


Ação antagônica à *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium oxysporum* e diversidade genética de bactérias obtidas de solo cultivado com *Vigna unguiculata* (L.) Walp

Antagonistic action to *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum* and genetic diversity of bacteria obtained from soil cultivated with *Vigna unguiculata* (L.) Walp

Beatriz Rayana Damásio de Andrade¹ , Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva^{2*} ,
Luciana Gonçalves de Oliveira² , Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra² ,
Regina Ceres Torres da Rosa² , Luciana Melo Sartori Gurgel² , José de Paula Oliveira² 

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil
²Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), Recife, PE, Brasil

*autor correspondente
 luizabastos6@yahoo.com.br

RESUMO - Uso de fungicidas em cultivos de feijão apresenta grande potencial de contaminação à saúde humana e do solo. Em virtude disso, faz-se necessário a introdução e desenvolvimento de novos agentes biológicos ambientalmente seguros. Sendo assim, podem-se destacar as bactérias do gênero *Bacillus*, visto que possuem um alto valor biotecnológico em virtude da variedade de compostos e multiplicidade de mecanismos antifúngicos. Desta forma, a presente pesquisa objetivou avaliar a ação antagonista *in vitro* de isolados de *Bacillus sp.* e a diversidade genética por meio da técnica de Box-PCR e ARDRA. Utilizaram-se 12 isolados bacterianos, nos quais foram submetidas a uma série de testes morfológicos, bioquímicos, genéticos e antagonístico. Onde a morfologia das bactérias foi observada através da coloração de Gram, na qual foi identificada a forma bacilar dos microrganismos, sendo posteriormente inoculadas em meios bioquímicos específicos para a seleção dos isolados que apresentassem oxidase positiva, indol negativo e motilidade positiva. Após o processo seletivo, foi executado o teste de pareamento de culturas em placa de Petri, em que o isolado B2-125 demonstrou um efeito antagônico significativo na contenção do crescimento micelial dos fungos *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium oxysporum* quando comparados à placa teste. Com isso, conclui-se que o microrganismo B2-125 possui características promissoras no biocontrole dos patógenos radiculares. E as técnicas de ARDRA-PCR e BOX-PCR se mostram eficientes, permitindo a diferenciação dos isolados, uma vez que essas abordagens possuem um alto nível discriminatório.

Palavras-chave: Fungos patogênicos, antagonismo, gene 16S rRNA, ARDRA.

ABSTRACT- Use of fungicides in bean crops can potentially contaminate human and soil health. Thus, it is necessary to introduce and develop new environmentally safe biological agents. Bacteria of the *Bacillus* genus can be highlighted as they have a high biotechnological value due to the variety of compounds and multiplicity of antifungal mechanisms. Therefore, this research aimed to evaluate the *in vitro* antagonist action of *Bacillus sp.* and genetic diversity through the Box-PCR and ARDRA technique. We used twelve bacterial isolates that were submitted to a series of morphological, biochemical, genetic and antagonistic tests. We observed morphology of the bacteria through Gram stain, in which the bacillary form of the microorganisms was identified, being subsequently inoculated in specific biochemical media for the selection of isolates that presented positive oxidase, negative indole and positive motility. After the selection process, the culture pairing test was performed in a Petri dish, in which the isolate B2-125 showed a significant antagonistic effect in containing the mycelial growth of the fungi *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum* when compared to the test dish. Thus, we conclude that the B2-125 microorganism has promising characteristics in the biocontrol of root pathogens; and that the ARDRA-PCR and BOX-PCR techniques are efficient, allowing the differentiation of isolates with high discriminatory level.

Keywords: Pathogenic fungi, antagonism, 16S rRNA gene, ARDRA.

Introdução

A produtividade do feijão-caupi ou macassar (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) é limitada por diversas variáveis que afetam sua qualidade e produção, destacando os fatores abióticos, como temperatura, disponibilidade de água no solo, radiação solar, vento, entre outros, e bióticos, como os patógenos, em especial os fungos que estão presentes nos solos. (EMBRAPA, 2012; CARVALHO et al., 2011). Com isso, em virtude de o sistema radicular do feijoeiro ser muito susceptível às doenças, observa-se a presença destas enfermidades na maioria das áreas de cultivo (ESTEFANI; MIRANDA; UESUGI, 2007).

De acordo com Szczechura, Staniaszek e Habdas (2013), a perda causada por fungos patogênicos equivale a bilhões de dólares por ano, tendo como principais agentes as espécies de *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Verticillium* e *Macrophomina phaseolina*. Dentre eles, um dos mais importantes patógenos fúngicos do solo é *Fusarium* spp., que causa uma ampla gama de doenças nas raízes e *damping-off* (murcha) em vários vegetais e plantas cultivadas. Outro fungo que causa a doença radicular na cultura de feijão-caupi é a *Macrophomina phaseolina*, responsável por causar danos altíssimos, uma vez que possui estruturas de resistência que possibilitam sua sobrevivência nas adversas condições. Em virtude disso, seu controle é mediado, normalmente, pelo uso de agroquímicos com um nível de toxicidade alto, chegando a afetar o meio ambiente, bem como matando os microrganismos benéficos do solo (LIMA et al., 2013; GADAGA et al., 2017; KANKAM; SOWLEY; IBRAHIM, 2018). Portanto, é de extrema importância o desenvolvimento de estratégias eficientes e ambientalmente seguras para o controle de doenças fúngicas no feijão-caupi (MANDAL; MALLICK; MITRA, 2009).

