

Análise da diversidade genética de cepas de *Bacillus* sp. com utilização de RAPD-PCR

Analysis of genetic diversity of Bacillus sp. strains with the use of RAPD-PCR

Thays Stella Barcelos Dias

Graduanda do curso de Agronomia (UNIPAM).

E-mail: thaysstella@hotmail.com

Walter Vieira da Cunha

Professor orientador (UNIPAM).

E-mail: walter@unipam.edu.br

Resumo: *Bacillus* sp é um grupo de bactérias que são frequentemente utilizadas em programas de controle de pragas na agricultura, podendo atingir diversas ordens. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a diversidade genética de cepas de *Bacillus* sp. extraídas de amostras de solo da região do Alto Paranaíba, com utilização de RAPD-PCR. Foram realizadas amplificações por PCR com kit comercial, para a análise da diversidade genética de 15 cepas da coleção do Laboratório de Genética e Biotecnologia (GENEB) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). A técnica molecular determinou alta similaridade genética entre os isolados estudados, variando de 2 a 16%.

Palavras-chave: Marcador molecular. Controle biológico. Similaridade.

Abstract: *Bacillus* sp. is a group of bacteria that are often used in pest control programs in agriculture and can reach several orders. The objective of this research was to evaluate the genetic diversity of strains *Bacillus* sp. extracted from soil samples from the Alto Paranaíba region, using RAPD -PCR. Amplifications were performed by PCR with commercial kit for the analysis of genetic diversity of 15 strains of the collection of the Laboratory of Genetics and Biotechnology – GENE B from Centro Universitário de Patos de Minas. The molecular technique determined high genetic similarity among the studied isolates, ranging from 2 to 16%.

Keywords: Molecular marker. Biological control. Similarity.

1 INTRODUÇÃO

O uso contínuo e indiscriminado de produtos químicos na agricultura tem selecionado populações de insetos resistentes, obrigando os produtores a utilizarem doses mais elevadas ou maior número de aplicações para obter resultados satisfatórios (CUNHA, 1999).

Apesar de o Manejo Integrado de Pragas (MIP) ter como base diferentes métodos de controle sendo usados de forma integrada, as principais táticas que são utilizadas são os defensivos químicos e os agentes de controle biológico. Esta última é uma importante estratégia que, através da liberação, incremento e conservação de

inimigos naturais (parasitoides, predadores e microrganismos), impede que os insetos-praga atinjam níveis capazes de causar dano econômico, tendo como principais vantagens o fato de não deixar resíduo no ambiente, de ser atóxico para o homem e de ser específico (OLIVEIRA; ÁVILA, 2010).

No controle biológico, destaca-se o uso de bactérias entomopatogênicas no controle de insetos-pragas das lavouras. O gênero *Bacillus* constitui um grupo homogêneo de bactérias em forma de bastonete, aeróbicas, que produzem esporos. Dentro desse gênero são encontradas várias espécies, entre as quais alguns sorovares são entomopatogênicos e letais para determinados insetos-praga, principalmente para as ordens Lepidóptera, Díptera e Coleóptera (VALICENTE, 2009).

Várias técnicas da engenharia genética são utilizadas para seleção de organismos, tais como marcadores isoenzimáticos, marcadores moleculares (PCR, RFLP, RAPD), entre outras. Todas essas técnicas, além de caracterizarem bem os isolados e as linhagens ou mesmo as variedades dentro de espécies, são importantes auxiliares do melhoramento genético, pois permitem que, em cruzamentos, linhagens mais ou menos variáveis sejam empregadas, conforme o que se quer obter (AZEVEDO, 1998).

Este trabalho avaliou a diversidade genética de cepas de *Bacillus* sp. extraídas de amostras de solo da região do Alto Paranaíba, com utilização de RAPD-PCR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido no Laboratório de Genética e Biotecnologia (GENEB) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM) e as 15 cepas de *Bacillus* sp. utilizadas foram obtidas da coleção de bactérias do mesmo laboratório.

O meio de cultura para *Bacillus* sp. e a extração de DNA foram realizados de acordo com Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989) e, em seguida, fez-se sua quantificação em espectrofotômetro.

