

Análise Genética por ARDRA-PCR da região ITS de *Bacillus* spp. obtidos de Solos da Região Oeste do Paraná

ANDERSON JOSÉ SCHERER¹; THAÍLS LUFT DA SILVA²; DEISI NAVROSKI³; RENAN JOSÉ CASAROTTO APPEL²; KAMILA KOCK⁴; DIVA DE SOUZA ANDRADE⁵; MARCO ANTONIO BACELLAR BARREIROS⁶; LUCIANA GRANGE⁷.

¹Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina – Colegiado de Tecnologia em Biotecnologia – 85950000 Palotina - Paraná - E-mail: anderson.j.scherer@gmail.com;

²Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina – Colegiado de Tecnologia em Biotecnologia

³Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina – Colegiado de Agronomia; ⁴ Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia; ⁵ Instituto Agronômico do Paraná; ⁶ Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina – Departamento de Biociências; ⁷ Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina – Departamento de Ciências Agronômicas.

RESUMO

O solo é habitat de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs). Dentre as mais estudadas, o Bacillus se destaca no controle de doenças do filoplano e de pós-colheita. O presente trabalho teve como objetivo analisar geneticamente bactérias do gênero Bacillus spp., nativas de solo sob diferentes manejos de cultivo e sistema natural da região oeste do Paraná, visando o reconhecimento de novas estirpes com potencial para agentes de biocontrole. Foram analisadas 25 estirpes utilizando a técnica de ARDRA-PCR da região intergênica (ITS) 16S-23S do rDNA empregando a clivagem com três endonucleases do tipo II. A distribuição das estirpes selecionadas foi bastante homogênea entre os agrupamentos formados indicando alta diversidade. O manejo de horticultura apresentou o maior número de representantes e o manejo agropastoril foi o que apresentou a maior diversidade.

Palavras-chave: *Bacillus* spp; solo; região ITS; ARDRA-PCR.

INTRODUÇÃO

O solo é um ambiente com enorme variabilidade de microbiota, vegetais (microflora) e animais das mais variadas dimensões. Dentre os principais micro-organismos presentes neste importante habitat estão as rizobactérias. As bactérias benéficas, conhecidas como promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) são residentes epifíticas, endofíticas, de vida livre, não patogênicas, que atuam na promoção de crescimento de forma direta, pela produção de fitormônios, solubilização de minerais e fixação biológica de nitrogênio, ou indireta, principalmente como agentes antagônicos no controle biológico de doenças e pragas de plantas cultivadas (MARIANO et al., 2004).

Dentre os antagonistas mais estudados, os *Bacillus* destacam-se no controle de doenças do filoplano e em pós-colheita e são um dos gêneros mais importantes encontrados no solo, principalmente os entomopatogênicos, que possuem a capacidade de produzir endósporos e toxinas, importantes no controle biológico de pragas agrícolas, além da capacidade de produção de antibióticos (MONTEIRO et al., 2012; FRITZ et al., 2010).

A capacidade de esporulação dos *Bacillus* é fator que os torna fortes candidatos ao desenvolvimento de produtos biotecnológicos como a produção de inoculantes comerciais (Lima, 2010). Neste contexto, as ferramentas moleculares vêm ganhando destaque e permitindo a identificação de um número cada vez maior de micro-organismos.

Dentre as técnicas de biologia molecular a análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) vem sendo bastante utilizada em estudos de espécies de rizobactérias. Essa técnica é baseada em padrões de restrição enzimática usando enzimas selecionadas com base na habilidade de revelar polimorfismo nos fragmentos de DNA analisados e no grau de conservação dos sítios de restrição do RNAr que reflete padrões filogenéticos, portanto, é uma técnica bastante útil para uma rápida análise de diversidade genética (COKMUS et al., 2012). No caso de análise de microdiversidade, que apresenta grupos de indivíduos com elevada afinidade genética, o fragmento amplificado deve incluir o espaço intergênico 16S-23S DNAr. Essa região intergênica apresenta maior variabilidade não só na sua composição de base como também no seu tamanho ao serem comparadas as suas regiões gênicas 16S ou 23S (REIS et al., 2006).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar geneticamente bactérias do tipo *Bacillus* spp, nativas de solos sob diferentes manejos de cultivo e sistema natural da região oeste do estado do Paraná, visando o reconhecimento de novas estirpes com potencial para agente de biocontrole.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas dos solos foram realizadas a partir de seis manejos (M) diferentes: soja 01 (M1), horticultura (M2), pastagem (M3), sistema agropastoril (M4), mata nativa (M5) e soja 02 (M6). Para o isolamento, foram pesadas 10 gramas de solo de cada repetição dos diferentes manejos de cultivo e diluídas em 90 mL de solução salina até a obtenção das diluições de trabalho 10^{-3} e 10^{-4} (VINCENT, 1970).