Dentre as alternativas eficientes para o controle de fitopatógenos, destaca-se o controle biológico promovido pela utilização de microrganismos capazes de desenvolver uma multiplicidade de metabolismo antagonístico frente aos fungos patogênicos (STONE; BACON; WHITE, 2000). Desse modo, as bactérias do gênero *Bacillus*, por formar endósporo, possibilita a sua longa manutenção e sobrevivência em nichos ecológicos específicos, fazendo com que apresente uma grande versatilidade nos mecanismos de ação para driblar as defesas dos patógenos. Por isso é um importante agente de biocontrole (LANNA; FERRO; PINHO, 2010).

Diversos representantes de *Bacillus* spp. são encontrados no solo, exercendo um papel essencial no crescimento e sanidades das plantas. Além de manter a sanidade do hospedeiro através de mecanismos indiretos que inibem a entrada dos patógenos, como a produção de sideróforos e antibióticos contra os fitopatógenos, estes microrganismos endofíticos podem beneficiar seus hospedeiros através da produção de alguns reguladores do crescimento de plantas, facilitando a disponibilidade de nutrientes (DI et al., 2016; SANTOYO et al., 2016; VACHERON et al., 2013; GLICK et al., 2007).

Esses microrganismos isolados do solo muitas vezes passam por técnicas de identificação, destacando-se a técnica de comparação de nucleotídeos do DNA a partir da região que codifica 16S rRNA, visto que é altamente conservado e facilita a identificação taxonômica e a relação filogenética

entre espécies (TOLEDO; MARCONDES; LEMOS, 2009). Dentre os métodos moleculares confiáveis e comumente usados para a diferenciação de *Bacillus* spp. há a técnica da Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), que consiste na amplificação da região do gene 16S rRNA e posterior digestão com enzimas de restrição (CIHAN et al., 2012). Outra técnica de *fingerprint* também muito utilizada é a Rep-PCR em sequência palindrômica extragênica repetitiva, incluindo o elemento BOX (BOX-PCR), que é comumente usada devido à sua simplicidade, eficiência e baixo custo (ALINA; CONSTANTINSCU; PETRUȚA, 2015). Desta forma, a presente pesquisa objetivou avaliar a ação antagonista *in vitro* de isolados de *Bacillus* spp. e determinar a diversidade genética destes isolados por meio da técnica de BOX-PCR e ARDRA.

Material e Métodos

Isolamento de *Bacillus* sp. do solo

Foram coletadas duas amostras de solos distintos de feijoeiro (*Vigna unguiculata*) no Município de Cedro, Sertão de Pernambuco. No laboratório foram adicionados 10g de solo em Erlenmeyers contendo 90 mL de água destilada esterilizada, que foi submetida ao tratamento térmico (banho-maria) a 80 °C por 20 minutos para selecionar as bactérias com capacidade de formar endósporos. Após os 20 minutos foram retiradas alíquotas para adquirir diluição em série 1:10 (10^{-1} a 10^{-3}), sendo usada a última diluição e, por sequência, transferido 0,2 mL da suspensão das diluições para placa de Ágar nutritivo e espalhado com alça de Drigalski (SANHUEZA; MELO, 2007).

Identificação bioquímica e morfológica dos isolados de *Bacillus*

Para a identificação bacteriana, foram feitos testes bioquímicos para a caracterização do gênero *Bacillus*. Foram analisadas a produção das enzimas catalase e oxidase, Indol, motilidade, coloração de Gram e fermentação de glicose (meio TSI). Já na análise morfológica foi analisada a macromorfologia das colônias em placa de Petri no meio Ágar nutritivo, observando-se a forma (puntiforme, circular e irregular) e a transparência (opaca, translúcido e transparente) (GOUVEIA, 2018).

Antagonismo de *Bacillus* a *Macrophomina faveolina* e *Fusarium oxysporum*

Para avaliar o efeito antagonístico, foram utilizados os isolados bacterianos no crescimento dos fitopatógenos, através do método de pareamento de culturas em placa de Petri, de acordo com Dennis e Webster (1971) com adaptações. As cepas isoladas do solo foram inoculadas no caldo tripton de soja (TSB) e acondicionadas em incubador rotativo (150 rpm/minuto) por 72 horas, a 28 °C. Em seguida, os patógenos que fazem parte do Banco de germoplasma de microrganismos do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) foram multiplicados em placas contendo meio Sabouraud (e mantido em temperatura ambiente durante nove dias). Posteriormente, discos de ágar (de 0,5 cm de diâmetro) contendo estrutura fúngica retirados da cultura pura foram depositados na região central da placa de Petri com meio

Ágar Batata Dextrose (BDA), e a cepa foi aplicada em quatro pontos distintos na placa com alíquota de 10 µl.

