

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GIZELE PIRES DE MOURA

PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO MOLECULAR POR qPCR PARA A
QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DE *Bacillus methylotrophicus* EM RAÍZES DE SOJA

PATOS DE MINAS – MG
JANEIRO DE 2023

GIZELE PIRES DE MOURA

**PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO MOLECULAR POR qPCR PARA A
QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA DE *Bacillus methylotrophicus* EM RAÍZES DE SOJA**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia

Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

PATOS DE MINAS – MG

JANEIRO DE 2023

GIZELE PIRES DE MOURA

Padronização de ensaio molecular por qPCR para a quantificação absoluta de *Bacillus methylotrophicus* em raízes de soja

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

Banca examinadora:

Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo - UFU
Presidente

Profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira - UFU
Membro

MSc. Adriane das Graças Silva - UFU
Membro

Patos de Minas-MG, 26 de janeiro de 2023

Agradecimentos

Deixo aqui os mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte da minha jornada e que contribuíram, mesmo que com uma palavra amiga ou incentivo, para me levar ao que sou hoje.

Agradeço a Deus e Nossa Senhora, que sempre estiveram comigo, me guiando e protegendo, me dando forças nos momentos bons e ruins da minha vida.

Meu marido Hélio, gostaria de agradecer por toda compreensão, apoio, incentivo para alcançar meus objetivos, por me escutar e ser a minha plateia entusiasmada em minhas explicações mesmo sem entender nada da área de Biotecnologia.

Agradeço imensamente a Glaucia, minha irmã querida, por sempre torcer por mim, por incentivar meus sonhos e objetivos, por estar ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

A minha coordenadora Thaise, que me aceitou de braços abertos em sua equipe. Agradeço por todo o ensinamento passado, pela paciência, por ter o cuidado com a parte humana e por sempre estar me orientando da melhor forma.

A Adriane, sou grata por todo conhecimento, pela orientação e auxílio no decorrer do projeto, pelos conselhos que me fizeram crescer e evoluir na vida, acadêmica ou não. Sem você não estaria aqui hoje.

A Fernanda, por ser essa pessoa prestativa que sempre me auxiliou quando precisei.

Sou grata a Isabelle, por me compreender e estar presente nesses momentos de incerteza me dando suporte.

A Cristiane e o pessoal da empresa, sou grata por se preocuparem com meus projetos e me proporcionarem o melhor caminho.

Ao Técnico Raoni, sou grata pelo auxílio nos preparativos e nos experimentos.

A minha amiga Patrícia, que esteve comigo desde o início da minha jornada na UFU, sempre foi minha alegria diária ter você ao meu lado nas disciplinas.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a todos os demais professores e profissionais da UFU que transmitiram conhecimento, me guiaram, e expandiram meus horizontes de diversas maneiras no que se refere a essa área que amo tanto, a biotecnologia.

RESUMO

A soja (*Glycine max*), pertencente à família Fabaceae é a espécie mais amplamente cultivada no mundo e a quarta safra produzida anualmente mais importante em termos de área colhida e produção. Seu cultivo bem-sucedido depende de diferentes fatores, destacando-se o manejo eficiente de pragas e doenças, o qual pode ser alcançado com a utilização de agentes de biocontrole. A identificação e quantificação da colonização desses microrganismos benéficos, incluindo *Bacillus methylotrophicus*, vem sendo realizadas fenotipicamente. Esse estudo objetivou quantificar, por qPCR, *B. methylotrophicus* em raízes de soja utilizando oligonucleotídeos desenhados por nosso grupo de pesquisa. Em um primeiro momento foram realizadas análises qualitativas para a determinação da presença/ausência de *B. methylotrophicus* nas amostras, vislumbrando simplificar os ensaios necessários. A amplificação do gene de referência 16S foi bem-sucedida, confirmando a presença de *Bacillus* no material coletado. Realizamos a construção de uma curva padrão absoluta e, devido à complexidade do ambiente rizosférico, avaliamos as interações do *B. methylotrophicus* com outros microrganismos de biocontrole empregados comumente pela empresa parceira. Obtivemos, por qPCR, uma maior concentração de *B. methylotrophicus* quando aplicado em conjunto com *B. subtilis*. Em contrapartida, o controle não-tratado e o tratamento com o microrganismo isolado não demonstraram diferença estatisticamente significativa em sua recuperação. Além disso, sugerimos a ocorrência de uma possível competição entre *B. methylotrophicus* e *Trichoderma asperellum*. Portanto, o marcador desenvolvido para *B. methylotrophicus* se mostrou eficaz na caracterização molecular dessa espécie podendo ser aplicado em diversos estudos relacionados à identificação, interação e concentração de *B. methylotrophicus*.

Palavras-chave: Marcador molecular. *Bacillus methylotrophicus*. Controle biológico. qPCR

ABSTRACT

Soybean (Glycine max) belonging to the fabaceae family is the most widely cultivated species in the world and the fourth most important crop produced annually in terms of harvested area and production. Its successful cultivation depends on different factors, highlighting the efficient management of pests and diseases, which can be achieved with the use of biocontrol agents. The identification and quantification of the colonization of these beneficial microorganisms, including Bacillus methylotrophicus, has been carried out phenotypically. This study aimed to quantify, by qPCR, B. methylotrophicus in soybean roots using oligonucleotides designed by our research group. At first, qualitative analyzes were carried out to determine the presence/absence of B. methylotrophicus in the samples to simplify the tests. Amplification of the 16S reference gene was successful, confirming the presence of Bacillus in the collected material. We constructed an absolute standard curve and, due to the complexity of the rhizospheric environment, we evaluated the interactions of B. methylotrophicus with other biocontrol microorganisms commonly used by the partner company. We obtained, by qPCR, a higher concentration of B. methylotrophicus when applied together with B. subtilis. In contrast, the non-treated control and the treatment with the isolated microorganism showed no statistically significant difference in their recovery. Furthermore, we suggest the occurrence of a possible competition between B. methylotrophicus and Trichoderma asperellum. Therefore, the molecular marker developed for B. methylotrophicus proved to be effective in the molecular characterization of this species and can be applied in several studies related to the identification, interaction and concentration of B. methylotrophicus.

Keywords: Molecular marker. Bacillus methylotrophicus. Biological control. qPCR

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	Soja: aspectos gerais	7
1.1.1	Relevância econômica.....	7
1.1.2	Morfofisiologia.....	8
1.1.3	Fitopatógenos	10
1.2	Estratégias para o controle de fitopatógenos.....	13
1.2.1	O gênero <i>Bacillus</i>	15
1.3	<i>B. methylotrophicus</i>	16
1.4	Ferramentas moleculares na identificação de agentes de biocontrole.....	17
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	MATERIAL E METODOS	18
3.1	Experimento em casa de vegetação e extração de DNA de raiz de soja	18
3.2	PCR convencional para ensaios qualitativos	19
3.3	Construção da curva padrão absoluta e ensaios de qPCR	20
3.4	Análise Estatística	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5	CONCLUSÃO	28
	REFERÊNCIAS	29

