

Identificação molecular e diversidade genética de bactérias solubilizadoras de fósforo

Ubiraci Gomes de Paula Lana^(1,2); Eliane Aparecida Gomes⁽³⁾, Amanda Nayê Guimarães Tavares⁽⁴⁾; Júlia Leles⁽⁴⁾; Christiane Abreu de Oliveira Paiva⁽³⁾; Ivanildo Evódio Marriel⁽³⁾

(1) Analista de Pesquisa; Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas, MG; ubiraci.lana@embrapa.br; (2) Professor; Centro Universitário de Sete Lagoas - UNIFEMM; (3) Pesquisador, Embrapa Milho e Sorgo; (4) Bolsista FAPEMIG, Faculdade Ciências da Vida.

RESUMO: O fósforo (P) é um dos elementos essenciais na nutrição de plantas, sendo um fator determinante na produtividade agrícola. Embora os solos contenham geralmente uma grande quantidade de P, apenas uma pequena proporção está disponível para absorção pelas plantas. Assim, microrganismos são alternativas para substituição total ou parcial de insumos químicos, permitindo o aproveitamento, pelas plantas, do P insolúvel do solo ou adicionado na forma de fosfatos de rocha. Estudos anteriores realizados na Embrapa Milho e Sorgo isolaram microrganismos endofíticos e da rizosfera de milho eficientes na solubilização de P do solo. O objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar a diversidade filogenética de dez estirpes de bactérias eficientes na solubilização de P por sequenciamento do gene 16S rDNA e BOX-PCR. A análise filogenética permitiu a identificação e diferenciação do isolados que pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Ochrobactrum*. As bactérias solubilizadoras de P apresentam alta diversidade genética e podem ser diferenciadas pelo sequenciamento da região 16S rDNA e análise por BOX-PCR. A maioria dos microrganismos eficientes na solubilização de P caracterizados neste trabalho são do gênero *Bacillus*.

Termos de indexação: Solubilizadores de P, caracterização molecular, diversidade genética.

INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é o segundo nutriente mais limitante no desenvolvimento das plantas, afetando drasticamente o rendimento de grãos. Embora os solos contenham geralmente uma grande quantidade de P total, apenas uma pequena proporção está disponível para absorção pelas plantas, principalmente como íon ortofosfato (Tinker & Nye, 2000). Em condições tropicais, a precipitação e a fixação de P são os principais responsáveis pela baixa eficiência dos fertilizantes fosfatados solúveis. Até 80% do fertilizante pode ser complexado com íons Fe, Al, e Ca presentes no solo, o que impede sua absorção pelo sistema radicular (Novais & Smyth, 1999). O uso de

microrganismos consiste numa importante estratégia para melhorar a eficiência no aproveitamento de P do solo pelas plantas (Khan et al., 2007). Atualmente, a Embrapa Milho e Sorgo possui um banco de microrganismos funcionais, incluindo cepas endofíticas e presentes na rizosfera de milho eficientes na solubilização de P. Dessa forma, a caracterização molecular e filogenética de bactérias nativas de solos brasileiros torna-se importante para a recomendação de estirpes que poderão ser utilizadas como inoculantes nos sistemas de produção agrícola.

O objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar a diversidade filogenética de dez estirpes de bactérias eficientes na solubilização de P.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas e condições de cultura

As cepas bacterianas rizosféricas B30K, B32, B70, B116, B119 e endofíticas 1920, 1923, 1940, 2084 e 2088, pertencentes ao banco de microrganismos funcionais da Embrapa Milho e Sorgo foram previamente selecionadas com base na alta eficiência de solubilização de fontes de P. Colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio LB e crescidas à 28°C por 48 h com agitação de 150 rpm. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min, o sobrenadante descartado e adicionado 1 mL de NaCl 0,8% (m/v). As amostras foram centrifugadas e o precipitado ressuspenso em 567 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8,0).

Extração de DNA

Para isolamento do DNA genômico foram adicionados 30 µL de SDS 10% (m/v) e 3 µL de proteinase K 20 mg/mL. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por uma hora. Foram adicionados 100 µL de NaCl 5 M e 80 µL de solução de CTAB/NaCl (CTAB 100 mg/mL e NaCl 0,7 mol/L) e as amostras agitadas e incubadas a 65°C por 10 min. Em seguida, foram adicionados 600 µL de clorofórmio/octanol (24:1), as amostras homogeneizadas por 15 min e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi

transferido para outro microtubo contendo 600 µL de isopropanol 99% (v/v) gelado. As amostras foram centrifugadas e o precipitado lavado com 1 ml de etanol 70% (v/v). Os tubos foram centrifugados por 5 min a 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o etanol residual retirado em centrífuga a vácuo por 5 minutos. Ao final o precipitado foi ressuspensionado em 50 µL de tampão TE com RNase (Tris-HCl 10 mM; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 µg/µL RNase A).

