



XXIX Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas  
XIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas  
XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo  
VIII Reunião Brasileira de Biologia do Solo  
Guarapari – ES, Brasil, 13 a 17 de setembro de 2010.  
Centro de Convenções do SESC

## Identificação do gene *phlD* e análise da diversidade genética em isolados de *Pseudomonas* spp. pertencentes ao grupo fluorescente

**Jakeline Renata Marcon Delamuta<sup>(1)</sup>; Paulo José Camargo<sup>(2)</sup>; Nilson Darlan Vieira<sup>(3)</sup>;  
Alexandre José Cattelan<sup>(4)</sup> & Álvaro Manuel Rodrigues Almeida<sup>(5)</sup>**

(1) Mestranda do curso de Pós-Graduação em Microbiologia – Bolsista CNPq – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, CEP: 86051-990, [jake\\_renata@hotmail.com](mailto:jake_renata@hotmail.com) (apresentadora do trabalho); (2) Graduando do curso de Ciências Biológicas – Bolsista CNPq – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, PR, CEP: 86360-000, [galiqq@gmail.com](mailto:galiqq@gmail.com); (3) Assistente do Laboratório de Biotecnologia Vegetal - Embrapa Soja, Rod. Carlos João Strass - Distrito de Warta, Londrina, PR, CEP: 86001-970, [nvieira@cnpso.embrapa.br](mailto:nvieira@cnpso.embrapa.br); (4) Pesquisador Embrapa Soja, [cattelan@cnpso.embrapa.br](mailto:cattelan@cnpso.embrapa.br); (5) Pesquisador Embrapa Soja, [amra@cnpso.embrapa.br](mailto:amra@cnpso.embrapa.br).

**RESUMO** – Bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. pertencentes ao grupo fluorescente têm sido mencionadas como eficazes no controle de patógenos que atacam o sistema radicular de plantas. Desse modo, este trabalho se propôs a identificar isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes sintetizadores de 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), um antibiótico que apresenta atividade contra diversos patógenos radiculares de plantas, além de avaliar a diversidade genética desse gênero de bactérias utilizando a técnica de PCR-RFLP 16S RNAr. Pela técnica de PCR foi amplificado um fragmento do gene *phlD*, envolvido na síntese do 2,4-DAPG. Para o PCR-RFLP, o gene ribossomal 16S foi amplificado e o produto do PCR foi digerido com a enzima de restrição *AluI*. De um total de 1.274 isolados analisados, seis apresentaram o gene *phlD*, revelando que a incidência de *Pseudomonas* spp. produtoras de 2,4-DAPG é baixa nos solos do Paraná. A análise da diversidade genética, realizada em 50 isolados pela comparação dos padrões de restrição do gene 16S RNAr, revelou que bactérias isoladas de diferentes culturas vegetais apresentam elevada diversidade genética, sendo identificados 11 genótipos distintos.

**Palavras-chave:** 2,4-DAPG; PCR-RFLP 16S RNAr; proteção de plantas.

**INTRODUÇÃO** - A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é a principal cultura do Brasil e tem sido frequentemente ameaçada por diversas doenças (ALMEIDA et al., 2005). Entre as doenças, aquelas que afetam o sistema radicular têm sua importância aumentada nos últimos anos, em algumas regiões do

país, especialmente onde as culturas, soja e trigo, são muito utilizadas.

As doenças favorecidas pela monocultura são tradicionalmente controladas pela rotação de cultura. A prática de rotação de cultura possui duas diferentes ações, uma reduzindo a fonte de alimento do patógeno e a outra aproveitando a ação antagônica de micro-organismos presentes na rizosfera das plantas (REIS & FORCELINI, 1995).

Muitos estudos têm indicado que um dos micro-organismos mais abundantes na rizosfera (região ao redor da raiz) são espécies de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Essas bactérias têm sido consideradas uma alternativa como controle biológico de doença de plantas, bem como na promoção do desenvolvimento vegetal (BOTELHO & MENDONÇA-HAGLER, 2006). Estudos utilizando *Pseudomonas* spp. fluorescentes têm mostrado eficácia deste grupo de bactérias na inibição da infecção do trigo pelo fungo causador do mal do pé (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) (WELLER, 1984) e também a podridão negra da raiz do fumo, causada pelo fungo *Thielaviopsis basicola* (LAVILLE et al., 1992).

Algumas bactérias do gênero *Pseudomonas* produzem antibióticos que desempenham um papel fundamental na supressão de vários fitopatógenos presentes no solo (RAAIJMAKERS et al., 2002). Um dos antibióticos mais estudado é o 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG). Esse componente orgânico é de particular interesse para a agricultura devido à sua atividade contra vários patógenos radiculares de plantas (BANGERA & THOMASHOW, 1999).