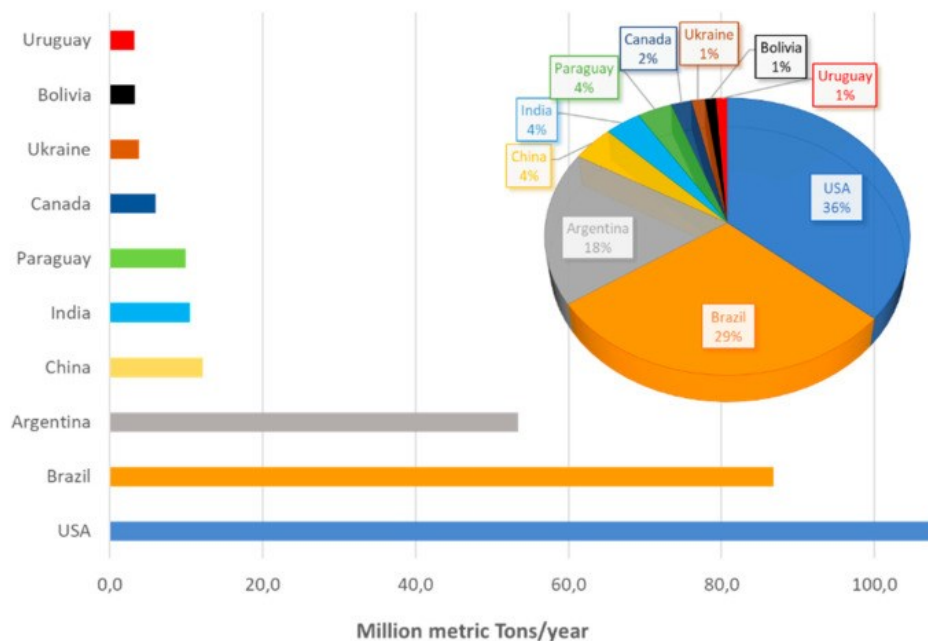
1 INTRODUÇÃO

1.1 Soja: aspectos gerais

1.1.1 Relevância econômica

A soja (*Glycine max*) está entre as culturas mais relevantes do mundo. É a quarta espécie mais importante depois do trigo (*Triticum aestivum* L.), milho (*Zea mays* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.) em termos de área colhida e produção mundial. Preconiza-se que o cultivo de soja tenha sua origem na China, mas, atualmente, sua produção acontece em diversos países do mundo (KIM et al., 2020) sendo que 7 dos 10 maiores produtores são encontrados na América do Norte e do Sul (COLLETTI et al., 2020). Atualmente, Estados Unidos, Brasil e Argentina respondem por mais de 80% da produção global (Figura 1) (FRIED; NARAYANAN; FALLEN, 2019).

Figura 1 - Líderes mundiais na produção de soja, com base nos dados anuais divulgados pela Banco de Dados Estatísticos Corporativos da Organização para Agricultura e Alimentação (FAOSTAT).



Fonte: Colletti et al., (2020)

Segundo Soterroni et al. (2019) a soja é a cultura de caixa mais importante do Brasil, com cerca de 70% da sua produção exportada mundialmente. Desta, 48% são oriundas do bioma Cerrado. Dada a alta disponibilidade de terras adequadas, o país tem potencial para se tornar o maior produtor mundial dessa leguminosa até 2025, com uma produção de 135 milhões de toneladas, superando os Estados Unidos.

A soja possui alto teor de proteínas e gordura, sendo amplamente utilizada na produção de farinha de soja, leite de soja, produtos fermentados e óleo para consumo por humanos e animais (KIM et al., 2020). Além disso, contém muitos nutrientes especiais, como isoflavonas, fitosterol e saponinas (FAN et al., 2019). De acordo com Rizzo e Baroni (2018) alimentos derivados de soja e o grão propriamente dito são soluções nutricionais comuns para vegetarianos, se mostrando versátil na produção de análogos de carne e substitutos do leite. Além disso, também se destaca como o óleo de semente mais importante do mundo, com contribuição acima de 60% para a produção total de sementes de petróleo e acima de 70% para o consumo total de farinha de proteínas destinada à refeição (FRIED, NARAYANAN, FALLEN, 2019). Desempenha um papel fundamental na agricultura sustentável, pois fixa nitrogênio (N) atmosférico com a ajuda de microrganismos (TORKAMANEH et al., 2020).

As propriedades da soja podem ser significativamente afetadas por sua região de cultivo, devido às variações de temperatura, precipitação e características do solo (KIM et al., 2020). De acordo com Fried, Narayanan e Fallen (2018) a produtividade de qualquer planta em ambiente ideal e subótimo é frequentemente controlada pela distribuição e arquitetura de seu sistema radicular, o qual desempenha papel crucial no eficiente uso de água e nutrientes pelas culturas.

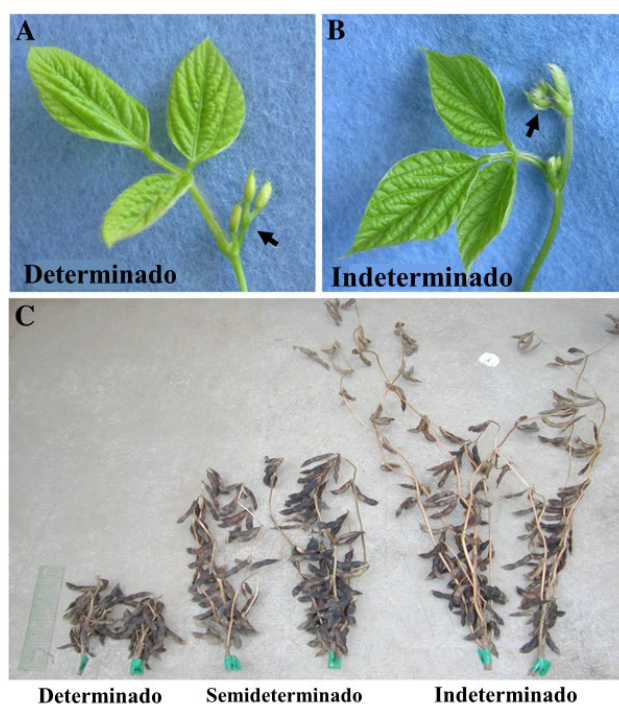
1.1.2 Morfofisiologia

No Brasil, o cultivo da soja começou a se disseminar pelo Rio Grande do Sul, sendo posteriormente transferido para outros estados dessa região, além do Centro-Oeste e, atualmente, alcança áreas próximas ao Equador. O desenvolvimento da planta é dividido em duas fases, a vegetativa e a reprodutiva. A primeira etapa se inicia com a emergência das plântulas até o início do seu florescimento. Com o término dessa fase, inicia-se a reprodutiva, com o florescimento, a formação do legume, o enchimento do grão e a maturação completa. São necessários de 50 a 55 dias após o início da fase reprodutiva para que a planta esteja morfológicamente preparada para produzir um alto rendimento de grãos (THOMAS 2018), o

qual depende diretamente do desenvolvimento de suas estruturas vegetativas como caule, ramos e folhas (COSTA; MARCHEZAN, 1982).