Amplificação e clonagem do gene 16S rRNA

Para identificação molecular das cepas, o gene 16S rDNA foi amplificado utilizando os primers 8F e 1492R (Galkiewicz & Kellogg, 2008). A reação de PCR foi constituída por 30 ng de DNA, 0,4 µM de cada primer, 2 µL de tampão de reação 10 X, 3 mM de MgCl₂, 0,125 mM de dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA) em 20 µL. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação a 95°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 2 min, e alongação final de 72°C por 5 min, mantendo a reação a 10°C. Em seguida, 5 µL do produto da reação de PCR com GelRed (Biotium, Leuven, Belgium) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) a 100 V.

Para clonagem, 3 µL do produto da reação foram misturados com 1 µL de vetor pGEM-TEasy (Promega, Madison, USA), 5 µL de tampão de ligação e 1 µL de T4 DNA ligase (10 U/µL). A reação foi incubada a 4°C por 16 h. Cinco µL da reação de ligação foram utilizados na transformação de *E. coli* DH5α por choque térmico (Sambrook et al., 2001). Os clones contendo o inserto de interesse foram confirmados a partir de PCR de colônias de acordo com as condições de amplificação anteriormente descritas. A extração do DNA plasmidial foi realizada com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) a partir das colônias crescidas em meio de cultura LB com ampicilina (100 µg/mL) a 37°C por 16 h.

Sequenciamento do gene 16S rRNA

As reações de sequenciamento foram preparadas com 100 ng do DNA plasmidial; 0,5 µL de Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA); 1,75 µL do tampão de sequenciamento 5X e 5 pmols de primer, em 10 µL, utilizando primers M13 (Promega, Madison, USA) e específicos para o gene 16S rDNA: 8F, 515F, 902R, 1492R (Galkiewicz & Kellogg, 2008). As reações foram submetidas a 96°C por 20 seg, 50°C por 15 seg, 60°C por 4 min, por 30 vezes, mantendo a reação a 10°C. Em seguida, 5 µL de EDTA 125 mM e 60 µL de etanol absoluto foram adicionados, as amostras incubadas por 20 min no escuro e centrifugadas por 45 min a 4.000 rpm, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 60 µL de etanol

70 % (v/v), sendo os microtubos centrifugados a 4.000 rpm 10 min, o sobrenadante removido e as amostras secas à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foram ressuspensionadas em 10 µL de formamida (Applied Biosystems), desnaturadas a 95°C por 5 min e injetadas no equipamento ABI3500XL (Applied Biosystems). As sequências foram analisadas com como o software Sequencher 5.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, EUA) e comparadas com o banco de dados público *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio da ferramenta blastn (Altschul et al., 1997).

BOX PCR

Para a análise de diversidade filogenética as reações de PCR foram constituídas num volume de 20 µL com 50 ng de DNA, 2 µL de tampão 10X, MgCl₂ 2 mM, 0,125 mM de dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerase (Kapa Biosystems, Boston, USA) e 0,5 µM do primer BOX1R (Versalovic et al., 1994). As condições de amplificação foram 95°C por 3 min, 40 ciclos de 94°C por 1 min, 45°C por 1 min e 72°C por 3 min, alongação final de 72°C por 10 min, mantendo a reação a 10°C. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) for 1 h a 100 V, corado com GelRed (Biotium, Leuven, Belgium) e fotografado no equipamento L-Pix Imagem (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil).

Análise estatística

Análise de agrupamento baseada no gene 16S rDNA foi realizada utilizando-se o programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 7.0.14 com modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-Joining e bootstrap com 1.000 repetições. Os perfis de DNA obtidos por BOX-PCR foram analisados pelo software Bionumerics 6.1 (Applied Maths, St. Martens-Latem, Bélgica), com UPGMA, coeficiente de Jaccard e tolerância de 1%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primes para amplificação da região do gene 16S rDNA foram utilizados na identificação molecular de bactérias. Um fragmento de aproximadamente 1,4 kb foi amplificado e sequenciado em todas as 10 cepas eficientes na solubilização de P, permitindo a identificação dos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Ochrobactrum* (**Tabela 1**).

Para determinar o relacionamento genético das bactérias, foi realizada uma análise de agrupamento baseada nas sequências do 16S rDNA. As cepas B30K, B32, B70, B116, B119, 1920, 1923, 1940, 2084 e 2088 foram comparadas e agrupadas com microrganismos da mesma espécie depositados no Genbank (**Figura 2**). Foi observada uma elevada diversidade genética entre as cepas eficientes na solubilização de P.