Os frascos contendo as diluições de trabalho foram submetidos a um choque térmico de 70°C por 10 min, para selecionar os micro-organismos pertencentes ao gênero *Bacillus*, que são resistentes a esse tratamento (BUCHANAN e GIBBONS, 1975). Posteriormente, foi efetuado o plaqueamento das amostras em triplicatas de 100 µL de cada diluição em meio específico, com posterior incubação por 48 horas em estufa a 28°C.

Para a extração de DNA utilizou-se o protocolo modificado de Sambrook et al. (2001). A pureza do DNA extraído foi verificada pela técnica de eletroforese em gel de agarose e a quantificação foi realizada utilizando o equipamento ScanDrop (Analytik Jena). A detecção da diversidade genética das estirpes foi realizada pela técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) amplificando fragmentos gênicos através do uso dos *primers* FA-16S (5' GGCTGGATCACCTCCTTCT '3) e RC-23S (5' CCGGGTTTCCCCATTCGG '3) para obtenção das regiões intergênicas (ITS) 16S-23S do rRNA (NAVARRO, 1992).

Na restrição por ARDRA, o produto da PCR obtido foi clivado com endonucleases do tipo II. As enzimas utilizadas na restrição foram a Eco RI 10 U/µL, Nde I 5U/µL e Pst I 10U/µL. Ambos os produtos de PCR e ARDRA-PCR foram separados por eletroforese a 100V por 1 hora, em um gel de agarose 2,0 % diluído em tampão TBE 1X pH 8,0.

Os produtos da restrição foram analisados pelo programa BioNumerics (Applied Maths, Versão 7.1), utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) que se baseia na média das distâncias entre os perfis eletroforéticos, e o coeficiente de similaridade Jaccard, que compara o número de bandas semelhantes entre si com o número total de bandas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de 208 isolados agrupados por tipagem morfológica, foram selecionados 25 indivíduos (Figura 1) para serem submetidos à técnica de ARDRA-PCR. As estirpes foram agrupadas pelo programa BioNumerics, utilizando o índice de Jaccard, com similaridade de 80%, formando um total 12 grupos.

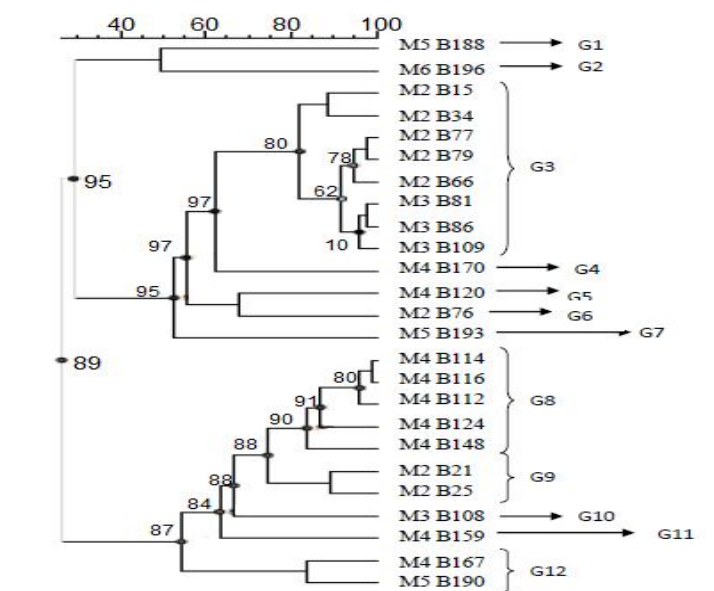


FIGURA 1. Dendrograma construído com 25 isolados a partir de diferentes manejos de cultivo, obtidos pela análise de agrupamento dos produtos de restrição por ARDRA-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

O manejo sob sistema agropastoril (M4) obteve maior número de perfis distribuídos entre os grupos, estando presente em 5 destes, seguido do sistema de horticultura (M2) com os isolados distribuídos entre 3 grupos diferentes. O grupo 3 foi o que apresentou maior número de indivíduos, oito no total, com isolados advindos dos manejos M2 e M3. O segundo maior grupo foi o G8, com cinco representantes, todos pertencentes ao sistema agropastoril (M4).

