

Uso do RAPD-PCR para análise de variação genética em *Bacillus* sp

Use of RAPD-PCR for analysis of genetic variation in Bacillus sp

Thaigoru Soares de Sousa

Graduando do curso de Agronomia (UNIPAM)

E-mail: thaigoruss@unipam.edu.br

Walter Vieira da Cunha

Professor orientador (UNIPAM)

E-mail: walter@unipam.edu.br

Resumo: Atualmente, tem-se o conhecimento de um número muito abundante de espécies de bactérias relacionadas a insetos. Porém poucas expressam as características desejáveis para aplicá-las como controladores biológicos de insetos-praga. Um aspecto importante no controle de pragas é o conhecimento de suas características fenotípicas e genotípicas, pois pode auxiliar no estabelecimento do perfil genético dos insetos e na identificação de marcadores moleculares. Uma ampla gama de marcadores moleculares encontra-se disponível para pesquisas entomológicas, os quais facilitam o estudo da diversidade genética. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a diversidade genética de *Bacillus* sp com utilização de RAPD-PCR. A extração de DNA de *Bacillus* sp foi obtida sem ocorrência de contaminantes, porém nenhum dos 20 *primers* utilizados apresentou bandas possíveis de serem analisadas para avaliação de variabilidade genética.

Palavras-chave: Variabilidade. Bactéria. Diversidade genética.

Abstract: Currently, there is a knowledge of a very abundant number of species of bacteria related to insects. However, few express the desirable characteristics to apply them as biological pest control controllers. An important aspect in pest control is the knowledge of its phenotypic and genotypic characteristics, as it can assist in establishing the genetic profile of insects and in identifying molecular markers. A wide range of molecular markers is available for entomological research, which facilitate the study of genetic diversity. Therefore, the objective of this research was to evaluate the genetic diversity of *Bacillus* sp using RAPD-PCR. The DNA extraction of *Bacillus* sp was obtained without the occurrence of contaminants, however none of the 20 primers used had bands that could be analyzed to assess genetic variability.

Keywords: Variability. Bacterium. Genetical diversity.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Bacillus* atualmente conta com 377 espécies e sete subespécies de microrganismos de acordo com o banco de dados "List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature" (EUZÉBY, s. d.).

As espécies desse gênero podem contaminar substratos variáveis, devido ao grande complexo enzimático produzido pelas células (HABIB; ANDRADE, 1998). Além da morfologia característica do gênero, outros padrões taxonômicos são atribuídos a esses microrganismos. Desse modo, eles podem ser descritos como Gram-positivos, aeróbios obrigatórios ou facultativos, produtores da enzima catalase, proliferam-se em diferentes fontes de carbono e formam endósporos para servir como estrutura de sobrevivência em períodos de estresse ambiental (MADIGAN *et al.*, 2016).

Apesar de esses microrganismos manifestarem semelhanças quanto à biologia e ao modo de atuação, eles se diferenciam pelas características particulares que cada espécie possui. Os aspectos relacionados à distribuição geográfica, habitat preferencial, interações com a microbiota local, fatores que prejudicam o crescimento, esporulação e atividade inseticida dos entomopatógenos auxiliam nos parâmetros às análises de impacto ambiental, em conformidade com pesquisados da área.

Atualmente, tem-se o conhecimento de um número muito grande de espécies de bactérias relacionadas a insetos. Porém poucas expressam as características desejáveis para aplicá-las como controladores biológicos de pragas. No entanto, o interesse pela utilização de bioinseticidas para o controle populacional de insetos prejudiciais teve um aumento significativo. Dessa forma, o homem se interessou em pesquisar mais profundamente as bactérias. Entre as bactérias entomopatogênicas, o gênero *Bacillus* apresenta uma significativa importância no controle biológico de pragas, de acordo com pesquisas da área.

Uma ampla gama de marcadores moleculares encontra-se disponível para pesquisas entomológicas (RFLPs, RAPDs, microssatélites entre outros), os quais facilitam o estudo da diversidade genética (LOXDALE; LUSHAI, 2012). A técnica de RAPD baseia-se em outra técnica chamada PCR (Polymerase Chain Reaction), que permite a detecção de polimorfismos entre indivíduos de uma mesma população (HIRAGI *et al.*, 2009). Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a diversidade genética de *Bacillus* sp com utilização de RAPD-PCR.