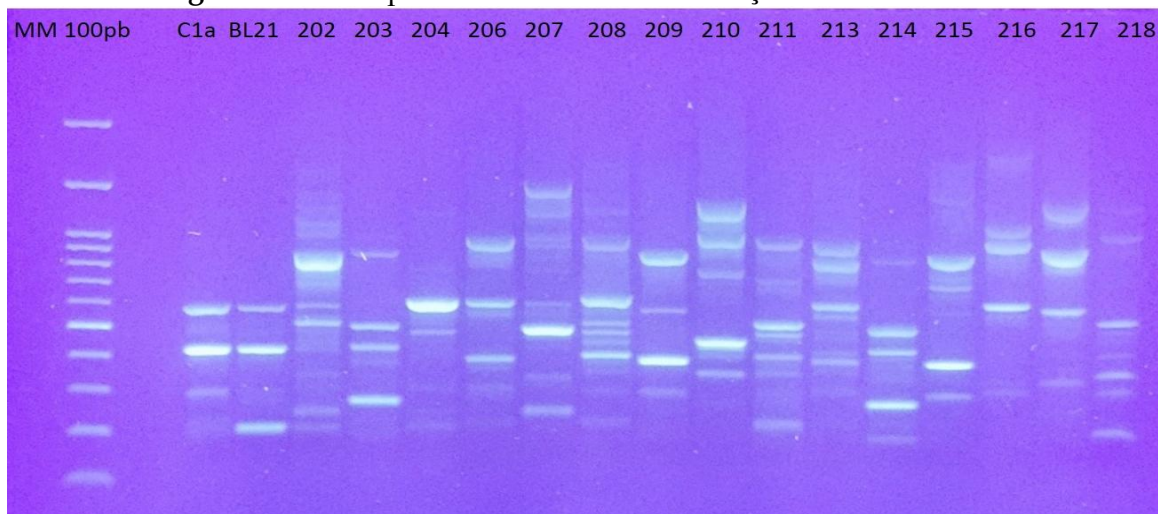
Utilizou-se o kit de primers decâmeros para RAPD da LGC Biotecnologia e a reação de amplificação foi feita de acordo com Oliveira (1998). Ao término das reações, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em géis de agarose a 1,5%, preparados de acordo com Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989) e corridos a 150 volts por, aproximadamente, 2 horas em tampão TBE 0,5 X (Tris-Borato 0,045M e EDTA 0,001 M). Para avaliação, os géis de agarose foram corados com Sybr® Green da Sigma-Aldrich, observados em transluminador UV e fotografados em câmara digital.

Utilizou-se o programa Excel com o suplemento Action para a análise multivariada e a construção dos dendogramas. Construiu-se uma matriz binária (1/0), na qual as bandas presentes foram registradas como 1 e as ausentes como zero. Apenas as bandas mais intensas foram consideradas. Esses dados foram utilizados para determinar a porcentagem de desacordo entre todos os possíveis pares de entrada, com base em Puterka *et al.* (1993). As distâncias genéticas para as análises de agrupamento das colônias de *Bacillus* sp. basearam-se no método UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic averages) (SKROCH; TIVANG; NIENHUIS, 1992).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização do kit de primers decameros da LGC Biotecnologia proporcionou, entre as 15 amostras de *Bacillus* sp. testadas, 23 bandas polimórficas, com tamanho variando entre 100 e 1100 pb, não apresentando nenhuma banda monomórfica. Os resultados foram reproduzidos por duas vezes utilizando-se o mesmo kit. De acordo com a Figura 1, consideraram-se somente as bandas intensas e bem definidas na análise para a montagem da matriz das distâncias e posterior construção do dendograma (Figura 2), evitando, assim, erros advindos da contagem incorreta de produtos amplificados fracamente.

