária.

Uma vez que as bactérias benéficas colonizam as raízes, estas plantas podem obter benefícios a longo prazo como a promoção de crescimento (RICHARDSON et al., 2009), aumento da resistência a agentes químicos e danos físicos (PUNJA, 2001) e antagonismo direto contra fitopatógenos (YOSHIDA et al., 2001). Considerando o antagonismo contra fitopatógenos ainda não se tem a comprovação sobre como as moléculas produzidas dentro e fora da planta exerce o controle dos patógenos, já que existe uma dificuldade em isolar as moléculas produzidas na planta pelos métodos utilizados para detecção in vitro. Considerando os lipopeptídeos (surfactina, fengicina e iturina) produzidos por *Bacillus amyloliquefaciens* não foi possível detectar a presença destas moléculas em plantas previamente tratadas com esta bactéria. Mesmo sendo confirmado o controle da murcha-de-curtobacterium em plantas tratadas com a bactéria. Uma possível explicação para a dificuldade em detectar tais moléculas é a interação que os lipopeptídeos exercem com outras moléculas, uma vez dentro da planta, mudando a conformação original e conhecida destas moléculas.

Pensando nisso, a obtenção de mutantes defectivos para a produção de lipopeptídeos é uma alternativa promissora e viável para determinar a essencialidade destas moléculas no controle de doenças em plantas. Para a geração de mutantes defectivos para a produção de lipopeptídeos um Kit transposon Tn5 pode ser utilizado. Este transposon se insere aleatoriamente no genoma da bactéria interferindo na sequência de nucleotídeos, onde ele for inserido. A seleção dos mutantes é baseada na resistência a canamicina em decorrência de um gene funcional presente no transposon Tn5 (EPICENTRE, 2014). Uma vez que genes que codificam para produção de lipopeptídeos forem silenciados será possível esclarecer o modo de ação pela qual a bactéria promove o controle da doença. A inserção do gene é aleatória e para determinação do gene afetado pela mutação que está resultando na perda de função de controle da doença é usado o Cromosome walking em que o gene desconhecido é sequenciado a partir da sequência do transposon. Assim, o objetivo do trabalho foi comprovar a essencialidade de lipopeptídeos secretados *B.*

amyloliquefaciens no controle de doenças do feijoeiro e indentificar genes bacterianos que codificam para a produção de lipopeptídeos com características antimicrobianas.

METODOLOGIA

O tipo selvagem de *Bacillus amylolicefaciens* ALB629 utilizado no ensaio foi cultivado em ágar nutriente – AN (peptona 5 g, extrato de carne 3 g, 16 g ágar por litro) e preservadas em glicerol a -8°C.

O isolado foi cultivado em meio líquido durante 24 horas, após a cultura (10^8 células/mL) foi resfriada em água fria sob agitação em tubos falcon com 50 mL (por no mínimo 20 minutos). Estas foram centrifugadas por 15 minutos a 4000 g a 4 °C. Eliminou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 40 ml de água ultrapura. Este procedimento foi repetido por quatro vezes com a finalidade de eliminar as impurezas presentes na solução. Ao final da quinta repetição as células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol (10%) estéril e filtrado. Alíquotas de 40 µL foram transferidas para microtubos pré-resfriado por imersão em nitrogênio líquido, e armazenados em -80°C.

Células eletrocompetentes de *Bacillus amylolicefaciens* ALB629 foram obtidas seguindo a metodologia descrita por Andreote et al. (2004). Para realizar a transformação 50 µL de células eletrocompetentes foram misturadas com 1 µL do transposon EZ:TN <KAN-2> (EZ::TNTM <KAN-2> *Tnp Transposome*TM (Epicentre). O pulso utilizado foi de 2.0 kV por 5 ms. As células eletroporadas foram recuperadas em meio Soc e incubadas em agitador durante 60 min a 25°C. Após este período alíquotas de 100µL das células foram transferidas sem diluição e nas diluições de 1:10 e 1:100 em placas contendo meio nutriente-ágar adicionados de canamicina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Como controle foram utilizadas células eletrocompetentes sem a adição do transposon.

Para a extração do DNA os isolados crescidos em ágar nutriente por 24 h, depois desse período colônias de cada isolado foram transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo 90 µL de solução tampão de lise celular (0,05 M NaOH + 0,25% SDS) e incubados em bloco aquecedor (VHD MS-100) por 15 min a 97 °C, sob agitação de 1000 rpm. Posteriormente os microtubos foram centrifugados por 3 minutos a 10000 rpm em centrífuga (Herolab MicroCen 16) e 20 µL do sobrenadante contendo o DNA foram diluídos em 180 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM).