As placas foram acondicionadas em estufa de crescimento microbiológico a 28 °C. Como testemunha, os fitopatógenos foram cultivados isoladamente em meio BDA, por meio da transferência de discos de ágar e mantidas na mesma condição dos ensaios. As avaliações foram realizadas a partir da comparação de crescimento fúngico entre a placa de ensaio e a placa testemunha.

Extração de DNA genômico

Para a extração de DNA genômico, os isolados bacterianos foram cultivados em meio de cultura TSB e incubados a 28 °C e agitados a 150 rpm por 24h. A extração do DNA foi efetuada pelo kit comercial da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit). Após a extração, quantificou-se o DNA em fluorímetro, procedendo-se as diluições para a concentração final de 10 ng/µl e as amostras foram armazenadas a -20 °C. A seguir, o DNA das bactérias foi submetido à amplificação pela técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”).

Amplificação do DNA por rep-PCR (BOX-PCR)

Para as reações de BOX-PCR foi utilizado o primer BOX 1AR (5'CTACGGCAAGGC GAC GCT GAC G 3')(VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991). A reação de amplificação foi realizada em volume de 25 µL e foi composta de 40 ng de DNA genômico; 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 0,3 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™); 1,0 µM do *primer*. A amplificação foi realizada em um termociclador (Thermal Cycler – Applied Biosystems) programado para uma etapa de desnaturação inicial de 9 min a 95 °C, seguida por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C e 5 min a 72 °C com uma etapa de extensão final de 10 min a 72 °C.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X, por eletroforese conduzida a 100 V, visualizado em sob luz ultravioleta (UV) e fotografadas com o sistema de fotodocumentação (Loccus L. PTX biotecnologia). Os marcadores de DNA (1 kb DNA ladder Amresco) foram incluídos em cada gel de eletroforese. Todas as amplificações foram realizadas pelo menos duas vezes em ensaios separados, para garantir a reprodutibilidade dos padrões, e apenas as bandas comuns às amplificações replicadas foram pontuadas.

Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA)

Para a amplificação, foram utilizados os *primers* 16S rDNA fD1 (‘AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3’) e rD1 (‘5 AAG GAG GTG ATC CAG CC 3’) (WEIBURG et al., 1991). Cada reação de amplificação de 25 µL foi composta de 40 ng de DNA genômico; 2 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP's; 3U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™); 1,0 µM de cada *primer*.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Thermal Cycler – Applied Biosystems). Os ciclos de amplificação constituíram-se de uma etapa inicial de 94 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 92 °C por 50 s, uma etapa de anelamento a 57 °C por 50 s e uma etapa de extensão a 72 °C

por 2 min, finalizando com uma última etapa de extensão a 72 °C por 7 min.

Os produtos de PCR foram quantificados em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 0,5X a 100V e purificados segundo Lyra (2002), e a reação de corte com as enzimas de restrição foi a seguinte: para um volume final de 20µl: 8 µl de DNA amplificado do 16S rDNA 1 U das enzimas de restrição, 10% do tampão específico para cada enzima em relação ao volume da reação (2 µl), e 9µl água esterilizada destilada. As enzimas usadas para corte foram: *Alu I*, *Rsa I* e *Xho I* (Invitrogen™).

Os produtos de digestão foram separados em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5X a 100 V. O tamanho do produto amplificado foi estimado pela comparação com um marcador molecular de 1Kb DNA ladder (Amresco). As bandas de DNA foram visualizadas sob luz UV e fotodocumentada.

Análise de Dados

Os perfis de banda gerados a partir dos marcadores BOX-PCR e ARDRA foram utilizados para a construção de matrizes binárias (‘0’ = ausência de bandas e ‘1’ = presença de bandas) e as mesmas convertidas em matrizes de dissimilaridade. Dendrogramas para cada técnica (BOX-PCR e ARDRA) foram construídos com base no index de similaridade pelo coeficiente de Jaccard, utilizando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages). Dendrograma foi construído no site DendroUPGMA. A construção do dendrograma foi realizada usando o programa FigTree V.1.4.4 2006-2018, cuja matriz de distância foi executada em função da matriz de similaridade onde se determinou o Coeficiente de Correlação Cofenética (CP) para cada dendrograma (DRUMMOND et al., 2012).

Resultados e Discussão

O tratamento térmico das amostras de solo apresentou-se eficiente na seleção *Bacillus* spp., inibindo o crescimento de espécies contaminantes e possibilitando o isolamento na diluição 10⁻³, onde foram observados 12 isolados bacterianos (B1-124, B2-125, B3-131, B4-132, B5-133, B6-221, B7-222, B8-234, B9 235, B10-236) provenientes de solos agrícolas e sob vegetação de *Vigna unguiculata*. Segundo Gonçalves et al. (2017), o tratamento térmico de amostras ambientais auxilia na triagem de bactérias com a capacidade de formar endósporos.