A colonização da rizosfera depende muito da habilidade da bactéria em utilizar os diferentes exsudatos radiculares. Os compostos secretados pelas raízes das plantas servem como importantes atrativos químicos e repelentes na rizosfera (BAIS *et al.*, 2001). Através da exsudação de uma vasta variedade de compostos, as raízes podem regular a comunidade microbiana do solo na sua vizinhança imediata (NARDI *et al.*, 2000).

A metodologia de ARDRA tem sido aplicada para diversos estudos de diversidade microbiana, principalmente de micro-organismos associados a vegetais ou a diferentes solos

(LAGACE et al., 2004). Muitos estudos vêm utilizando com sucesso o método de ARDRA-PCR para identificar importantes espécies do gênero *Bacillus* spp. (CRUZ et al., 2001; CIHAN, A.C.; 2012).

CONCLUSÕES

A técnica de ARDRA-PCR da região intergênica 16S-23S do rDNA foi eficiente no estudo de diversidade intra-específica. O manejo sob sistema agropastoril foi o que apresentou maior diversidade, seguido pela mata nativa, o que apontou para a importância da presença do exsudatos como moléculas sinalizadora para seleção da comunidade rizosférica. Os resultados obtidos apontaram para o sistema agropastoril (M4) como sendo um sistema conservacionista do ponto de vista da diversidade morfo-genética realizada até então neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BAIS, H. P.; LOYOLA, V. M. V.; FLORES, H. E.; VIVANCO, J. M. Root specific metabolism: the biology and biochemistry of underground organs. In vitro Cell Dev Biol Plant, vol. 37, p. 730–741, 2001.
- BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. G. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8.ed. Baltimore: The Williams & Wilkens, 1268 p., 1975.
- COELHO, L. F. In: Interação de *Pseudomonas* spp. e de *Bacillus* spp. com diferentes rizosferas. IAC – Instituto Agrônomo. Campinas – SP. 2006.
- COKMUS, C.; CIHAN, A. C.; TEKIN, N.; Ozcan B. The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ARDRA analyses isolated from geothermal regions of turkey. Brazilian Journal of Microbiology. p.309-324, 2012.
- CRUZ, L. M.; DE SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F. D. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). Applied and Environmental Microbiology, Washington, vol. 67, n. 5, p. 2375-2379, 2001.
- FRITZ, L. L.; BERLITZ, D. L.; MACEDO, V. R. M.; MACHADO, V.; FIUZA, L. M. Frequência de *Bacillus* spp. em solos de diferentes sistemas de cultivo de arroz irrigado em Cachoeirinha, RS. Bragantia, Campinas, vol. 69, n. 2, p. 405-412, 2010.
- LAGACE, L.; PITRE, M.; JACQUES, M.; ROY, D. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. Applied and Environmental Microbiology, Washington, vol. 70, n. 4, p. 2052-2060, 2004.
- LIMA, F. F. DE. *Bacillus subtilis* e níveis de nitrogênio sobre o desenvolvimento e a produtividade do milho. Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Teresina, PI. 2010.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma, vol. 1, p.89-111, 2004.
- MONTEIRO, A. L. R.; CAMPOS NETO, J. R. M.; BITU, P. I. M.; ROZARIO, W. C.; OLIVEIRA, L. J. M. G.; RODRIGUES, A. A. C. Potencial antagonista de *Bacillus* spp. sob diferentes métodos de avaliação in vitro no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Tropical Plant Pathology, vol. 38, agosto 2012.
- NARDI, S.; CONCHERI, G.; PIZZEGHELLO, D.; STURARO, A.; RELLA, R.; PARVOLI, G. Soil organic matter mobilization by root exudates. Chemosphere, vol. 5, p. 653–658, 2000.
- NAVARRO, E.; SIMONET, P.; NORMAND, P.; BARDIN, R. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* sp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. Arch. Microbiol. vol. 157, p. 107–115, 1992.
- REIS JUNIOR, F. B. dos; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. Pesq. agropec. bras., Brasília, vol. 41, n. 3, p. 431-438, 2006.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- VINCENT, J. M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell, 164p, 1970.