Os resultados apresentados pela análise dos perfis de DNA por BOX-PCR reforçam essas

evidências (Figura 3). Considerando uma similaridade de 25%, três grupos podem ser observados. O grupo I foi formado pela cepa B32 (*Bacillus*), o grupo II caracterizado pelas cepas 1923, 1920, 2084 e B116, todas identificadas como *Bacillus* e o agrupamento III composto pelas cepas B119, B30K, 2088, 1940 e B70, de diferentes espécies. As cepas 1920 e 2084, *Bacillus subtilis* apresentaram perfis semelhantes com o BOX-PCR.

Diversos trabalhos têm relatado o aumento do crescimento de plantas e absorção de nutrientes em milho a partir da inoculação com microrganismos solubilizadores de P sob condições de casa de vegetação ou campo (Hameeda et al., 2008; Kumar et al., 2007). Entre a grande diversidade de bactérias com efeitos positivos, incluem-se espécies dos gêneros *Pseudomonas* (Kaur & Reddy, 2015) e *Bacillus* (Hameeda et al., 2008). Segundos tais autores, a maioria desses microrganismos promoveu efeitos significativamente positivos sobre o rendimento de grãos, peso seco total e conteúdo de P em plantas de milho.

Assim, os microrganismos caracterizados neste trabalho têm potencial para o desenvolvimento de biofertilizantes de baixo custo de forma a possibilitar uma diminuição da utilização de fosfatos solúveis, além de permitir a manutenção da produtividade das culturas de uma forma mais econômica e ambientalmente sustentável.

CONCLUSÕES

As bactérias solubilizadoras de P apresentam alta diversidade genética e podem ser diferenciadas pelo sequenciamento da região 16S rDNA e análise por BOX PCR. Os microrganismos mais eficientes na solubilização de P caracterizados neste trabalho pertencem ao gênero *Bacillus*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Embrapa e Fapemig pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. "Basic local alignment search tool." *Journal of Molecular Biology*, v.215, p.403-410, 1990.
- GALKIEWICZ J. P., KELLOGG, C. A. Cross-kingdom amplification using bacteria-specific primers: complications for studies of coral microbial ecology. *Applied and Environment Microbiology*, v.74, p.7828-7831, 2008.
- HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O.P.; WANI, S. P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research*, v.163, p.234-242, 2008.
- KAUR, G.; REDDY, M.S. Effects of Phosphate-Solubilizing Bacteria, Rock Phosphate and Chemical Fertilizers on Maize-Wheat Cropping Cycle and Economics. *Pedosphere*, v.25, p.428-437, 2015.
- KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable Agriculture - a review. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 27, p.29-43, 2007.
- KUMAR, B.; TRIVEDI, P.; PANDEY, A. *Pseudomonas corrugate*: A suitable bacterial inoculant for maize grown under rainfed conditions of Himalayan region. *Soil Biology & Biochemistry*, v.39, p.3093-3100, 2007.
- NOVAIS, R.F.; SMYTH, T. J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa, MG, **Universidade Federal de Viçosa**, 1999. 399p.
- SAMBROOK, J.; Russel D. W. Molecular cloning. p. 9.16 - 9.17. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, NY. 2001.
- TINKER, P. B.; NYE, P. H. Solute movement in the rhizosphere. New York: **Oxford University Press**, 2000.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cell Biology*, v.5, p.25-40, 1994.

Tabela 1. Identificação molecular de bactérias solubilizadoras de P.

Cepa	16S rDNA (pb)*	Espécie	E-value	Identidade (%)	GeneBank
B30K	1499	<i>Burkholderia cepacia</i>	0	99	AB695353.1
B32	1512	<i>Bacillus</i> sp.	0	99	JX566648.1
B70	1477	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	95	FJ227280.2
B116	1487	<i>B. cereus</i>	0	99	AB480773.1
B119	1498	<i>P. aeruginosa</i>	0	99	DQ115539.1
1920	1454	<i>B. subtilis</i>	0	99	JN366718.1
1923	1510	<i>B. subtilis</i>	0	98	DQ993674.1
1940	1519	<i>Bacillus</i> sp.	0	99	JX566650.1
2084	1516	<i>B. subtilis</i>	0	99	JN587510.1
2088	1524	<i>Ochrobactrum pituitosum</i>	0	98	NR_115043.1

* Tamanho sequenciado em pares de pares.