Quanto à identificação morfológica, estrutural e bioquímica, elas serviram para caracterizar os isolados, além de avaliar sua aptidão para o setor biotecnológico. Após, a realização dos testes, as colônias apresentaram variações morfológicas, sendo selecionadas apenas as que se assemelhavam à cepa ATCC 6633. Observou-se que, dentre todos os isolados, 10 deles apresentaram catalase positiva que auxiliam na minimização da toxicidade celular, podendo ser utilizadas no estresse oxidativo. O teste de oxidase dos isolados em sua maioria resultou de forma positiva, tendo como controle positivo a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). Assim como a catalase, está relacionada com a proteção contra toxidade e auxilia praticamente na classificação da espécie, se é bactéria

aeróbica. Todos os isolados foram negativos para o indol, tendo resultados em sua maioria positivos para a motilidade e fermentadores de glicose, como evidenciado na Tabela 1. A partir desses resultados, foram selecionados sete isolados para o teste de antagonismo (GOUVEIA, 2018).

No experimento *in vitro*, observou-se que os sete isolados testados apresentaram reações diversas frente a *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium oxysporum* sfp *tracheiphilum*, sendo que para *Macrophomina phaseolina* verificou-se uma resistência frente aos antagonistas B1-124, B3-131, B4-133, B5-221, B6-222 e B7-223. No entanto, entre o isolado B2-125 ocorreu uma forte inibição no crescimento fúngico (Figura 1). Os isolados bacterianos B1-124, B2-125, B3-131, B4-133, B5-221, B6-222, B7-223 inibiram o crescimento da colônia fúngica de *F. oxysporum* quando comparado com o controle, indicando antagonismo.

Os resultados obtidos demonstram que os isolados de *Bacillus* avaliados são possíveis agentes biocontroladores, contudo, são necessários mais estudos *in vitro*, bem como em campo, com diferentes condições edafoclimáticas. Na literatura existem vários relatos mostrando a influência da temperatura e umidade sobre a eficácia do biocontrole (ROCHA; MOURA, 2013).

Segundo Silva (2020), *Bacillus* é capaz de inibir o crescimento micelial de *M. phaseolina* em testes *in vitro*. Sá et al. (2019) relataram que o *Fusarium* spp. isolado de plantas com sintomas de murcha de *Fusarium*, em área de produção de feijão, foram utilizados para testes de antagonismos *Bacillus* sp. e *B. subtilis*, onde se observou uma redução do crescimento micelial em 4,8, 3,6, 4,8 cm, respectivamente, quando comparados com o tratamento controle, comprovando a eficiência de *Bacillus* no processo antagonístico de fungos que causam danos agrícolas.

Estudos voltados para as bactérias, mais especificamente o gênero *Bacillus*, demonstram e ressaltam a importância da sua ação como agentes biocontroladores, devido à produção de compostos orgânicos voláteis, nos quais são comumente relatados como inibidores do crescimento micelial de diversos fungos patogênicos (AREAL, 2019).

Além de possuir um grande potencial para controle biológico de enfermidades geradas por microrganismos, esse gênero se destaca por formar endósporos, o que possibilita a sua manutenção e sobrevivência em nichos ecológicos específicos. Além dessas contribuições, a espécie *Bacillus subtilis* estimula o crescimento,

Tabela 1. Identificação morfológica e bioquímica dos isolados

ISOLAMENTO DE <i>BACILLUS</i> SP.	GRA	COR	CA	MO	IN	FOR	OX	FG	TRS	FP	SELECIONADOS PARA O ANTAGONISMO
B - 124	GP	BR	P	P	N	BA	P	+	OP	CI	+
B - 125	GP	BR	P	P	N	BA	P	+	OP	IR	+
B - 126	GN	BR	N	N	N	OF	N	+	OP	CI	-
B - 131	GP	BR	P	P	N	BA	P	+	OP	IR	+
B - 132	GP	BR	P	P	N	OF	N	+	OP	CI	-
B - 133	GP	BR	P	P	N	BA	P	+	OP	IR	+
B - 221	GP	BR	P	P	N	BA	P	+	OP	CI	+
B - 222	GP	BR	P	P	N	BA	P	+	OP	CI	+
B - 223	GP	BR	P	P	N	BA	P	+	OP	CI	+
B - 234	GN	BR	P	P	N	OF	N	+	OP	CI	-
B - 235	GP	BR	N	P	N	OF	N	+	OP	CI	-
B - 236	GP	BR	P	P	N	OF	N	+	OP	CI	-

GRA: Gram; GP: Gram-positiva; GN: Gram-negativa; COR: cor da colônia; BR: branca; CA: catalase; MO: motilidade; IN: indol; FOR: forma; OF: outra forma; BA: bastonetes; OX: oxidase; FG: fermentador de glicose; TRS: transparência; OP: opaco; FP: forma da colônia em placa; CL: circular; IR: irregular; P: positiva; N: negativa; +: selecionadas; -: eliminadas.

