

Caracterização Molecular de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal Isoladas de Milho por Meio da Amplificação do Gene *nifH* perfis de ARDRA

Molecular characterization of plant growth promoting bacteria from maize by amplification of *nifH* gene and ARDRA profiles

*Thaise Rosa da Silva*¹, *Katherine Gomes de Oliveira*¹, *Tailane Ribeiro do Nascimento*², *Maria Idaline Pessoa Cavalcanti*³, *Ana Carla Resende Fraiz*⁴, *Paulo Ivan Fernandes Júnior*⁵

Resumo

Há poucas informações a respeito da diversidade e do potencial biotecnológico dos micro-organismos do solo no Semiárido, em especial daqueles envolvidos com processo de fixação biológica de nitrogênio. O objetivo deste trabalho foi determinar a diversidade de uma coleção de bactérias associadas ao milho (*Zea mays* L.) em solos do Semiárido. As bactérias foram avaliadas quanto à amplificação de um fragmento do gene *nifH* por meio de PCR e pela técnica de ARDRA. Dentre as 72 bactérias testadas, 47 foram considerados *nifH*

¹Estudante de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), bolsista PIBIT - CNPq/Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. ²Estudante de Ciências Biológicas, UPE, bolsista PIBIC - Facepe/Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

³Engenheira-agrônoma, M.Sc. em Ciências Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, PB.

⁴Bióloga, D.Sc. em Fisiologia Vegetal, Bolsista PNPd/Capes, Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), Petrolina, PE. ⁵Biólogo, D.Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br.

positivos e a análise dos perfis de ARDRA mostrou que o local de origem dos isolados foi fator determinante para o agrupamento das bactérias.

Palavras chave: fixação biológica de nitrogênio, promoção de crescimento, inoculante.

Introdução

Existem bactérias que são capazes de melhorar o crescimento das plantas e protegê-las de estresses abióticos e bióticos por meio de diversos mecanismos de ação como a fixação biológica do N, disponibilização de nutrientes insolúveis, controle de fitopatógenos, dentre outros. Dentre as famílias botânicas de não leguminosas, a família das gramíneas (Poaceae) é a mais bem estudada e com grande número de bactérias isoladas em diversos estudos ao redor do mundo nos últimos 60 anos (BALDANI et al., 2014).

O estudo de diversidade de bactérias de gramíneas têm revelado associações com potenciais de exploração para a produção de biofertilizantes, podendo substituir parcialmente a utilização de fertilizantes químicos, principalmente os nitrogenados. A capacidade do milho (*Zea mays* L.) em estabelecer relações rizosféricas e/ou endofíticas com vários gêneros bacterianos têm sido documentada ao longo dos últimos anos (BALDANI et al., 2014; SILVA et al., 2016). Entretanto, poucos resultados foram obtidos para a região semiárida do Brasil e estudos focando a obtenção de novos isolados nesta região, podem revelar bactérias com potencial biotecnológico para a produção de inoculantes mais eficientes para o Semiárido.

A avaliação da diversidade de micro-organismos promotores de crescimento vegetal é uma etapa fundamental do processo de seleção de bactérias com potencial biotecnológico. A amplificação de genes simbióticos é uma abordagem inicial que pode reduzir o quantitativo das bactérias que serão avaliadas nas etapas posteriores, com vistas de reduzir o tempo e os recursos empregados por meio da seleção de micro-organismos que são, putativamente, mais eficientes para a promoção do crescimento vegetal (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013).

Do ponto de vista da biodiversidade, a técnica de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) é de baixo custo e de fácil execução, sendo capaz de agrupar os isolados de acordo com suas características filogenéticas e podendo ser utilizada para grandes coleções a fim de selecionar isolados bacterianos para avaliações mais dispendiosas e laboriosas (LIMA et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de genes *nifH* em bactérias isoladas de milho, bem como avaliar a diversidade genética dos isolados *nifH* positivos por meio da técnica de ARDRA.

Material e Métodos

Neste trabalho foram avaliadas 72 bactérias diazotróficas isoladas de plantas de milho das variedades BRS Caatingueiro e BRS Gorutuba cultivadas nos Campos Experimentais de Bebedouro (42) e Mandacaru (30), nas dependências da Embrapa Semiárido (CAVALCANTI, 2016). Os isolados bacterianos utilizados estão depositadas na Coleção de Culturas de Micro-Organismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido.