O procedimento para a amplificação consiste em duas rodadas de PCR. Uma primeira reação de PCR realizada no DNA genômico utilizando um iniciador biotilado específico de uma sequência conhecida no genoma juntamente com quatro iniciadores universais "caminhante" construídos com uma degenerescência parcial. Os produtos de PCR biotilados oriundos da primeira reação são imobilizados às pequenas partículas paramagnéticas ligadas a estreptavidina. Este passo remove todos os produtos de amplificação não específicos. Este modelo purificado é utilizado para o segundo PCR utilizando um primer (Nested primer) e um iniciador caminhante (walker primer) para aumentar a especificidade. Aproximadamente 50 ng da amostra de DNA genômico são usadas para o enriquecimento de fragmentos de DNA de interesse adjacentes a uma sequência conhecida (sequência do transposon inserida aleatoriamente). Os primers utilizados nesta reação são específicos para a região 5'-biotilada

complementar à região conhecida do DNA (sequência do transposon conhecida). As condições de PCR devem ser de 94°C durante 1 min, 47°C-50°C durante 1 min e 72°C durante 4 minutos por 30 ciclos.

A sequência do gene candidato para produção das moléculas bioativas é obtida utilizando iniciadores para a sequência conhecida (regiões flanqueantes da sequência de transposome Tn5). A sequência onde o transposon terá sido inserido será identificada no genoma completo da bactéria. As sequências obtidas serão analisadas usando a ferramenta BLAST para comparação com sequências já depositadas no GeneBank.

RESULTADOS

Apesar da reconhecida ação e eficácia da utilização de *Bacillus amylolicefaciens* no aumento do crescimento das plantas e na tolerância ao estresse abiótico/biótico, para o isolado 629 não foram obtidos mutantes resistentes a canamicina mesmo quando o experimento foi repetido quatro vezes.

Foram utilizadas diferentes concentrações de canamicina 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1%, e quando plaqueados na maior concentração (0,5 e 1%) não foi visualizado a formação de colônias. Quando plaqueados em menores concentrações foi possível visualizar o desenvolvimento de colônias bacterianas, porém quando transferidas posteriormente para placas com concentrações de 1% como recomendado no protocolo pelo fabricante do kit, as células não se desenvolviam, concluindo, que para as colônias observadas, não ocorrera a inserção do transposon, e sim que a concentração de canamicina aplicada não inibira o crescimento das células.

Uma possível razão para os resultados observados é que a parede de bactérias Gram positivas dificulta a transformação, pois a parede celular nestas, é quimicamente mais complexa, apresentando maior concentração de aminoácidos e lipídeos. Células bacterianas possuem competência natural de captar DNA exógeno e incorporá-lo ao genoma, sendo este fenômeno o responsável pela clonagem de genes e geração de mutantes em espécies de *B. subtilis*, por exemplo. A baixa competência demonstrada por várias cepas de *Bacillus* levou ao desenvolvimento de diversas estratégias focadas no aprimoramento para melhorar a eficiência de transformação. Entretanto, segundo Romero et al. (2006), a maioria dessas estratégias foi desenvolvida utilizando cepas de referência ou de coleta de cultura, bem adaptadas às condições laboratoriais, e nem sempre funcionam para cepas não domesticadas recalcitrantes à transformação. Consequentemente, tais cepas são frequentemente abandonadas em favor de outras relacionadas ou receptivas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREOTE, F., MORTATTI, M.J., DE SOUZA, A., MACCHERONI, W. J., AZEVEDO, J. L. ARAÚJO, W. L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. *Journal of Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 169-173, 2004.

DUITMAN, E. H.; WYCZAWSKI, D.; BOVEN, L. G.; VENEMA, G.; KUIPERS, O. P.; HAMOEN, L. W. (2007). Novel methods for genetic transformation of natural *Bacillus subtilis* isolates used to study the regulation of the mycosubtilin and surfactin synthetases. *Appl. environ. Microb.*, 73: 3490-3496. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02751-06>

Epicentre protocol. EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ Kit Cat. No. TSM99K2 Available in: <http://www.epibio.com>. Acesso em: 06/05/2015.

MIZUMOTO, S.; SHODA, M. Medium optimizatin of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 76, p. 101-108, 2007.

PUNJA, Z. K. (2001). Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens - a review of progress and future prospects. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 23, n. 3.

RICHARDSON, A. E.; BAREA, J. M.; MCNEILL, A. M.; PRIGENT-COMBARET, C. (2009). Acquisiton of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil*, v.321, p. 305-339.

ROMANO, A. et al. Antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO5A. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. 76, n. 11, p. 2019-2025, Feb. 2013.

ROMERO, D.; PÉREZ-GARCÍA, A.; VEENING, J.W.; DE VICENTE, A.; KUIPERS, O.P. Transformation of undomesticated strains of *Bacillus subtilis* by protoplast electroporation. *J Microbiol Methods*. 2006 Sep;66(3):556-9.

UREN, N. C. Types, amounts, and possible functions of compounds release into the rhizosphere by soil-grown plants. In *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic substances at the Soil-Plant Interface*; Eds. Pinton, R.; Z. Varanini; Nannipieri, P. p. 19-40. Marcel Dekker, Inc, New Youk, 2007.

YOSHIDA, S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, T.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. (2001). Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Biological Control*, v.91, n. 2, p. 181-187.