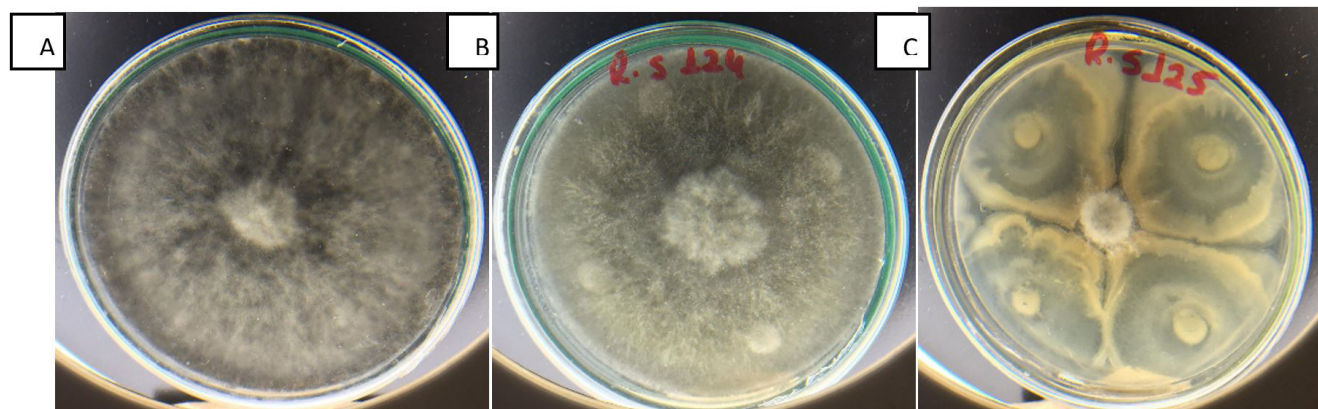


Figura 1. Atividade antagonista do isolado BF-125 ao patógeno *Macrophomina phaseolina*. Placa Teste (a); Resistência do Fungo (b); Inibição do Fungo (c).

desenvolvimento e a produtividade das plantas, sendo uma ótima opção para a exploração comercial na agricultura, já que são facilmente cultivadas em meios de baixo custo (LANNA; FERRO; PINHO, 2010).

Quanto à diversidade genética dos sete isolados (B1-124, B2-125, B3-131, B4-133, B5-221, B6-222 e B7-223) e a cepa padrão B8-ATCC 6633) através da amplificação do DNA por BOX-PCR, o número de bandas obtidas foi entre 03 e 05 por isolado, variando entre 150bp a cerca de 2000bp. Com base no perfil da impressão digital do BOX-PCR pelos isolados e a cepa padrão, foi gerado um dendrograma (Figura 2). Foram formados dois agrupamentos, considerando uma similaridade acima de 50% e um coeficiente de correlação cofenética (CP) de 83%. Quanto mais próximo de 100% a CP, mais seguro é o agrupamento.

No agrupamento G1, o isolado 124 (B1) apresentou uma similaridade de 100% com a estirpe padrão de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, e o isolado B3-131 e B5-221 apresentaram entre si 100% de similaridade, e em relação aos dois isolados isolado B1-124 e a estirpe padrão B8-ATCC 6633, uma similaridade acima de 50%. De acordo Alina, Constantinscu e Petruța (2015), isolados acima de 50% de similaridade têm mais da metade de suas características preservadas, e para tanto cumpre um papel da manutenção da biodiversidade entre espécies.

Os isolados B6-222 e B7-223, correspondendo aos isolados B6-222 e B7-223, respectivamente, apresentaram-se como ramos monofiléticos com uma similaridade de apenas 30% e 25%. O agrupamento G2 foi o mais distante com uma similaridade menor que 20%, onde os isolados B2-125 e B4-133 se mostraram idênticos. O uso de diferentes técnicas de *fingerprint*, como Rep-PCR (REP, ERIC e BOX-PCR), é uma estratégia interessante para discriminar *Bacillus* de amostras ambientais (KUMAR; KUMAR; PRATUSH, 2014). As vantagens de usar estas técnicas Rep-PCR, bem como outros métodos de tipificação molecular, mostra a habilidade de diferenciar entre estirpes bacterianas altamente relacionadas, assim como um método de genotipagem simples, rápido e confiável (OLIVE; BEAN, 1999). O elemento BOX possui combinações de três subunidades: boxA, boxB e boxC, entretanto, neste trabalho foi usado o BoxA, que tem 59 nucleotídeos de comprimento, mostra-se altamente diverso e se encontra em regiões não codificantes.