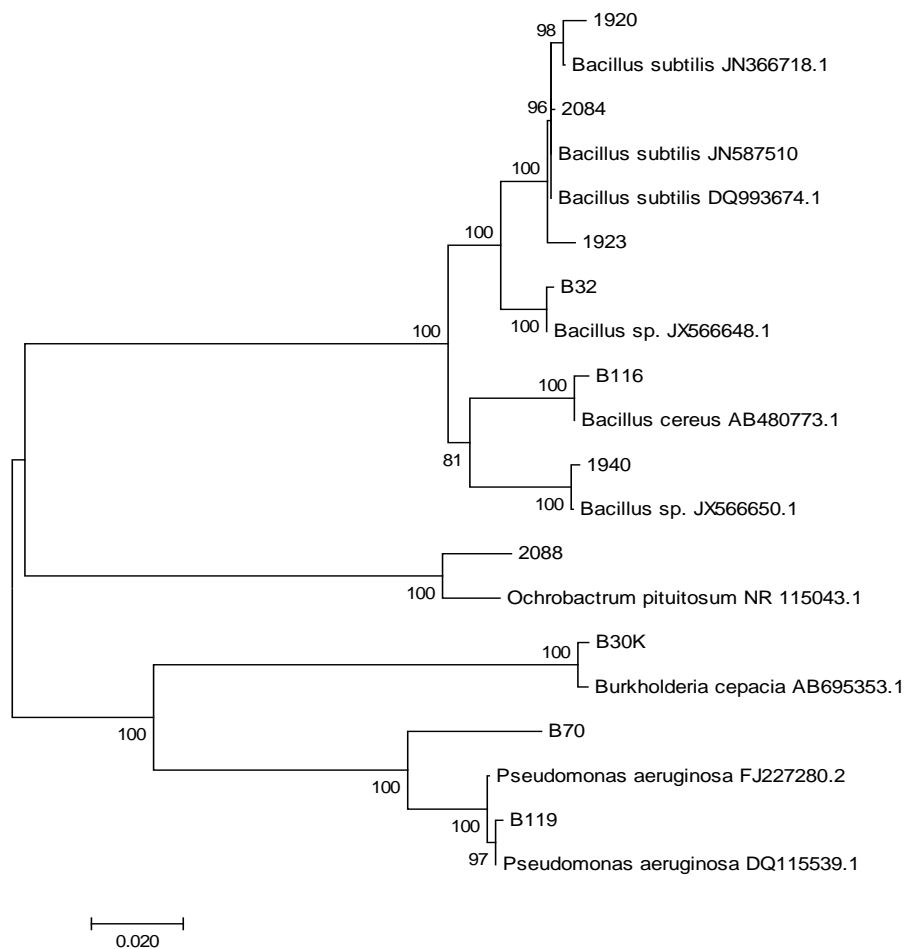


Figura 1. Análise de agrupamento baseada no sequenciamento do 16S rDNA. A árvore foi construída utilizando-se o programa MEGA 7.0.14 e analisada segundo o modelo de distância K2P e algoritmo Neighbor-joining com bootstrap de 1000 repetições. A barra horizontal indica o valor de substituições por sítio.

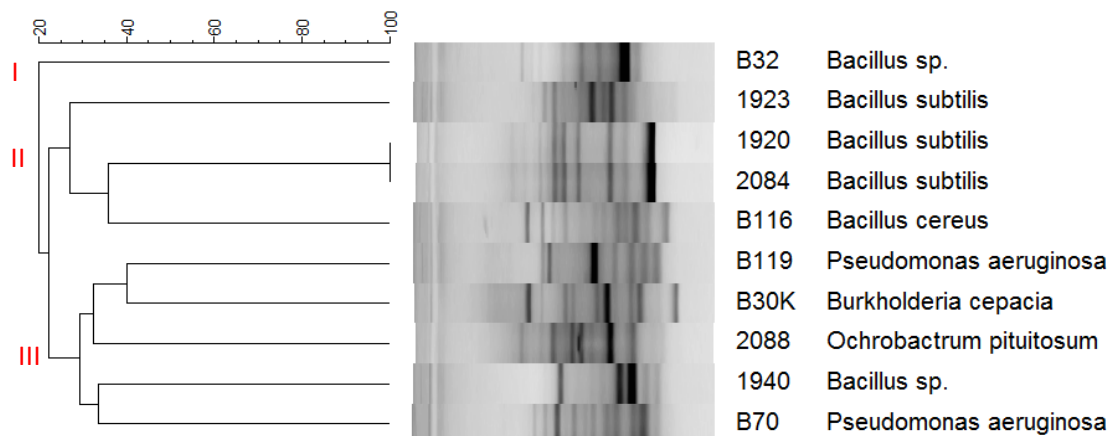


Figura 2. Dendrograma baseado no *fingerprinting* obtido por meio da metodologia de BOX-PCR. Os *clusters* foram obtidos pelo programa Bionumerics 4.6. Para a análise de agrupamento foi utilizado o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.