É uma espécie de planta com incidência anual, herbácea e de fisionomia ereta, podendo ser classificada de acordo com o modo como ocorre o desenvolvimento terminal do caule (Figura 2). Este pode ser definido como determinado, em que após a floração não surgem novos calos (Figura 2A), como indeterminado com o surgimento de ramificações após o florescimento (Figura 2B), ou como semideterminado que apresenta os dois tipos de crescimentos (Figura 2C) (NOGUEIRA, 2007). Suas flores são completas, ou seja, formadas por cálice, corola, androceu e gineceu. O fruto é do tipo vagem, sendo achatado, reto e pouco curvado, pubescente e deiscente; geralmente com 2 a 7 cm de comprimento por 1 a 2 cm de largura, apresentado espessura variável. O número de vagens por inflorescência é de 2 a mais de 20 e acima de 400 por planta. A semente é constituída de tegumento que envolve a embrião completamente desenvolvido (NOGUEIRA, 2007).

Figura 2 - Morfologia do caule de soja. (A) Caule com crescimento do tipo determinado e (B) caule com crescimento do tipo indeterminado. A seta indica a inflorescência. (C) Representação dos crescimentos do tipo determinado, semideterminado e indeterminado.



Fonte: Adaptado de Thomas (2018)

A soja possui uma temperatura ótima de crescimento e desenvolvimento em torno de 30°C (NOGUEIRA, 2007), o que torna o Brasil um país ideal para seu cultivo. Segundo Cober

et al. (2014) a indução ao florescimento ocorre pela interação entre fotoperíodo e temperatura para algumas cultivares e, para outras, depende apenas da temperatura. Para as que respondem ao fotoperíodo, a soja é uma planta de dia curto facultativa, ou seja, fotoperíodos menores que o crítico favorece seu florescimento. Por sua composição possuir 40% de proteínas, necessita de grande quantidade de nitrogênio para se desenvolver e, conseqüentemente, produzir rendimentos de 5 a 6 t/ha de grãos. Estima-se que 80 kg de N sejam necessários para produzir 1000 kg de grãos, sendo que este elemento pode ser obtido do solo, através da fixação simbiótica ou biológica do N^2 , ou de fertilizantes nitrogenados e presentes no espaço poroso do solo (THOMAS, 2018)

Finalmente, a disponibilidade hídrica é crítica para o desenvolvimento da soja, pois a semente precisa absorver no mínimo 50% do seu peso em água para assegurar sua germinação (EMPRAPA, 2006). A fase de estabelecimento das plantas na lavoura é importante para a obtenção de elevados rendimentos na produção, pois determinará o número de plantas e a sua distribuição uniforme na área, sua estatura, o desenvolvimento de ramos e o manejo de espécies daninhas e de doenças (PIRES, 2002).

1.1.3 Fitopatógenos

Ao contrário dos animais e alguns outros organismos, as plantas são sésseis, ou seja, não se locomovem e, por conseqüência, precisam suportar ou superar condições ambientais adversas para sua sobrevivência. Segundo Kerbaudy (2004) as plantas recebem estímulos do ambiente e, por meio da ativação de receptores, ocorrem mudanças metabólicas que definem sua resposta aos sinais captados. Além do clima, nutrientes e água, existem a qualidade do solo e, principalmente, a presença de microrganismos e parasitas que influenciam diretamente seu desenvolvimento (KERBAUY, 2004).

A rizosfera, ou seja, a zona estreita ao redor e influenciada pelas raízes das plantas, é considerada um dos ecossistemas mais complexos do planeta. Os organismos encontrados nesse ambiente incluem bactérias, fungos, oomicetos, nematoides, protozoários, algas, vírus, arqueas e artrópodes. A maioria dos membros do microbioma da rizosfera faz parte de uma complexa teia alimentar que utiliza nutrientes liberados pela planta, o que influencia direta e indiretamente a composição e a produtividade (ou seja, a biomassa) das comunidades vegetais naturais. Assim, a riqueza de espécies microbianas abaixo do solo foi proposta como um preditor da diversidade e produtividade das plantas acima do solo (MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013).

Os microrganismos, de modo natural, se associam a outros indivíduos para completarem seu ciclo de vida. Contudo, essas interações podem ser benéficas ou maléficas. Os microrganismos fitopatogênicos causam doenças e comprometem o desenvolvimento da planta, alterando o metabolismo das células vegetais pela liberação de enzimas e/ou toxinas, ou absorvendo nutrientes do hospedeiro (MICHEREFF, 2001). Alguns fitopatógenos podem crescer e se multiplicar no xilema ou no floema e, desse modo, bloquear o transporte de água e de nutrientes. Quando muito agressivos, são responsáveis por exterminar hectares de plantios em pouco tempo, como o fungo filamentoso *Rhizoctonia solani*, causador da podridão radicular. Esse fitopatógeno afeta diversas culturas de cereais, algodão, batata, arroz e milho (VERMA et al., 1995). Já o fungo *Fusarium ssp.* promove o amarelecimento das folhas e pode, inclusive, causar a morte da planta. Em ambiente com elevada umidade, são formados micélios brancos sobre a haste onde se encontram os clamidósporos, estruturas que promovem sua disseminação (ITO, 2013),

A soja pode ser atacada por fungos e bactérias (Tabela 1). As doenças causadas por esses organismos são de extrema relevância econômica, destacando-se os fungos *Diaporthe phaseolorum* (Cke. & Ell) var. *sojae* Wehm., *Colletotrichum dematium* (Pers. Ex Fr.) Grove var. *truncata* (Schw.) Arx., *Cercospora kikuchii* (T. Matsu & Tomoyasu) Chupp e *Phomopsis sojae* (COSTA et al., 2003). Estes afetam tanto a parte aérea da soja quanto o sistema radicular e sua disseminação ocorre através da semente ou do próprio solo proveniente de restos de cultura. São divididos em: (i) biotróficos, quando dependem das células hospedeiras para nutrição e produção dos haustórios para captar os nutrientes, sem sintomas aparentes ao hospedeiro; (ii) necrotróficos, quando causam a morte da planta através da secreção de enzimas e toxinas e (iii) hemibiotróficos, os quais vivem parte do seu ciclo de vida na forma latente e, posteriormente, exterminam o indivíduo. Existem patógenos que interferem no desenvolvimento da soja desde seu estágio inicial até sua maturação, o que acarreta um baixo rendimento ou perda das culturas produtoras (TRINDADE, 2021).

Tabela 1 - Principais doenças (patógenos causador) que acometem a cultura de soja.