Todos os produtos de amplificação da região do 16S rRNA (sete isolados e a cepa padrão) produziram uma única banda com tamanho aproximadamente de 1500pb. Esse tamanho de fragmento corresponde ao esperado (CHEN et al., 2000; GOWDAMAN, 2014), pois os primers fD1 e rD1 utilizados amplificam praticamente toda a região do DNA aproximadamente de 1500pb que codifica o gene 16S rRNA

A restrição dos fragmentos amplificados da região do 16S rRNA pelas três enzimas de restrição *Alu* I, *Rsa* I e *Xho* I gerou o total de 16 bandas polimórficas e oito perfis de restrição distintos. Os resultados revelaram que a *Alu* I produziu o maior número de bandas polimórficas (nove), apresentou o maior poder discriminatório, seguindo pela enzima *Rsa* I (quadro) e *Xho* I (três). De acordo com o perfil de ARDRA, foram formados dois agrupamentos considerando uma similaridade acima de 60% e um coeficiente de correlação cofenética (CP) de 89%

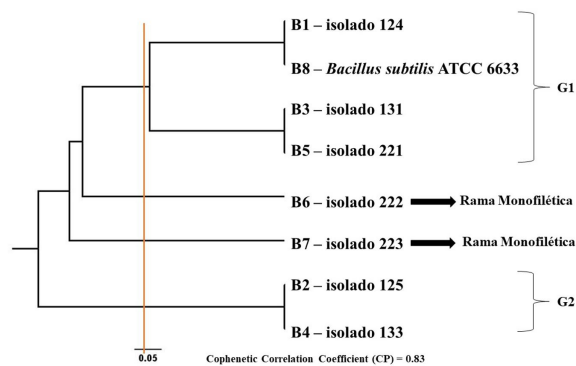


Figura 2. Similaridade calculada por meio do Coeficiente de Jaccard e agrupado utilizando o algoritmo UPGMA com base nos dados de BOX-PCR dos sete isolados (B1-124, B2-125, B3-131, B4-133, B5-221, B6-222 e B7-223) e a estirpe padrão *Bacillus subtilis* B8-ATCC 6633).

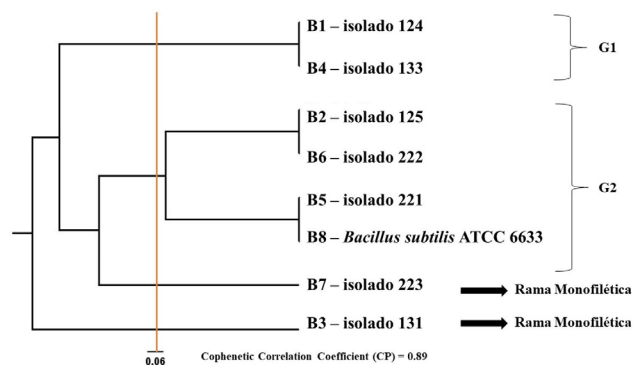


Figura 3. Dendrograma de ARDRA com enzimas de restrição (*Alu* I, *Rsa* I e *Xho* I). Análise usando o algoritmo UPGMA com o coeficiente de Jaccard para os isolados sete isolados (B1-124, B2-125, B3-131, B4-133, B5-221, B6-222 e B7-223) e a B8- estirpe padrão *Bacillus subtilis* ATCC 6633).

(Figura 3), O agrupamento 1 foi formado pelos isolados B1-124 e B4-133 com 100% de similaridade entre si.

O método de ARDRA mostra-se útil para analisar a variabilidade genética entre isolados bacterianos, dependendo da seleção de regiões conservadas dos genes ribossomais. Segundo Jain et al. (2017), a restrição dos fragmentos amplificados da região do 16S rRNA com as endonucleases *Alu* I, *Hae* III, *Hinf* I e *Taq* I produziram padrões de restrição únicos e distintos usados para a caracterização molecular dos isolados de Bt, mostraram diversidade molecular significativa com base em agrupamento UPGMA. Sangeetha et al. (2016) verificaram, com base em dendrograma da análise do 16S rRNA pela técnica de ARDRA, que os isolados foram agrupados em dois grupos principais heterogêneos, ou seja, agrupamentos muito bem definidos em função de sua similaridade.

Resultado bastante divergente em relação à técnica de BOX-PCR, já que o isolado B1-124 se mostrou idêntico à estirpe padrão B8. A estirpe B8-ATCC 6633 agrupou-se com os isolados B2-125, B6-222, B5-221, sendo este último considerado idêntico à estirpe tipo. E dois isolados se mostraram como rama monofilética os isolados B7-223 e B3-131. Apenas o isolado B7-223, nas duas técnicas, comportou-se como rama

monofilética e pode ser considerado um isolado com maior divergência entre os demais. Isolado 124 (B1), nesta técnica apresentou uma similaridade abaixo de 50% da estirpe tipo, podendo não ser na mesma espécie.

Por meio da comparação dos dois métodos, comprovamos que o BOX-PCR gerou resultados bem diferentes em relação à técnica de ARDRA para os isolados analisados. ARDRA e Rep-PCR são capazes de revelar polimorfismo nos fragmentos de DNA, tornando-os úteis para uma rápida e análise detalhada da diversidade genética (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991).