A fim de compreender a diversidade genética existente entre as espécies de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, muitos estudos têm utilizado a técnica de PCR-RFLP dos genes 16S RNAr e *phlD* (GARDENER et al., 2005; PICARD et al., 2000). Desse modo, este trabalho objetivou verificar a prevalência de *Pseudomonas* spp. fluorescentes que apresentam o gene *phlD*, em rizosfera de plantas utilizadas como cultura de sucessão à soja, bem como verificar a diversidade do gênero *Pseudomonas* nas culturas de soja, milho e feijão pela técnica de PCR-RFLP do gene ribossomal 16S.

**MATERIAL E MÉTODOS** - O isolamento de *Pseudomonas* spp. fluorescentes para verificar a presença do gene *phlD* foi realizado a partir da rizosfera de milho, nabo, trigo, brizantão, tremoço, aveia e girassol; e para estudar a diversidade genética entre os isolados, *Pseudomonas* spp. fluorescentes foram isoladas ao acaso a partir da rizosfera de soja, milho e feijão, sendo as culturas coletadas em várias regiões do Paraná. Depois de coletadas as raízes, dez gramas de cada amostra foram agitadas em 90 mL de água destilada. Após a agitação, foi realizada uma diluição em série decimal das soluções. As bactérias foram plaqueadas em meio de cultura King B e, em seguida, incubadas a 28°C por 48 horas. Após a incubação, as placas de Petri foram colocadas sob luz ultravioleta ( $\lambda = 366$  nm) para realizar o isolamento das colônias que emitem fluorescência. A extração de DNA foi realizada utilizando-se o protocolo descrito por Clerc et al. (1998). Para se proceder a identificação dos isolados produtores de 2,4-DAPG, 1.274 bactérias foram submetidas a PCR do gene *phlD*, utilizando os iniciadores B2BF e BPR4 (GARDENER et al., 2001) e para o PCR-RFLP foi realizada uma amplificação da região 16S-DNAr de 50 isolados utilizando-se os iniciadores fD1 e rD1 (WEISBURG et al., 1991). O produto do PCR do gene 16S foi digerido com a endonuclease *AluI*. Para a construção do dendrograma foi utilizado o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, versão 1.50) com os parâmetros predefinidos, distância de Dice e algoritmo de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO – isolamento de bactérias fluorescentes e amplificação do gene *phlD*.** Das amostras de rizosfera analisadas para verificar a presença do gene *phlD*, foram obtidas 1.274 colônias de *Pseudomonas* spp. capazes de emitir fluorescência. As análises moleculares, através de PCR, utilizando iniciadores desenhados para identificação de isolados sintetizadores de 2,4-

DAPG mostraram um fragmento de 629 pb para seis colônias isoladas da rizosfera de girassol, coletadas em Londrina (Fig. 1). Uma possível explicação para os resultados desse estudo é a baixa incidência de *Pseudomonas* spp. fluorescentes produtoras de 2,4-DAPG, nos solos das regiões avaliadas do Estado do Paraná. Contudo, isto não significa que essas bactérias não desempenham antagonismo a patógenos de plantas. A produção de pioverdina, um sideróforo fluorescente que sequestra íons de ferro, é o principal mecanismo pelo qual *Pseudomonas putida* WCS358 controla o fungo *Fusarium* spp. em cravo e rabanete (WEISBEEK & GERRITS, 1999).

**Análise da diversidade genética.** Foi possível identificar neste estudo uma elevada diversidade genética entre *Pseudomonas* spp. isoladas de diferentes culturas vegetais. Esse resultado foi comprovado pela digestão do gene ribossomal 16S de 50 isolados com a enzima de restrição *AluI* (Fig. 2). Considerando arbitrariamente o valor de 85% de similaridade, foram definidos, através do dendrograma, 11 genótipos diferentes. O grupo A apresentou o mesmo perfil genético e foi formado pelos isolados 119H e 119I. Três isolados de regiões diferentes, 80G, 123B e 86G, apresentaram um padrão de bandas único e por isso não agruparam com nenhum outro isolado no dendrograma.