As bactérias foram reativadas em meio de cultura Dyg`'s líquido e a extração do DNA foi realizada pelo método de lise celular por choque térmico com fervura e congelamento (FERNANDES JÚNIOR et al., 2013). Os isolados bacterianos que apresentaram capacidade de formação de película em meio semissólido foram avaliados quanto à presença do gene *nifH*, que codifica a enzima dinitrogenase redutase do complexo enzimático nitrogenase, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

A PCR para o fragmento do gene *nifH* foi realizada com o mix contendo tampão de reação 1X; 2,5 mM MgCl₂; 1,2 dNTP mM; 1,0 U Taq DNA polimerase e 1,0 μM de cada iniciador PolF e PolR de acordo com a metodologia adaptada por Fernandes Júnior et al. (2013). Para os isolados que não apresentaram resultados positivos para a amplificação do gene *nifH*, foi realizada a técnica de Nested-PCR. A primeira reação foi conduzida para o gene *nifH* como descrito acima. Para a segunda reação, utilizou-se um par de oligonucleotídeos iniciadores para *nifH* (SOARES et al., 2006). A reação de Nested-PCR e o ciclo de amplificação foram realizados da mesma forma descrita acima, diferindo-se apenas pela utilização de 0,35 μL do produto da primeira PCR como molde. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% a 100 V por 120 minutos.

Os isolados selecionados por meio da amplificação de um fragmento do gene *nifH* tiveram a variabilidade genética avaliada por ARDRA. Primeiramente foi amplificado o gene para a subunidade ribossomal 16S rRNA com os iniciadores universais 27F e 1492R. Os produtos foram digeridos utilizando-se as endonucleases *HinfI*, *HhaI* e *MspI*. O meio de reação para a restrição enzimática foi constituído de 10 μ L do produto da PCR do gene 16S rRNA, 2 μ L do tampão de reação da enzima e 2 μ L da enzima de restrição. A reação de digestão foi incubada a 37 °C por 16 horas. O DNA digerido foi analisado em eletroforese conforme descrito acima.

As imagens dos géis foram analisadas com o auxílio do programa BioNumerics v 7.0. Após a padronização das imagens, os dendrogramas de similaridade foram construídos utilizando-se o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Dice.

Resultados e Discussão

Dos 72 isolados, 47 (33 da área de Mandacaru e 14 de Bebedouro) amplificaram o gene *nifH* na reação de Nested-PCR, como é possível se observara para alguns dos isolados na Figura 1. Os isolados que cresceram em meio semissólido são potencialmente diazotróficos por apresentarem a capacidade de formar película em condições microaerofílicas (BALDANI et al., 2014).

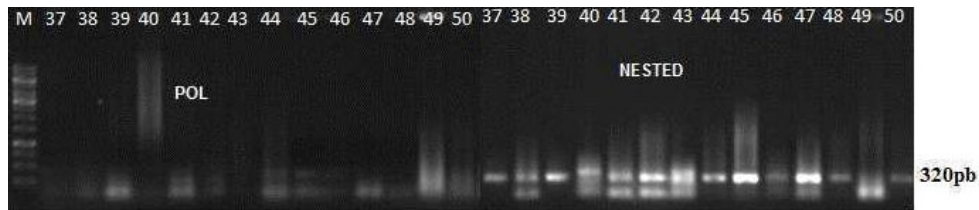


Figura 1. Amplificação do gene *nifH* com os iniciadores PolF e PolR na primeira reação e *nifHF* e *nifHR* (nested) de isolados de bactérias crescidas em meio semissólido.

As bactérias que apresentaram amplificação do gene *nifH* foram avaliadas quanto à sua variabilidade genética por meio da técnica de ARDRA com o emprego das endonucleases *HinfI*, *HhaI* e *MspI* (Figura 2).