Ao compilarmos os dados das técnicas de ARDRA e BOX-PCR em um só dendrograma, observamos na Figura 4 que o isolado B1-124 é idêntico à estirpe tipo, corroborando com a técnica de BOX-PCR. Os isolados B6-222 e B7-223 também se comportaram como ramos monofiléticos, sendo estes isolados com menor similaridade e podendo ser novas espécies.

Na compilação dos dados BOX-PCR e ARDRA, considerou uma similaridade acima de 50% e um coeficiente de correlação cofenética (CP) de 90%, o que valida seu agrupamento de forma mais segura. Esses métodos têm sido usados para a diferenciação de espécies bacterianas, incluindo a identificação de isolados promotores de crescimento em plantas (EL-SAYED et al., 2014), ou mesmo na caracterização de cepas dentro de espécies de *Bacillus*.

O coeficiente de correlação cofenética (CP) de 90% foi o maior CP entre os dendrogramas, confirmando que quanto mais técnicas moleculares utilizadas para um estudo polifásico, mais seguros são os resultados. Resultado semelhante foi observado no estudo de Gomes et al. (2020), com cepas de *Bacillus*; usando as técnicas de Rep-PCR e ARDRA, as mesmas permitiram a discriminação das cepas, exceto dois isolados que apresentaram perfis genéticos idênticos, o que indicam uma proximidade genética ou iguais.

A principal vantagem dessas impressões digitais de DNA, em contraste com a região 16S rDNA sequenciamento, é a sua ampla cobertura de diversidade genética à medida que amplificam regiões distribuídas em todo o genoma bacteriano. O que poderia confirmar a conclusão destes agrupamentos seria sequenciamento destes isolados do gene 16S rRNA.

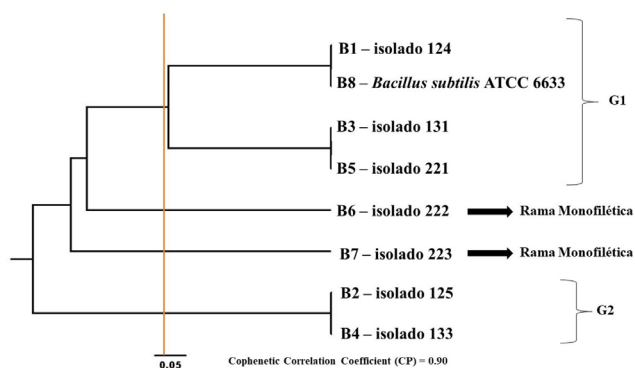


Figura 4. Dendrograma de ARDRA e BOX-PCR compilados. Análise usando o algoritmo UPGMA com o coeficiente de Jaccard e Coeficiente de Correlação Cofenética (CP) Jaccard para os isolados sete isolados (B1-isolado124, B2-isolado 125, B3- isolado 131, B4- isolado 133, B5- isolado 221, B6- isolado 222 e B7- isolado 223) e a B8- estirpe padrão *Bacillus subtilis* ATCC 6633).

Conclusões

- O isolado B2-125 possuem qualidades promissoras no controle biológico de patógenos radiculares *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium oxysporum* em virtude da sua contenção no crescimento fúngico.
- As técnicas de ARDRA-PCR e BOX-PCR se mostraram eficientes, permitindo a diferenciação dos isolados, uma vez que essas abordagens possuem um alto nível discriminatório.
- Ao compilarmos as duas técnicas de *fingerprint* em um só dendrograma, podemos visualizar que os isolados podem ter uma similaridade bem diferente quando se emprega apenas uma técnica, isoladamente.

Referências

- Alina, S. O.; Constantinescu, F.; Petruța, C. C. Biodiversity of *Bacillus subtilis* group and beneficial traits of *Bacillus* species useful in plant protection. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 20, n. 5, p. 10737-10750, 2015.
- Areal, M. V. R. **Compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por *Bacillus* sp. no controle biológico de fitopatógenos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Bacharelado)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019. 47 p.
- Carvalho, D. D. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 36, n. 1, p. 28-34, 2011.
- Chen, L. S. et al. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 11, p. 5099-5103, 2000.
- Cihan, A. C. et al. The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ARDRA analyses isolated from geothermal regions of Turkey. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 309-324, 2012.
- Dennis, C.; Webster, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 57, p. 363-369, 1971. [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80050-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80050-5).
- Di, X.; Takken, F. L.; Tintor, N. How phytohormones shape interactions between plants and the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum*. **Frontiers of Plant Science**, Lausanne, v. 7, n. 170, p. 1-9, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00170>.
- Drummond, A. J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular biology and evolution**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 1969-1973, 2012.
- El-Sayed, W. S. et al. *In vitro* antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, n. 651, 2014. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00651>.
- EMBRAPA. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central-brasileira: 2012-2014. In: Barbosa, F. R.; Gonzaga, A. C. O. (Ed.). **Documento 272**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012.
- Estefani, R. C.; Miranda, R. J.; Uesugi, C. H. Tratamentos térmico e químico de sementes de feijoeiro: eficiência na erradicação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e efeitos na qualidade