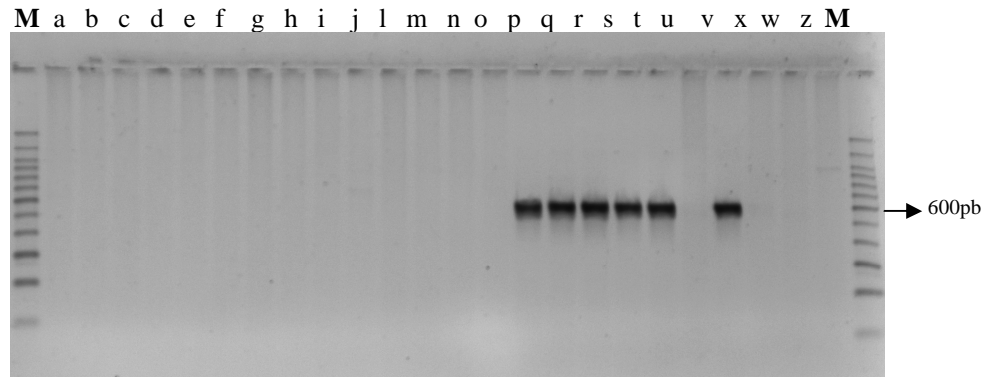
O grupo D foi o mais predominante, sendo formado por 60% dos isolados. Com esse resultado, foi possível comprovar que as bactérias apresentaram o mesmo padrão de bandas para o gene conservado 16S, apesar de serem isoladas de regiões geográficas e culturas diferentes. Outros grupos menores foram formados. Por exemplo, o grupo C, F, H e I, que assim como o grupo D, agrupou *Pseudomonas* spp. fluorescentes de localidades e espécies vegetais diferentes. O grupo G foi o único que apresentou estirpes isoladas do mesmo local e da mesma cultura, e o grupo K também foi o único que reuniu estirpes coletadas na mesma região, porém de plantas diferentes. A diversidade genética do gene 16S de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes foi avaliada por Picard et al. (2000). Neste trabalho, o resultado confirmou o alto nível de heterogeneidade genética entre *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