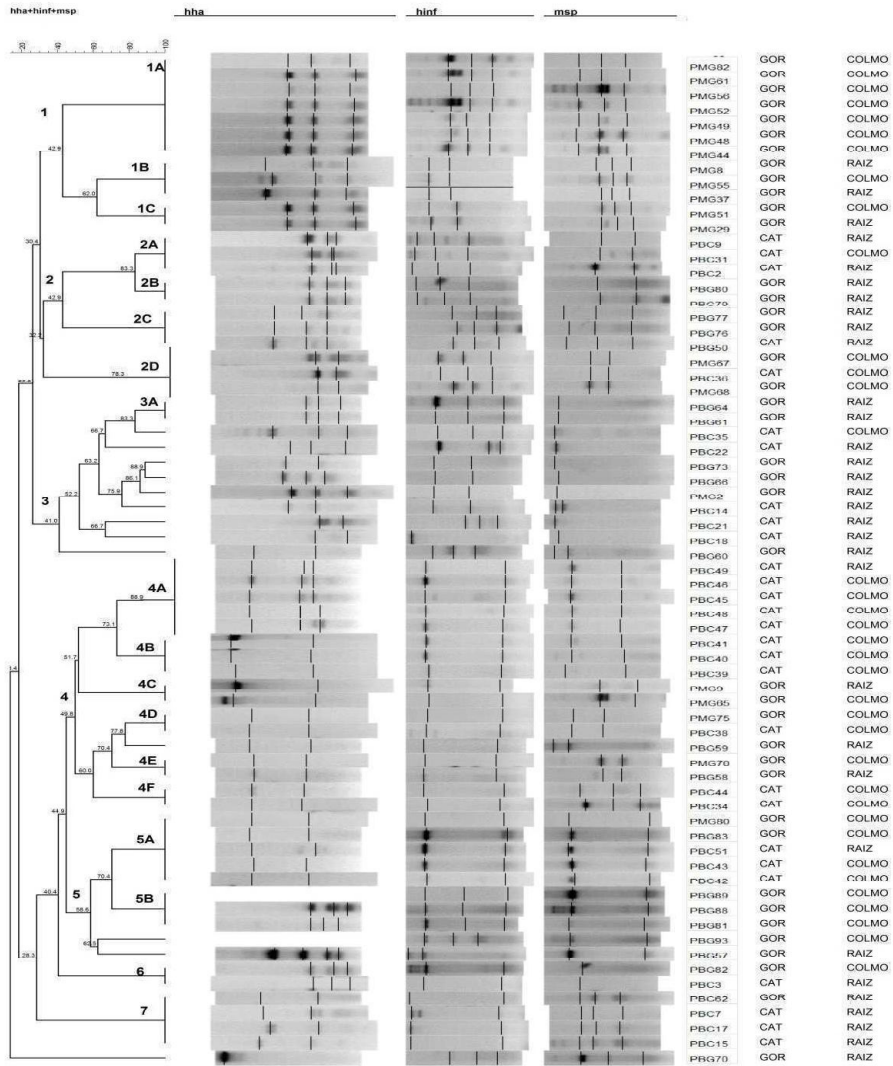


Figura 2. Dendrograma de similaridade de isolados bacterianos de milho por meio da técnica de ARDRA-16S rRNA, utilizando as enzimas de restrição HinfI, HhaI e MspI. PM= Mandacaru; PB= Bebedouro. GOR= BRS Gorutuba; CAT= BRS Caatingueiro; RAIZ= bactérias isoladas da raiz; COLMO= bactérias isoladas do colmo.

Após a amplificação, digestão das amostras e construção do dendrograma de similaridade, foi possível observar que todos os isolados apresentaram em torno de 35% de similaridade e que houve a formação de 13 subgrupos raros. Foi possível observar, também, a formação de seis grupos concisos.

A área de origem dos isolados teve forte influência no agrupamento das bactérias por meio da técnica de ARDRA, bem como a variedade de origem e a parte da planta de onde as bactérias foram isoladas. Avaliando-se a diversidade de bactérias de milho oriundas do Estado de Roraima, Silva et al. (2016) também verificaram que o solo de origem dos isolados apresentou forte influência no agrupamento, corroborando com os resultados apresentados neste trabalho.

Conclusão

Foi observada grande diversidade da comunidade bacteriana isolada de milho provenientes das duas áreas de coleta, sendo o local de origem dos isolados o fator determinante para o agrupamento das bactérias por meio da técnica de ARDRA.

Referências

- BALDANI, J. I.; REIS V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant and Soil*, Cham, v. 31, p. 348-413, 2014.
- CAVALCANTI, M. I. P. **Seleção de bactérias promotoras de crescimento vegetal em milho cultivado no Semiárido utilizando diferentes estratégias para o isolamento**. 110 f. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; SANTOS, C. A. F.; CUNHA, J. B. A.; MARTINS, L. M. V. **Duplex PCR para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013. (Embrapa Semiárido. Comunicado Técnico, 158). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/98607/1/COT158.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2016.
- LIMA, A. A.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; PASSOS, S. R.; PAULO, F. S.; NOSOLINE, S. M.; FÁRIA, S. M.; GUERRA, J. G. M.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER G. R. Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de *Mucuna-cinza* e *Mucuna-anã*. *Revista Brasileira de Ciência Solo*, Viçosa, MG, v. 36, p. 337-348, 2012.

- SILVA, K.; PERIN, L.; GOMES, M. L.; BARAÚNA, A. C.; PEREIRA, G. M. D.; MOSQUEIRA, C. A.; COSTA, I. B.; O'HARA, G.; ZILLI, J. E. Diversity and capacity to promote maize growth of bacteria isolated from the Amazon region. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 46, p. 111-118, 2016.
- SOARES, R. S.; ROESCH, L. F. W.; ZANATTA, G.; CAMARGO, F. A. O.; PASSAGLIA, L. M. P. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 33, p. 221-234, 2006.