	Doença	Agente de disseminação	Condições favoráveis	Sobrevivência
Fungos	Mofo branco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	Vento, chuva, sementes, animais, implemento agrícola	Temperatura entre 16°C a 22°C Alta umidade solo compactado Presença de nematoides	Sementes, restos culturais, escleródios e mais de 400 espécies de plantas hospedeiras
	Morte por fusarium (<i>Fusarium spp.</i>)	Vento, chuva, sementes, animais, implemento agrícola	Temperatura entre 20°C a 28°C Alta umidade solo compactado	Sementes e restos de cultura
	Rizoctoniose, tombamento de plântulas e morte em reboleiras (<i>Rhizoctonia solani</i>)	Vento, chuva, sementes, animais, implementos agrícolas	Baixa temperatura alta e alta umidade do solo	Sementes, escleródios, restos de cultura, ampla gama de hospedeiros e rizosfera de plantas
Bactérias	Crestamento bacteriano (<i>Pseudomonas savastanoi pv. glycinea</i>)	Vento, chuva, insetos, sementes e implementos agrícolas	Temperatura entre 20°C a 26°C Alta umidade	Sementes e restos de cultura
	Fogo selvagem (<i>Pseudomonas syringae pv. tabaci</i>)	Vento, chuva, insetos, animais, implementos agrícolas e sementes	Temperatura entre 24°C a 28° C Alta umidade	Sementes e restos de cultura
	Pústula bacteriana (<i>Xanthomonas axonopodis pv. glycines</i>)	Vento, chuva, insetos, animais, implementos agrícolas e sementes	Alta temperatura, entre 28°C a 30°C Alta umidade	Sementes e restos de cultura

Fonte: Adaptado de Ito (2013)

As bactérias, em geral, colonizam os órgãos das plantas e, apesar de poderem ser simbióticas, também causam sérios danos e perdas consideráveis, contaminando as plantações. Violatti e Tebaldi (2016) citam o agente causador da pústula bacteriana na soja, *Xanthomonas axonopodis pv. glycines*, para a qual não existem cultivares resistentes e, por não apresentar alterações fenotípicas, é responsável por problemas preocupantes e de difícil solução. A *Pseudomonas syringae pv. Tabaci* também causa infecções, penetrando no tecido da planta através das alterações causadas pela pústula bacteriana. Essa espécie libera uma toxina que se

dissemina nos tecidos causando lesões que variam em tamanho e forma, podendo formar extensas áreas de tecido morto (HENNING, 2014)

Vírus e nematoides também comprometem o desenvolvimento da soja. Os vírus mais comumente descritos são: o mosaico amarelo do feijoeiro (vírus do mesmo nome), o mosaico comum da soja (SMV)(vírus do mesmo nome), a queima do broto (vírus da necrose branca do fumo) e o mosaico anão (vírus do mosaico do amendoim bravo, *Euphorbia heterophylla* L.) (PUIGNAU, 1992). De acordo com Henning (2014) o vírus do mosaico comum da soja faz com que as plantas infectadas apresentem esse fenótipo distribuído irregularmente sobre o limbo foliar, com folhas trifolioladas encarquilhadas e com algumas bolhas. A maturação da soja é atrasada e é comum serem encontradas plantas verdes e amadurecidas em um mesmo local, afetando, assim, a colheita e produtividade.

Os fitonematoides também causam danos às lavouras e são de difícil erradicação. Dentre os de maior importância e interesse econômico para a soja destacam-se *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* (nematoides de galhas) e *Pratylenchus brachyurus* (nematóide das lesões radiculares). O ataque desses nematoides resulta na redução do tamanho das plantas, com intenso abortamento de vagens durante o florescimento e amadurecimento prematuro. A erradicação de nematoides em área infestada é extremamente difícil (CORTE et al., 2014).

Segundo Braga (2021) esses patógenos se alimentam e se reproduzem de plantas vivas, podendo migrar para a rizosfera através das raízes ou de partes aéreas, afetando as demais cultivares da lavoura. Fisiologicamente, os nematoides são atraídos para as raízes das plantas por meio de exsudatos, entrando pelas células da epiderme, onde ingerem os nutrientes provenientes do hospedeiro.

1.2 Estratégias para o controle de fitopatógenos

Tendo em vista o grande número de fitopatógenos que podem afetar o cultivo da soja, o emprego de medidas de controle que minimizem as perdas é fundamental. Dentre essas medidas, o uso de cultivares resistentes, sementes livres de patógenos, o tratamento químico e outras estratégias como a rotação de culturas visam garantir a obtenção de plantas mais saudáveis e produtivas (MERTZ; HENNING; ZIMMER, 2009; MICHEREFF, 2001).

Segundo Alzate-Marin et al. (2005) no manejo integrado de doenças e pragas, uma das estratégias preconizadas é o uso de cultivares resistentes. Estas normalmente são desenvolvidas pela transferência de alelos de resistência de fontes exóticas e, muitas vezes, não adaptadas para cultivares elite. Essa opção vem sendo usada com sucesso em programas de melhoramento há

várias décadas. A transferência de alelos exógenos é realizada, normalmente, por meio do método dos retrocruzamentos. Devido à coevolução entre hospedeiro e patógeno e o consequente surgimento de novas raças, cultivares resistentes necessitam ser continuamente desenvolvidas.

O tratamento químico é a forma mais difundida para o controle de patógenos transmitidos por sementes, compreendendo a aplicação de fungicidas, inseticidas, micronutrientes, nematicidas e polímeros (CONCEIÇÃO et al., 2014). De fato, as sementes são um dos principais veículos de disseminação e introdução de microrganismos em novas áreas de cultivo. Henning (2005) faz referência a tratamentos sanitários para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco), em que sementes são previamente tratadas antes da semeadura, sendo utilizados fungicidas de contato para tal fim. Entretanto, agentes químicos são questionados por interferirem diretamente na estrutura da comunidade microbiana do solo e raízes vegetais, alterando o equilíbrio biodinâmico. Como exemplo, Zilli et al. (2018) demonstraram que o herbicida glifosato aplicado em plantas de soja geneticamente modificadas e convencionais ocasionou um aumento da colonização das raízes por *Fusarium* spp.. Isso ocorreu devido à capacidade desse produto de inibir rizobactérias antagônicas ao fungo e fitoalexinas, e de aumentar a exsudação de aminoácidos e carboidratos no sistema radicular onde alguns microrganismos patogênicos acabam se desenvolvendo. Além disso, como o autor cita, agentes químicos contaminam solos, alimentos e consumidores, ademais conduzem à resistência de espécies indesejadas.

A rotação de cultura também pode ser adotada como, por exemplo, a alternância no plantio de trigo e soja empregada no estado do Paraná, onde, nesse caso, há o monocultivo do trigo no inverno e de soja no verão. O princípio consiste na supressão ou eliminação do substrato apropriado para o patógeno. A ausência da planta cultivada anualmente (inclusive as plantas voluntárias e os restos culturais) leva à erradicação total ou parcial dos patógenos necrotróficos que dela são nutricionalmente dependentes. Portanto, a rotação de culturas também se apresenta como uma estratégia de controle biológico, uma vez que microrganismos são decompostos. Porém, alguns resistem, como o fungo *Rhizoctonia solani*, o qual é capaz de viver indefinidamente no solo por trocar de substrato saprofítico (MICHEREFF, 2001).

À medida que aumenta a pressão pública para proteger o meio ambiente, estratégias de controle biológico de fitopatógenos são consideradas alternativas ecologicamente sólidas e economicamente viáveis às estratégias de uso de pesticidas. A competição com patógenos inclui a produção de metabólitos secundários que possuem atividade antimicrobiana ou estimulação do sistema imunológico de plantas hospedeiras (BELBAHRI et al., 2017). Portanto, os agentes

de biocontrole são uma alternativa promissora para o controle de patógenos da soja. Segundo Bettiol e Ghini (2009) o controle biológico de doenças que acometem as plantas, sendo macro ou microrganismos, consiste no combate as pragas por meio da presença no meio de inimigos naturais destas. Deste modo, são capazes de proteger a planta e em alguns casos promoverem seu crescimento. Deveras, as diferentes relações exercidas por esses microrganismos como antibiose, competição, parasitismo, predação e a indução de resistência em plantas, oferecem uma gama de oportunidades para sua utilização. Ainda, segundo os pesquisadores, se trata de uma ferramenta segura, a qual é ambientalmente mais equilibrada e conseqüentemente menos danosa à saúde humana. Nesse contexto, podem ser utilizados mais de um organismo, em sistemas dinâmicos e complexos de simbiose.