2 METODOLOGIA

Este experimento foi conduzido no Laboratório de Genética e Biotecnologia (GENEB) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

Foram utilizadas cepas de *Bacillus* sp que ficam armazenadas em freezer no Laboratório de Genética e Biotecnologia (GENEB) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

Para extração de DNA de *Bacillus* sp, seguiram-se os passos seguintes, em conformidade com Valadares-Inglis E Melo (1998). Transferiu-se 1,5 mL da cultura bacteriana para um tubo de micro centrífuga de 1,5 mL. Centrifugou-se por 3 minutos a 12000 g (r.c.f.) ou 10351 rpm. Descartou-se o sobrenadante em um frasco contendo água

sanitária. Suspendeu-se o precipitado bacteriano em 100 µL de tampão TE ou água. Adicionou-se 100 µL do tampão de Lise. Em seguida, fechou-se o tubo e agitou-se 4 a 5 vezes por suaves inversões, até a solução ficar homogênea. Aguardou-se até 5 minutos ou até a solução bacteriana ficar transparente e viscosa. Adicionaram-se 300 µL da solução de neutralização. Agitou-se 4 ou 5 vezes por suaves inversões ou até a solução ficar homogênea e ocorrer a formação de um floculado branco. Centrifugou-se por 5 minutos a 12000 g (r.c.f.) ou 10351 rpm. Transferiu-se, por inversão, a totalidade do sobrenadante para outro tubo de micro centrífuga, tendo cuidado para não transferir o material precipitado. Adicionaram-se 2 volumes (~ 1,0 mL) de EtOH 95% (gelado ou temperatura ambiente). Centrifugou-se por 15 minutos a 12000 g (r.c.f.) ou 10351 rpm. Descartou-se o sobrenadante no frasco de descarte. Adicionou-se 1.0 mL de EtOH 70% e agitou-se 4 a 5 vezes por suaves inversões. Centrifugou-se por 5 minutos a 12000 g (r.c.f.) ou 10351 rpm. Descartou-se o sobrenadante e retirou-se todo resíduo líquido. Deixou-se secando à temperatura ambiente ou em sistema a vácuo. Por fim, solubilizou-se o precipitado de DNA+RNA em 50 ou 100 µL de tampão TE.

Determinou-se os polimorfismos entre amostras de *Bacillus* sp utilizando RAPD-PCR. Os primers utilizados continham 10-mer com sequências arbitrárias, obtidos de kits da UNISCIENSE (Tabela 1).

Tabela 1 - Primers utilizados e suas respectivas sequências de nucleotídeos

PRIMER	SEQUÊNCIA (5' → 3')	PRIMER	SEQUÊNCIA (5' → 3')
1	GGTCAACAAA	11	AGGTCATCCT
2	TCATAAAGAT	12	GGTGCTTTTA
3	ATTGGTACTT	13	TTGGAGATGA
4	TATATTTTAT	14	CCAAATTTAT
5	TTTTGGAGCT	15	AATGTTATTG
6	TGAGCTGGAA	16	TAAGTCTCA
7	TAGTTGGAAC	17	TGCTTTTATC
8	TCCTTTAAGA	18	ATAATTTTTT
9	ATTTTAGTTC	19	TTATAGTAAT
10	GAGCTGAATT	20	ACCTATTATA

Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Como no PCR, as condições ótimas para os componentes são determinadas por meio de vários testes, variando suas concentrações utilizando programa de amplificação, feito em Termociclador modelo Mastercycler da Eppendorf.

De acordo com Sambrook *et al.* (1989), cada reação é amplificada em 3 ciclos de 94° C por 1 minuto, 35° C por 1 minuto e 72° C por 2 minutos mais 34 ciclos de 94° C por 10 segundos, 40° C por 20 segundos 72° C por 5 minutos. O volume total de cada reação

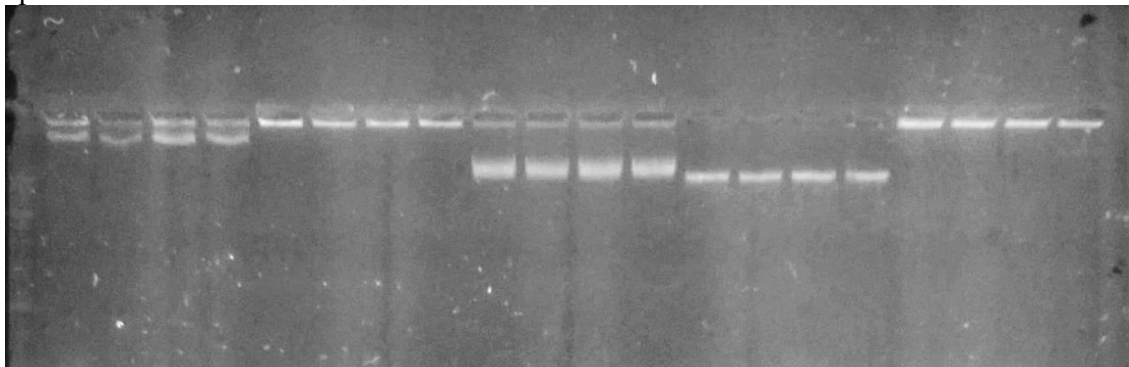
foi de 25 μ l contendo: 2,5 μ l de Tampão da *Taq* DNA polimerase (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), KCl 50 mM, MgCl₂ 15mM), 3 μ l de DNA (10 ng/ μ l), 0,3 μ l de *Taq* DNA polimerase (5U/ μ l), 2,5 μ l *primer* (4 pmol/ μ l), 0,5 μ l de desoxiribonucleotídeo trifosfato (10 mM de cada - dATP, dTTP, dCTP e dGTP), completando-se o resto com água ultrapura. Também na reação de amplificação, utilizou-se um controle contendo todos os componentes, exceto o DNA, verificando-se assim possíveis contaminações.