- fisiológica das sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 5, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582007000500011>.
- Gadaga, S. J. C.; Abreu, M. S. D.; Resende, M. L. V. D.; Ribeiro, P. M. Phosphites for the control of anthracnose in common bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 52, n. 1, p. 36-44, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2017000100005>
- Glick, B. R. et al. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 26, n. 5-6, p. 227-242, 2007.
- Gomes, E. A. et al. Polyphasic characterization of bacillus strains isolated from maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 19, n. e1190, 2020. <http://dx.doi.org/10.18512/rbms2020v19e1190>.
- Gonçalves, O. S. et al. Prospecção de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrole contra *Fusarium sp.* **Revista Mirante**, Anápolis, v. 10, n. 1, 2017.
- Gouveia, K. C. **Seleção e avaliação de bactérias do gênero Bacillus com potencial probiótico para uso na carcinicultura**. 2018.172.f. Tese (Doutorado em Ciências biológicas)-Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.
- Gowdaman, V.; Kumar, R. M.; Venkatachalam, S. Int J Res Adv Comparison of DNA fingerprinting analysis for identification of Bacillus species. **Int J Res Adv Technol**, 2014.
- Jain, D. et al. Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from Bacillus thuringiensis strains. **3 Biotech**, Berlin, v. 7, n. 4, p. 1-8, 2017.
- Kankam, F.; Sowley, E. N. K.; Ibrahim, A. Evaluation of Cowpea (*Vigna unguiculata*) genotypes for resistance to web blight caused by *Rhizoctonia solani*. **Asian Journal of Research in Crop Science**, West Bengal, v. 2, n. 3, p. 1-7. 2018.
- Kumar, A.; Kumar, A.; Pratush, A. Molecular diversity and functional variability of environmental isolates of *Bacillus* species. **SpringerPlus**, Cham, v. 3, p. 312, 2014. <http://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-3-312>.
- Lanna, F. R.; Ferro, H. M.; Pinho, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica- Ciências Agrárias e Biológicas**, São Luís, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010. <http://dx.doi.org/10.0000/rtcab.v4i2.145>.
- Lima, L. R. L. et al. Influência de metodologia de inoculação e da concentração de inóculo de *Macrophomina phaseolina* no desenvolvimento da podridão-cinzenta-do-caule em feijão-caupi. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 3., 2013, Recife. **Feijão-Caupi como alternativa sustentável para os sistemas produtivos familiares e empresariais**. Recife: IPA, 2013.
- Lyra, C., Suomalainen, S., Gugger, M., Vezie, C., Sudman, P., Paulin, L., Sivonen, K. Caracterização molecular de cianobactérias planctônicas dos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* e *Planktothrix*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 513-526, 2002.
- Mandal, S.; Mallick, N.; Mitra, A. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, Dorchester, v. 47, n. 7, p. 642-649, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.03.001>.
- Olive, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.
- Rocha, A. D. J.; MOURA, A. B. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 38, n. 5, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762013005000025>.
- Sá, M. N. F. et al. Seleção *in vitro* de agentes de biocontrole visando o controle de *Fusarium sp.* **Acta Brasiliensis**, Patos, v. 3, n. 1, p. 14-16, 2019.
- Sangeetha, B. G. et al. Molecular characterization and amplified ribosomal DNA restriction analysis of entomopathogenic bacteria associated with Rhabditis (*Oscheius*) spp. **3 Biotech**, Berlin, v. 6, n. 32, p. 1-13, 2016.
- Sanhueza, R. M. V.; Melo, I. S. **Métodos usados no biocontrole de fitopatógenos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 2007. 141 p.
- Santoyo, G. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, Berlin, v. 183, p. 92-99, 2016.
- Silva, N. P. **Biocontrole de *Macrophomina phaseolina* e promoção do crescimento na cultura do girassol com o uso de *Trichoderma sp.* e rizobactérias**. 2020. 39f. Monografia (Graduação em Agronomia). Universidade de Anápolis (UniEvangélica), Anápolis, 2020.
- Stone, J. K.; Bacon, C. W.; White, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. (Ed.). **Microbial endophytes**. New York: Dekker, 2000. p. 17-44.
- Szczechura, W.; Staniaszek, M.; Habdas, H. *Fusarium oxysporum* f. sp. radices-lycopersici – the cause of Fusarium crown and root rot in tomato cultivation. **Journal of Plant Protection Research**, Berlin, v. 53, n. 2, p. 172-178, 2013.
- Toledo, B. F. B. D.; Marcondes, J.; Lemos, E. G. D. M. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do 16S rRNA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 4, p. 384-391, 2009.
- Vacheron, J. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers of Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 356, p. 1-19, 2013. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>.
- Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupski, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>.
- Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A.; Lane, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

Recebido: 02 jun. 2021
Aprovado: 18 ago. 2021