**CONCLUSÕES** – A técnica de PCR mostrou-se útil para detectar a presença do gene *phlD* nos solos do Paraná;

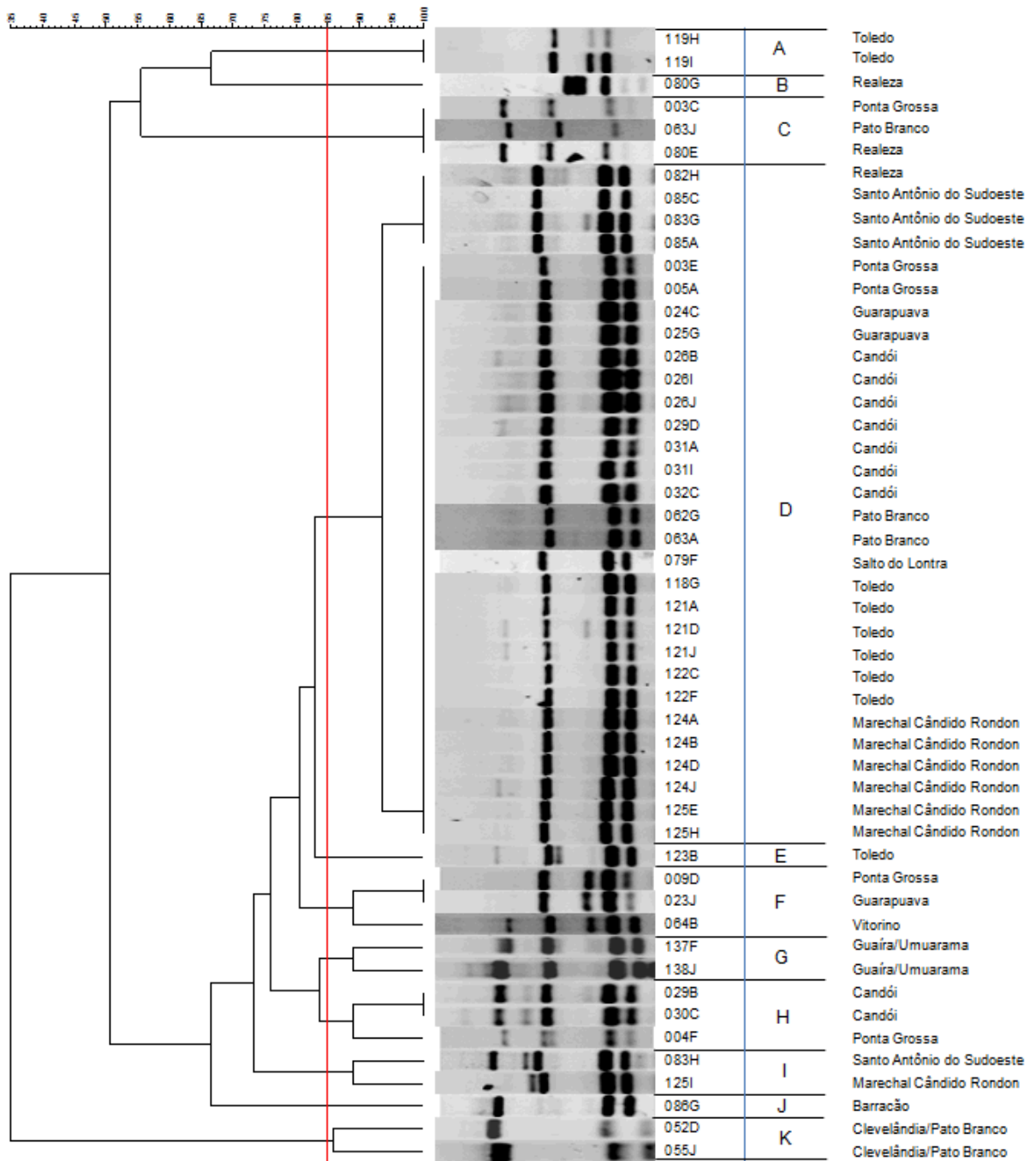
A metodologia de PCR-RFLP permitiu identificar variabilidade genética entre isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.M.R.; VIEIRA, N.D.; CATTELAN, A.J.; BETTI, A.F.F.; CARMO, K.B.; GALERANI, P.; TORRES, E. Quantificação de *Fusarium solani* e *Pseudomonas* do grupo fluorescente produtoras de 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG) em amostras de solo onde se utiliza rotação/sucessão com soja. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 27, Cornélio Procópio, 2005. Resumos. Londrina: Embrapa Soja, 2005. p.312-313. (Embrapa Soja. Documentos, 257).
- BANGERA, M.G. & THOMASHOW, L.S. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. J. Bacteriol. 181:3155-3163, 1999.
- BOTELHO, G.R. & MENDONÇA-HAGLER, L.C. Fluorescent pseudomonads associated with the rhizosphere of crops: an overview. Braz. J. Microbiol. 37:401-416, 2006.
- CLERC, A.; MANCEAU, C.; NESME, X. Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. Appl. Environ. Microbiol. 64:1180-1187, 1998.
- GARDENER, B.B.M.; GUTIERREZ, L.J.; JOSHI, R.; RICHARD EDEMA, R.; LUTTON, E. Distribution and biocontrol potential of *phlD*<sup>+</sup> pseudomonads in corn and soybean fields. Phytopathology, 95:715-724, 2005.
- GARDENER, B.B.M.; MAVRODI, D.V.; THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M. A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria. Phytopathology, 91:44-54, 2001.
- LAVILLE, J.; VOISARD, C.; KEEL, C.; MAURHOFER, M.; DÉFAGO, G.; HAAS, D.D. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. 89:1562-1566, 1992.
- PICARD, C.; DI CELLO, F.; VENTURA, M.; FANI, R.; GUCKERT, A. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. Appl. Environ. Microbiol. 66:948-955, 2000.
- RAAIJMAKERS, J.M.; VLAMI, M.; DE SOUZA, J.T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie van Leeuwenhoek, 81:537-547, 2002.
- REIS, E.M. & FORCELENI, C.A. Controle cultural. In: BERGAMIN FILHO, A.; KITAMI, H.; AMORIM, L. (Eds.), Manual de fitopatologia. 3.ed. São Paulo: Ceres, 1995. p.710-716.
- WEISBEEK, P.J. & GERRITS, H. Iron and biocontrol. In: STACEY, G. & KEEN, N.T. Plant-microbe interactions. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1999. p.217-250.
- WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIE, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173:697-703, 1991.
- WELLER, D.M. Distribution of a take-all suppressive strain of *Pseudomonas fluorescens* on seminal roots of winter wheat. Appl. Environ. Microbiol. 48:897-899, 1984.



**Figura 1.** Amostras testadas para verificação do gene *phlD*. Amostras isoladas da rizosfera de aveia (a-j), brizantão (l-o) e girassol (p-z). Seis isolados de girassol apresentaram o gene *phlD*. M – marcador.



**Figura 2.** Dendrograma dos isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes de várias regiões do Paraná e culturas diferentes, baseado na digestão do gene ribossomal 16S com a enzima de restrição *AluI*. Para a construção do dendrograma foi utilizado o algoritmo de UPGMA e a distância de Dice.