Ao término das reações, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em géis de agarose a 1,5%, e corridos a 150 volts por aproximadamente 2 horas em tampão TBE 0,5 X (Tris-Borato 0,045M e EDTA 0,001 M). Utilizou-se como padrão de peso molecular o 100 pb e 1 Kb DNA ladder. A cada 12 μ l de amostra foi adicionado tampão de carregamento (azul de bromofenol 3,61 M, xileno cianol 4,64 M, sacarose 1,17 M e EDTA 0,1 M pH8) na proporção de 5:1. Para avaliação, os géis de agarose foram corados com Sybergreen (0,5 μ g mL⁻¹), observados em transluminador UV e fotografado. Foi feita uma repetição de amplificação para cada *primer*, para confirmar os padrões de bandas obtidos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração de DNA de *Bacillus* sp foi obtida sem ocorrência de contaminantes como o RNA, demonstrando DNA íntegro que pode ser observado em gel de agarose de sistema de eletroforese (Figura 1).

Figura 1 – Gel de agarose 1,5% demonstrando produtos de extração de DNA de *Bacillus* sp.



Fonte: Registro feito pelos autores, 2010.

Foram testados 20 *primers* aleatórios e nenhum apresentou bandas possíveis de serem analisadas para avaliação de variabilidade genética. Diferentemente de Cunha (1999), que, utilizando RAPD, selecionou 13 *primers*, resultando em 190 bandas aproveitáveis, sendo apenas uma monomórfica e 189 polimórficas, no presente trabalho não se obtiveram amostras amplificadas para montagem de dendograma. A não amplificação de nenhuma amostra pode ter ocorrido em função de mudança no ponto de inserção do *primer*, não permitindo o seu anelamento correto e, portanto, o não surgimento de banda característica no gel de agarose (CUNHA, 1999). Souza (1996)

afirma que uma concentração alta de DNA genômico e de Mg pode causar perda de bandas e, quando muito baixa, pode originar bandas não reproduzíveis, o que também pode ser uma explicação para o resultado obtido.

4 CONCLUSÃO

O método para extração de DNA de bactérias apresentou na análise em gel de agarose produtos amplificados sem ocorrência de danos ou presença de contaminantes. Os *primers* utilizados não foram eficientes na amplificação das amostras, indicando a necessidade de dar continuidade a essa pesquisa, utilizando *primers* aleatórios de sequências diferentes.

REFERÊNCIAS

- CUNHA, Walter Vieira da. **Mapeamento geográfico da ocorrência de cepas de *Bacillus thuringiensis* no Triângulo Mineiro e sua caracterização molecular**. 1999. 44 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Curso de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1999.
- EUZÉBY, J. P. **List of bacterial names with standing in nomenclature**. [s. d.]. Disponível em: <http://www.bacterio.net/bacillus.html>.
- HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. *et al.* **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: Fealq, 1998. cap. 12, p. 383-446.
- HIRAGI, Cassia *et al.* Variabilidade genética em populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) utilizando Marcadores de RAPD. **Neotropical Entomology**, Brasília, v. 38, n. 4, p. 542-547, ago. 2009.
- LOXDALE, H. D.; LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. **Bulletin of Entomological Research**, Wallingford, 88, v 6, Oct.-Dec., p. 577-600, 2012.
- MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SOUZA, Alexandre Oliveira de. **Bactérias endofíticas de milho (*Zea mays* L.) e sua variabilidade genética analisada por RAPD**. 1996. 83 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Curso de Agronomia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1996.

VALADARES-INGLIS, M. C.; MELO I. S. Métodos de extração de DNA e sua aplicação em estudos genéticos e ecológicos. *In*: MELO, I.S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle Biológico**. Embrapa-CNPMA, v. 1, 1998. p. 187-203.