Alguns organismos, como as bactérias, podem, além de exercer o biocontrole, atuarem no crescimento das plantas hospedeiras. De acordo com Mariano et al. (2004) essas bactérias são, de modo geral, endofíticas e não fitopatogênicas. São utilizadas no tratamento de sementes, explantes e mudas micropropagadas. Atuam promovendo diretamente o crescimento pela produção de ácido cianídrico, fitohormônios, enzimas como a ACC-deaminase, mineralização de nutrientes, solubilização de fosfatos, fixação do N, aumento da absorção pelas raízes e proteção cruzada. Destacam-se as *Pseudomonas spp.*; espécies do gênero *Bacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter*, *Herbaspirilu*, *Agrobacterium radiobacter*, *Enterobacter cloacae* e *Burkholderia cepacia*, entre outras.

1.2.1 O gênero *Bacillus*

As bactérias são os microrganismos mais abundantes da rizosfera, sendo que as pertencentes ao gênero *Bacillus* se destacam por realizarem a fixação biológica de N e absorção de nutrientes. Adicionalmente, agem na germinação e emergência de plântulas e no crescimento aéreo e radicular, impactando na produtividade (BRAGA, 2021). De acordo com Bacon, Palencia e Hinton (2014) as espécies desse gênero e suas cepas endofíticas são utilizadas para a produção de antibióticos que inibem patógenos que afetam as estruturas celulares nos níveis molecular e fisiológico. Produzem compostos antifúngicos (bacilomicinas, fengicinas e surfactinas) e peptídeos antimicrobianos.

As espécies de *Bacillus* podem formar endósporos extremamente resistentes a condições ambientais severas e podem secretar metabólitos que estimulam o crescimento e a saúde das plantas. Assim, a aplicação bem-sucedida de microrganismos benéficos fornece um modelo para aumentar a tolerância ao estresse e para a adaptação às mudanças climáticas. Essas

espécies também secretam exopolícaras e sideróforos que inibem ou paralisam o movimento de íons tóxicos, auxiliando na manutenção do equilíbrio iônico, bem como na absorção de água por raízes (HASHEM; TABASSUM; ABD_ALLAH, 2019).

As cepas de *Bacillus methylotrophicus* são conhecidas como promotoras de crescimento vegetal e capazes de controlar doenças causadas por bactérias, fungos e nematoides (DIAS et al., 2015). O estudo realizado por Jemil et al. (2017) demonstrou que os lipopeptídeos sintetizados pela cepa *B. methylotrophicus* exercem considerável ação antioxidante envolvendo vários mecanismos, incluindo quelamento de íons metálicos, doação de hidrogênio ou elétrons e captura de radicais durante a peroxidação. Esses autores evidenciaram atividade antiadesiva contra a formação e desenvolvimento de biofilmes. Adicionalmente, os genes que codificam para as enzimas antibacterianas mersacidina e amilase foram encontrados no genoma de *B. methylotrophicus* (DIAS et al., 2015). De fato, a atuação de *B. methylotrophicus* é vasta e benéfica ao cultivo da soja, promovendo seu crescimento e contribuindo para o aumento da produtividade.

1.3 *B. methylotrophicus*

B. methylotrophicus é uma bactéria gram-positiva constituída por hastes moveis ($0,63-0,64 \times 1,8-2,7 \mu\text{m}$) ocorrendo de forma isolada ou em pares. As colônias na cultura são brancas cremosas, convexas, translúcidas com bordas regulares. Possuem crescimento lento em cultura variando de 0,2 mm a 0,8 mm de diâmetro após 96 horas de cultivo a 28 °C, pH=7,0 sendo estas as condições de crescimento ideal. Colonizam competitivamente as raízes vegetais e são capazes de internalizar tecidos vegetais e atuar simultaneamente como biofertilizador e antagonista (biopesticida) de patógenos radiculares reconhecidos, incluindo bactérias gram-negativas e fungos, apresentando atividades de catalase, oxidase, pectinase e protease (MADHAIYAN et al., 2010). Segundo o estudo de Wang et al. (2016) também é uma bactéria generalista no solo, que solubiliza fosfato insolúvel *in vitro*; degrada ácido ferúlico e hidrocarbonetos. Atua como biorremediador do cromo e controla muitos microrganismos patogênicos por meio da produção de metabólitos secundários ou antibióticos.

B. methylotrophicus é semelhante à *Bacillus subtilis* e é considerada um agente de controle biológico bem-sucedido devido a um estilo de vida formador de endósporos que facilita o desenvolvimento de produtos comerciais com viabilidade a longo prazo. Essas biomoléculas, além de sua atividade antimicrobiana, atuam como imunoestimuladores da planta hospedeira e ganharam importância nas áreas de biorremediação ambiental, processamento de

alimentos e fármacos (JEUKENS et al., 2015). Já foi relatada a atividade na literatura de *B. methylotrophicus* contra diferentes patógenos sendo estes: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium proliferatum*, *Aspergillus flavu*, *Aspergillus tumefaciens*, *Botrytis cinérea*, *Botryosphaeria dothidea*, *Phyllosticta ampellicida*, *Valsa ceratosperma*, *B. cinerea*, *Pyricularia orzae*, *Gloeosporium capsici*, *Fusarium graminearum*, *Colletotrichum lagenarium*, *Fulvia fulva*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia cerealis*, *Bipolaris maydis* (FRIKHA-GARGOURI et al., 2017; TUMBARSKI et al., 2018).

De acordo com Hadjinicolaou et al. (2009) a diferenciação entre *Bacillus* se baseia, tradicionalmente, na caracterização fenotípica e a identificação inequívoca requer múltiplos testes bioquímicos. Além disso, podem ser necessárias etapas adicionais nessa como um pré-enriquecimento, retardando ainda mais o processo. As limitações às técnicas tradicionais são ainda mais expressivas quando se deseja estudar a diversidade de microrganismos associada a determinado ambiente, o que exige uma maior sensibilidade dos métodos adotados.

1.4 Ferramentas moleculares na identificação de agentes de biocontrole

Métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm se destacado no manejo de culturas. A técnica foi inventada pelo bioquímico Kary Mullis em 1983, o qual ganhou o Prêmio Nobel de Química em 1993. Ao permitir amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma, viabiliza, molecularmente, a detecção de organismos ou alvos específicos em misturas heterogêneas (REIS JUNIOR, 2002). Portanto, vem sendo utilizada no diagnóstico de doenças vegetais e na detecção de patógenos. Nos estudos de Kredics et al. (2018) a técnica é explorada para o monitoramento ambiental de duas cepas de *Trichoderma* utilizada no biocontrole de *Cytospora* de pêssego. Os autores realizaram ensaios multiplex para a detecção de *T. pleuroticola* e *T. pleuroti*. Já Naef et al. (2006) exploraram a metodologia para a identificação de microsatélites para a determinação de biomassa fúngica em material vegetal em decomposição. De fato, a utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos tem se tornado uma ferramenta poderosa em ambientes agrícolas. Segundo Kredics et al. (2018) os marcadores específicos para o monitoramento de cepas de uma espécie podem ser desenvolvidos a partir de sequências com funções conhecidas. Análises filogenéticas revelaram que *B. velezensis* pertence a um grupo coespecífico constituído por *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. methylotrophicus* (NGALIMAT et al, 2021). Desse modo, a utilização de ferramentas moleculares tem se destacado na diferenciação entre espécies próximas filogeneticamente e na identificação correta de microrganismos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar e quantificar molecularmente *B. methylotrophicus* em raízes de soja.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de amplificação do material genético de *B. methylotrophicus* utilizando uma nova combinação de oligonucleotídeos desenhados por nosso grupo de pesquisa;
- Construir uma curva-padrão absoluta para a quantificação molecular de *B. methylotrophicus*;
- Identificar o aumento ou perda de agentes de biocontrole no ambiente rizosférico da soja por ensaio molecular;
- Comparar ensaios moleculares qualitativos e quantitativos na caracterização do ambiente rizosférico.