Figura 1: Bandas polimórficas obtidas em reação de RAPD-PCR

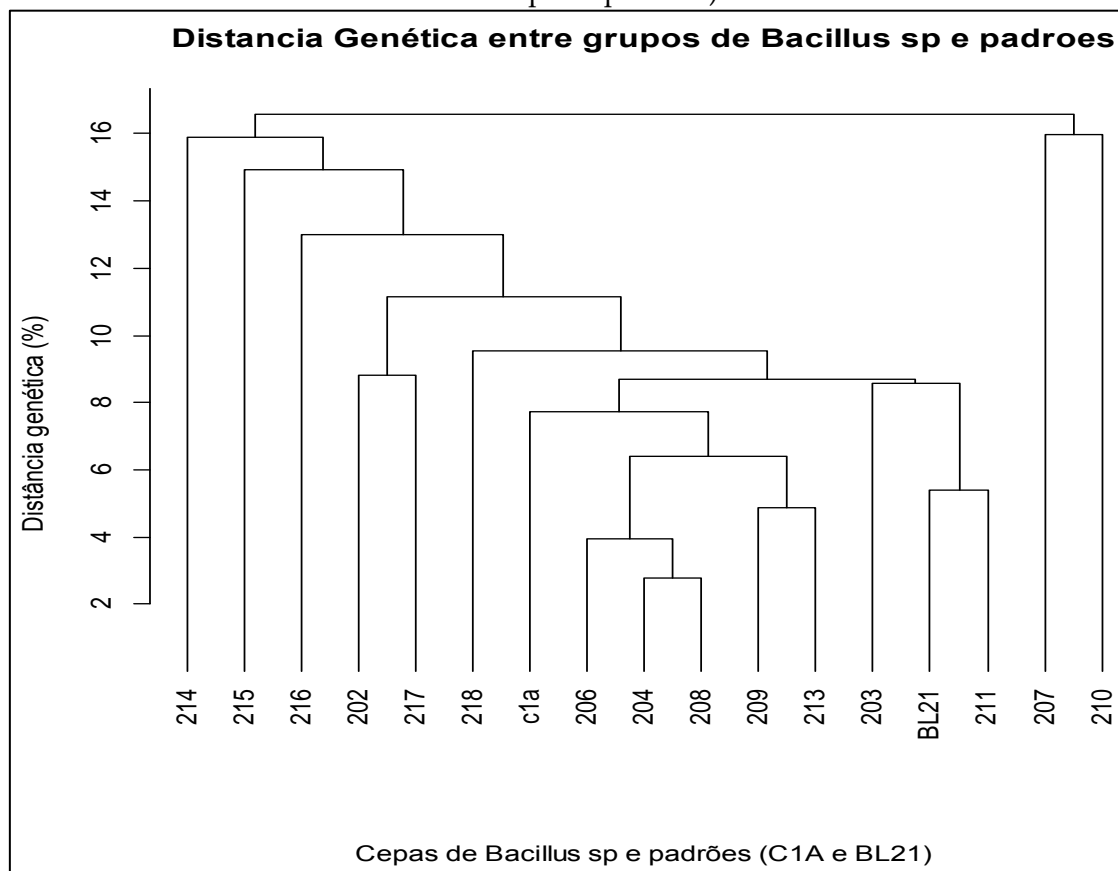


Legenda: MM: Marcador de peso molecular, C1a e BL21: Padrão; 202 a 218: cepas de *Bacillus* sp. da coleção do GENE B.

Fonte: Dados do trabalho.

Conforme se observa na figura 2, ao nível de 16%, nota-se a divisão de dois grupos com o maior deles abrangendo 13 cepas de *Bacillus* sp. e os dois genótipos padrões do kit utilizado. Apesar dessa separação, o nível de proximidade genética é alto, o que pode ser esperado, já que os materiais foram extraídos de amostras de solo de uma mesma região.

Figura 2: Dendograma representativo da distância genética por Porcentagem de Desacordo e Agrupamento pelo método de UPGMA entre 17 genótipos (15 cepas de *Bacillus* sp. e 2 padrões)



A análise por RAPD, nesse experimento, indicou baixa variabilidade genética entre os isolados, corroborando com Gaviria Rivera e Priest (2003), que utilizaram essa técnica para caracterizar *Bacillus* sp. Essa proximidade genética, associada a testes de patogenicidade, pode indicar grupos de bactérias com características específicas para controle de determinados insetos. Com a realização desses testes de mortalidade comparados a esses resultados, pode-se chegar a um determinado padrão de grupo de bactérias para seleção desses microrganismos no manejo de pragas.

Os marcadores RAPD utilizados foram eficazes para distinguir e agrupar cepas de *Bacillus* sp. isoladas a partir de diferentes amostras de solo da região do Alto Paranaíba, conforme cita Katara *et al.* (2013) que realizou trabalho similar com isolados na Índia. O uso desses marcadores na determinação da diversidade genética de *B. thuringiensis* também foi utilizado com sucesso em 70 amostras obtidas em campos de algodão na Índia (KUMAR; CHAUDHARY; BOORA, 2010).

Os resultados obtidos neste trabalho ajudam a conhecer melhor a diversidade de *Bacillus* sp. na região do Alto Paranaíba, incrementando a busca por novos tipos para uso no controle biológico.

4 CONCLUSÃO

As amostras avaliadas com o RAPD-PCR apresentaram variabilidade genética entre 2 e 16%, demonstrando alta proximidade genética e capacidade da técnica em separar as cepas de acordo com sua similaridade.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, J. L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. *In: ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos*. Piracicaba: Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, cap. 4, p. 262-285, 1998.
- CUNHA, W. V. Mapeamento geográfico da ocorrência de cepas de *Bacillus thuringiensis* no Triângulo Mineiro e sua caracterização molecular, *Tese de Mestrado*, Universidade Federal de Uberlândia, 44 p. 1999.
- KATARA, J.; DESCHMUKH, R.; SINGH, N. K.; KAUR, S. Diversity analysis of *Bacillus thuringiensis* isolates recovered from diverse habitats in India using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Journal of Biological Sciences*, v. 13, p. 514-520, 2013.
- KUMAR, D.; CHAUDHARY, K.; BOORA, K. S. Characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains by PCR-RAPD based fingerprinting. *Indian Journal of Microbiology*, v. 50, p. 27-32, 2010.
- GAVIRIA RIVERA, A. M.; PRIEST, F. G. Molecular typing of *Bacillus thuringiensis* serovars by RAPD-PCR. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, v. 26, n. 2, p. 254-261, 2003.
- OLIVEIRA, R. C. Divergência genética por marcadores RAPD em *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) *Tese de Mestrado*, Universidade Federal de Uberlândia, 50 p., 1998.
- OLIVEIRA, H. N.; ÁVILA, C. J. Controle biológico de pragas no Centro-Oeste brasileiro. *In: G.Bio: Revista de Controle Biológico*, p. 11-13, abr. 2010.
- PUTERKA, G. J.; BLACK IV, W. C.; STEINER, W. M.; BURTON, R. L. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity*, v. 70, p. 604-618, 1993.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 453 p. 1989.

SKROCH, P.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. *Proceeding of symposium – Applications of RAPD technology to plant breeding*. Minneapolis, Minnesota (USA), p. 26-30, 1992.

VALICENTE, F. H. Controle biológico de pragas com entomopatógenos. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 30, n. 251, p. 48-55, 2009.