

C. Ciências Biológicas - 10. Microbiologia - 3. Microbiologia

CONFIRMAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* POR MEIO DE PCR

Yslai Silva Peixoto ¹

Eliane Santos Jesus ²

Eliana Maria Rocha Sousa ³

Emanuelle Burgos Cardoso ⁴

Augusto Moura da Silva ⁵

Jorge Teodoro de Souza ⁶

1. Graduanda em Ciências Biológicas - UFRB

2. Graduanda em Ciências Biológicas - UFRB

3. Graduanda em Ciências Biológicas - UFRB

4. Graduanda em Ciências Biológicas - UFRB

5. Dotourando em Ciências Agrárias - UFRB

6. Prof. Dr. - Departamento de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB

INTRODUÇÃO:

O Brasil é o maior produtor de sisal (*Agave sisalana*) do mundo, com produção anual da fibra de cerca de 140.000 toneladas. Contudo, a doença podridão vermelha do caule de sisal é um dos principais problemas fitossanitários dessa cultura, causada pelo fungo *Aspergillus niger* . O uso de microrganismos antagonistas ao fitopatógeno torna-se uma das alternativas viáveis para o controle da doença. Dentre os antagonistas, *Bacillus* spp. destacam-se como bons agentes de biocontrole. Essas bactérias são aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, gram-positivas em forma de bastonete, produzem endósporos e são amplamente distribuídas no ambiente. A identificação dos isolados é uma etapa fundamental no processo de seleção. Nesse sentido, o método de amplificação de ácidos nucléicos conhecido como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) tornou-se uma das mais importantes ferramentas de detecção de microrganismos. Assim, o objetivo deste estudo foi conhecer a população de *Bacillus* spp. associada ao sisal e sua relação com plantas sintomáticas e assintomáticas.

METODOLOGIA:

Amostras de plantas de sisal assintomáticas e com sintomas de podridão vermelha, foram coletadas e submetidas a diluição seriada (101 a 105). Semeadas em placa de Petri em triplicata contendo meio semi-seletivo para *Bacillus* spp. e incubadas a 25°C. As colônias foram transferidas para microtubos contendo 100µl de solução tampão (SDS 25% + NaOH 0,05M) para extração de DNA. O microtubulo foi fervido por 15', e depois centrifugado por 1' a 10.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e diluído em água estéril 20x. Amostras de DNA foram amplificadas via PCR utilizando um par de *primers* específico para o gênero *Bacillus* (B-K1/F e B-K1/R). com 1114-pb. As reações foram feitas com volume total de 25 µl em termociclador PTC-100, com o seguinte programa: 94 °C por 3'; seguidos de 25 ciclos de 94 °C por 30'', 63 °C por 30'', 72 °C por 30'' e extensão final de 72 °C por 10'. Após a amplificação realizou-se eletroforese em gel de agarose 1,5%, e fotodocumentação.

RESULTADOS:

Foram testadas 161 amostras de DNA de isolados oriundos da quantificação de órgãos de plantas sadias e doentes de sisal, e solo. Sendo que 109 isolados amplificaram os fragmentos do gene correspondente ao gênero *Bacillus* spp. Constatou-se que o maior número de isolados de *Bacillus* spp. foi obtido de amostras provenientes em solo de

plantas sadias (96,55%) e em raiz de plantas sadias (92%). De modo geral foi observada maior quantidade de ampliações em órgãos de plantas sadias. Os isolados de *Bacillus* spp. encontrados em folha doente (16,66 %) foi menor que em folha sadia (66,66%). O mesmo foi observado em caule doente (0%) e sadio (84,78%); raiz doente (0%) e sadia (92%); e solo de plantas doentes (64%) e sadias (96,55%).

CONCLUSÃO:

O gene utilizado para amplificação de bactérias do gênero *Bacillus* é eficiente. O PCR é uma ferramenta viável para a confirmação molecular de isolados de *Bacillus* spp., sendo observada maior quantidade de ampliações em solo e órgãos de plantas sadias. Os isolados que não amplificaram deverão passar por uma nova análise, para verificar se a ausência de amplificação é devida a não pertencerem ao gênero *Bacillus* ou a possível degradação do DNA.

Palavras-chave: *Bacillus* spp, PCR, controle biológico.