3 MATERIAL E METODOS

3.1 Experimento em casa de vegetação e extração de DNA de raiz de soja

Foram avaliadas as interações entre *B. methylotrophicus* e outros dois produtos comerciais fornecidos pela empresa parceira contendo microrganismos recomendados para controle de fitonematoides em sojas conforme Tabela 3. Sendo que a escolha dos produtos utilizados foi definida pelo grupo de pesquisa no trabalho de Silva (2021), onde, buscamos avaliar a interação e retratar o ambiente rizosférico da soja. As recomendações do fabricante foram seguidas quanto às doses de cada substância. Foram conduzidos cinco tratamentos com sete repetições em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e as plantas mantidas por 21

dias em casa de vegetação do Laboratório Lallemand Plant Care Brasil, a uma temperatura de 30 ± 2 °C.

Tabela 2 - Descrição dos tratamentos de sementes de soja com agentes de biocontrole. As doses utilizadas seguiram as recomendações do fabricante e os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação.

Tratamentos	Descrição	Dose (g ou mL/kg de semente)	Concentração inicial do isolado (UFC/g ou UFC/mL)
T1	Controle	-	-
T2	<i>B. methylotrophicus</i>	1	1×10^9
T3	<i>B. methylotrophicus</i> + <i>B. subtilis</i>	1 + 1	$1 \times 10^9 + 3 \times 10^9$
T4	<i>T. asperellum</i> + <i>B. methylotrophicus</i>	1 + 1	$1 \times 10^{10} + 1 \times 10^9$
T5	<i>T. asperellum</i> + <i>B. subtilis</i> + <i>B. methylotrophicus</i>	1+1+1	$1 \times 10^{10} + 3 \times 10^9 + 1 \times 10^9$

Fonte: a autora

As raízes de cada parcela experimental foram coletadas sem eliminar o solo adepto. No intuito de recuperar o *B. methylotrophicus*, todas as raízes foram acondicionadas em meio Luria Bertani (LB) por 24 horas sob agitação a 180 rpm sendo este empregado para o isolamento do DNA. Foi utilizado o protocolo fenol-clorofórmio já descrito previamente por CHENG e JIANG (2006), porém com algumas modificações padronizadas no laboratório (SILVA, 2021). A qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose 0,8% corado com GelRed® 1X (Biotium) e visualizado em transiluminador (Loccus Biotecnologia). A quantificação foi conduzida em espectrofotômetro a 260 nm e 280 nm (SHIMADZU UV-1280).

3.2 PCR convencional para ensaios qualitativos

Para a PCR qualitativa convencional foi, primeiramente, avaliada a amplificação do gene 16S, estabelecido como referência, de modo a comprovar a presença dos microrganismos de interesse na amostra de estudo. Os oligonucleotídeos foram desenhados para o gênero *Bacillus* (Forward: 5'TCCTACGGGAGGCAGCAGTAG3' e Reverse: 5'CGGCACCGAAAGACCAATCC3') e as reações preparadas com 200 ng de DNA genômico; GoTaq® Flexi Buffer 1 × (PROMEGA™), 200µM de dNTPs (PROMEGA™); 0,25µM de cada oligonucleotídeo; e 1 U de GoTaq® Flexi DNA polimerase (PROMEGA™). O volume foi completado com água ultrapura para 20µL. A PCR foi realizada em um

termociclador (Applied Biosystems) com desnaturação inicial a 95 ° C por 5 minutos seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 ° C por 40 segundos, anelamento a 59 ° C por 40 segundos e extensão a 72 ° C por 50 segundos. Foi incluída uma extensão final de 72 ° C por 10 minutos. Os *amplicons* foram resolvidos em gel de agarose na concentração de 1,5% corado com GelRed® 20X (Biotium™) e visualizado em transiluminador (Loccus Biotecnologia).

Para a amplificação específica de *B. methylotrophicus* foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene Metiltioribulose-1-fosfato desidratase (*MtnB*) nomeados COMB1 (Forward: 5'ATCCTTTGACAATAAGC3' e Reverse: 5'CGTTCAAGCGCGGTCGTTA3') e COMB3 (Forward: 5'CGCCTGTGACGGAGACTGTA3' e Reverse: 5'CGTTCAAGCGCGGTCGTTA3'). As condições das reações foram as mesmas estabelecidas para o gene 16S. A especificidade dos oligonucleotídeos foi avaliada em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa apresentado no trabalho de Silva (2021), onde foram realizadas comparações entre cepas de espécies diferentes de *bacillus* fornecidas pela empresa, além do próprio *B. subtilis* utilizado no presente trabalho, de modo que, os marcadores se mostrem específicos ao material em estudo.

3.3 Construção da curva padrão absoluta e ensaios de qPCR

Para os experimentos de qPCR foram utilizados os oligonucleotídeos COMB3 e a curva padrão absoluta construída. Inicialmente, utilizando uma cepa de *B. methylotrophicus* fornecida pela empresa parceira, foi realizada a PCR convencional conforme parâmetros descritos no tópico anterior. O produto amplificado de 289pb foi purificado utilizando o kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O material foi quantificado em espectrofotômetro (Bel Photonics UV M51) e o número de cópias/μL de DNA de *B. methylotrophicus* foi calculado pela fórmula
$$\frac{6,022 \cdot 10^{23} \cdot [\text{DNA}]}{\text{número de pares de base} \cdot (6,58 \cdot 10^2)}$$
 derivada de Godornes et al., 2007, com algumas adaptações. Foram, então, realizadas as diluições em série do material variando de 1×10^2 a 1×10^7 cópias de DNA/μL.

Quatro repetições referentes a cada diluição foram incluídas nas placas e os valores Cq foram retratados graficamente versus o logaritmo dos números de cópias de DNA molde iniciais análogos. A curva padrão absoluta foi construída através do coeficiente de correlação (R^2) dos alvos traçados.

Para a qPCR foram preparadas reações contendo 200 ng de DNA genômico; 5µL de PowerSYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc.) e 1µM de cada par de oligonucleotídeos. O volume foi completado com água ultrapura para 10µL. A ciclagem em foi conduzida em termociclador SetpOne Plus (Applied Biosystems) e consistiu em uma desnaturação inicial por 10 min a 95 ° C, seguida por 40 ciclos de desnaturação por 15 s a 95 ° C e etapa de anelamento-extensão por 1 min a 60 ° C. Também foi incluída a curva de dissociação com gradiente de temperatura de 0,5 ° C/s de 60 a 95 ° C para confirmar amplificações inespecíficas e formação de dímeros. Esses foram os parâmetros utilizados para a curva padrão e para a análises das amostras.

3.4 Análise Estatística

Os dados foram submetidos aos testes de homogeneidade, normalidade, independência de resíduos e análise de desvio. Para os elementos adquiridos no ensaio, o modelo que melhor se adequou com alta acurácia conforme o critério de informação de Akaike (AIC) foi o binominal negativo, ajustado do modelo linear generalizado (GLM). As médias dos tratamentos foram comparadas utilizando o teste de Tukey, sendo que, para esse modelo, GLM é $Dm = 2$ ($\log_e Ls - \log_e Lm$), onde, segundo Portet (2020) o objetivo do método LS é encontrar valores de parâmetros do modelo que minimizem a distância entre os dados e a saída do modelo e Ls é a probabilidade maximizada sob um modelo saturado. Para o presente estudo, as análises estatísticas foram executadas por meio do pacote R multcomp com um nível de significância acertado em $\alpha = 0,05$.

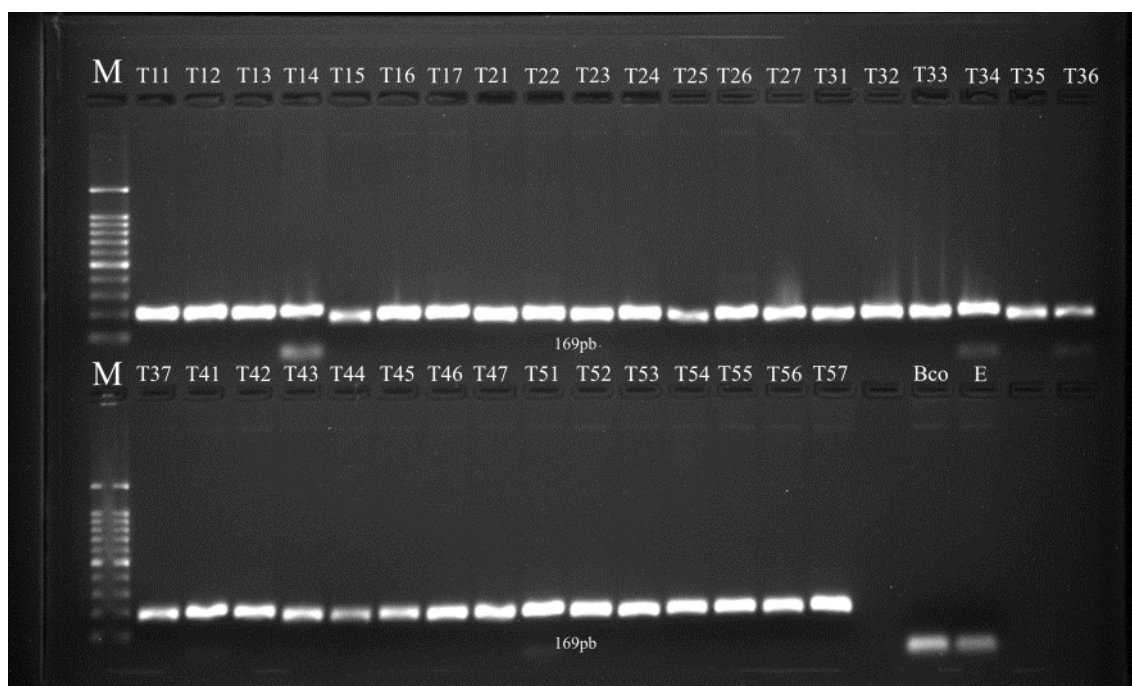
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de agentes de biocontrole no cultivo de soja tem como premissa básica sua colonização bem-sucedida no ambiente rizosférico, para que esses microrganismos possam proteger e promover o crescimento da cultivar. A espécie *B. methylotrophicus* tem se destacado no tratamento dessa Fabaceae e sua identificação e quantificação são essenciais para retratar a qualidade do microbioma do solo (JEMIL et al., 2017). Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi demonstrar, por meio de métodos moleculares, a presença de *B. methylotrophicus*

em raízes de soja em diferentes sistemas de tratamento, para que, assim, possam ser estabelecidas estratégias otimizadas de seu manejo.

Foram adotados cinco tratamentos das raízes de soja (conforme Tabela 2) e, em um primeiro momento, foi verificada a presença do gene 16S com oligonucleotídeos desenhados para o gênero *Bacillus*. De fato, as sequências gênicas relativas ao rDNA são altamente conservadas dentro de organismos vivos do mesmo gênero (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990) e o gene 16S é particularmente útil na identificação de bactérias incomuns com acurácia de 90% nos estudos em nível de gênero (WOO et al., 2008). Portanto, a detecção da banda esperada de 169 pb em todas as amostras valida o método de extração adotado e confirma a presença de *Bacillus* nos tratamentos realizados (Figura 3).

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando a amplificação do gene 16S utilizando oligonucleotídeos específicos ao gênero *Bacillus*. Todos os tratamentos demonstraram amplificação do fragmento esperado de 169 pb. **M**: Marcador de peso molecular de 100 pb; **T**: tratamentos. O primeiro número indica o tratamento realizado e o segundo número sua repetição (replicata). **Bco**: controle negativo da reação; **E**: segundo controle negativo.



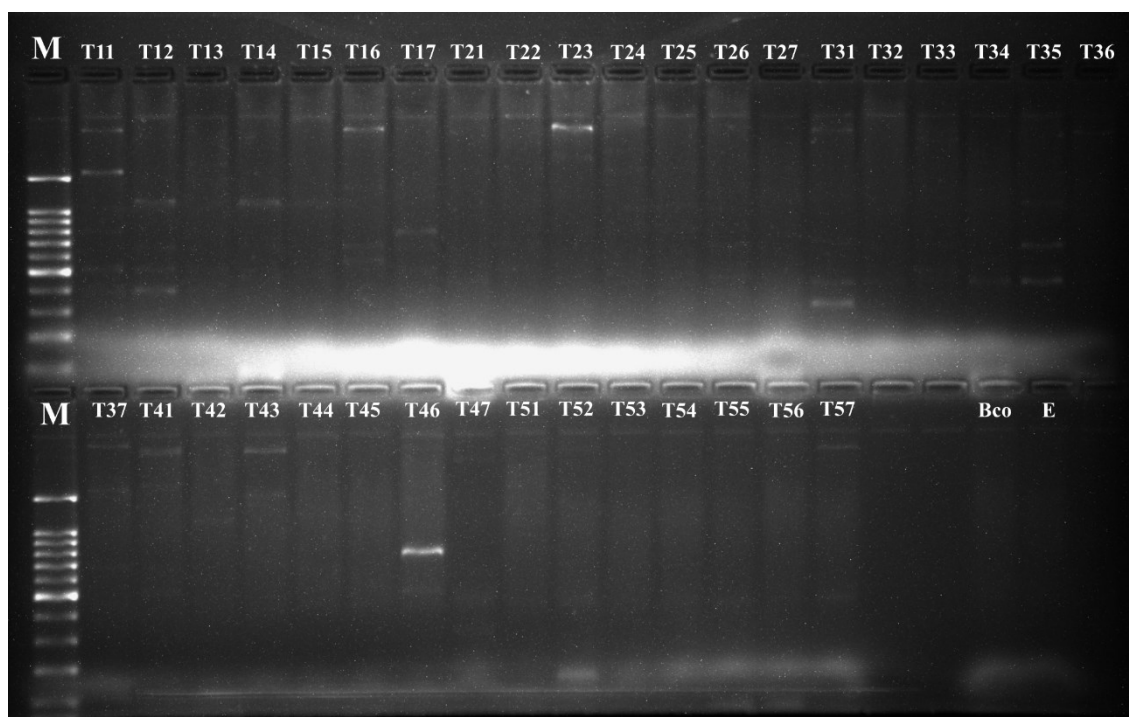
Fonte: a autora

Os métodos de identificação e quantificação de microrganismos dependente de cultura são limitantes para alguns grupos, como os do gênero *Bacillus*, devido à alta similaridade morfológica entre as diferentes espécies (MCSPADDEN GARDENER, 2004). Nesse contexto, a notação dos genomas bacterianos permite que os cientistas explorem técnicas moleculares, conhecidamente sensíveis, específicas e robustas. De fato, a PCR, fornece uma visão única

sobre a riqueza, composição e estrutura da comunidade microbiana (FATIMA; PATHAK; VERMA, 2014). Estratégias baseadas em biologia molecular, como as adotadas no presente estudo, demonstram a precisão necessária e fornecem informações importantes para elucidar, indiretamente, as interações no ambiente de interesse.

Foram escolhidos dois pares de oligonucleotídeos específicos para o gene *MtnB* previamente desenhados pelo grupo de pesquisa. Este gene se refere a via de recuperação de metionina, que, segundo Kang et al. (2013), é encontrada em todos os organismos, de bactérias a plantas e animais. Seu papel é reciclar a 5'-metiltiadenosina (MTA), a qual é um subproduto do processo de síntese de metionina a partir de poliamina. MtnB é a terceira enzima na via e catalisa a desidratação de MTRu-1-P (5-metiltioribulose-1-fosfato) para DK-MTP-1-P (2,3-diceto-5-metiltiopentil-1-fosfato). A MtnB é uma hidro-liase que recicla o enxofre presente em MTA (ASHIDA et al., 2008). Os oligonucleotídeos nomeados COMB1 foram utilizados para a amplificação do fragmento de 336 pb (Figura 4) por PCR convencional com a separação em eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualização no fotodocumentador.

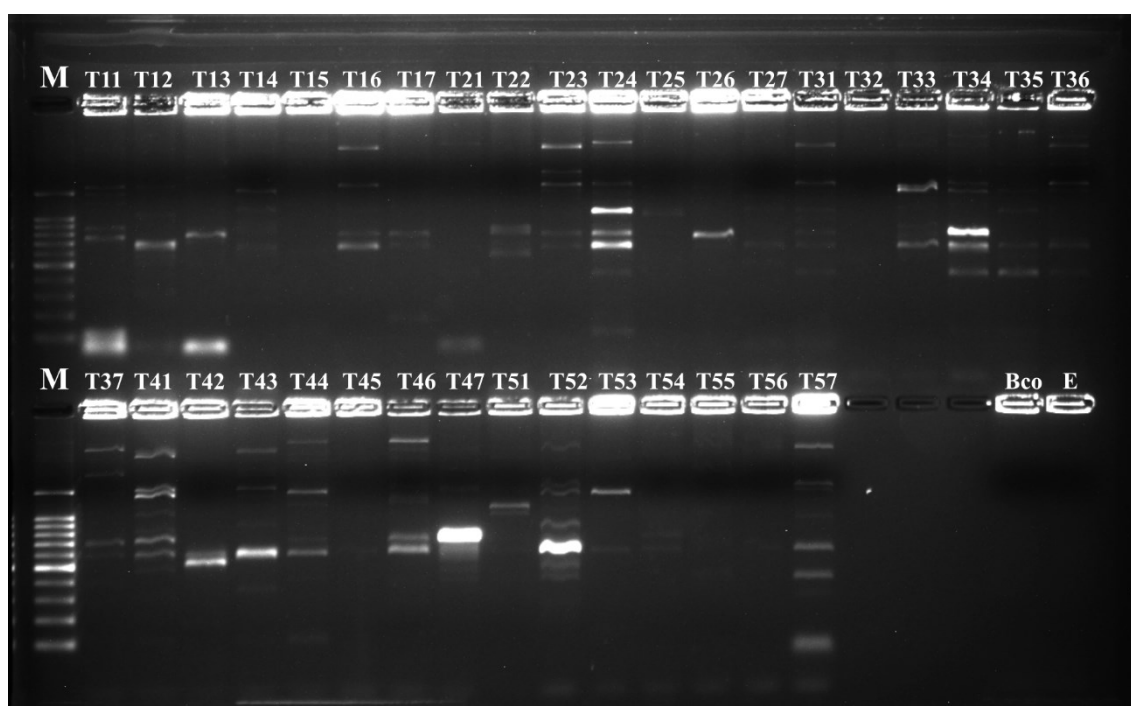
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando amplificação da COMB1 utilizando oligonucleotídeos específicos ao gênero *Bacillus methylotrophicus*. Apenas T31 demonstrou amplificação do fragmento esperado de 336 pb. **M**: Marcador de peso molecular de 100 pb; **T**: tratamentos. O primeiro número indica o tratamento realizado e o segundo número sua repetição (replicata). **Bco**: controle negativo da reação; **E**: segundo controle negativo.



Fonte: a autora

Pode-se observar que não foram constatadas bandas específicas para *B.methyilotrophicus* entre os diferentes tratamentos, o que exigiu o teste de outros oligonucleotídeos. Nesse contexto, os *primers* nomeados COMB3 (239pb) também foram avaliados (Figura 5). Novamente, não foram obtidos amplicons específicos.

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando amplificação da COMB3 utilizando oligonucleotídeos específicos ao gênero *Bacillus methyilotrophicus*. Nenhum dos tratamentos demonstrou amplificação do fragmento esperado de 289 pb. **M**: Marcador de peso molecular de 100 pb; **T**: tratamentos. O primeiro número indica o tratamento realizado e o segundo número sua repetição (replicata). **Bco**: controle negativo da reação; **E**: segundo controle negativo.



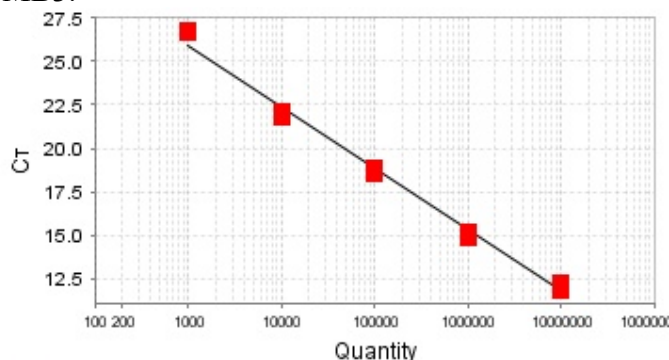
Fonte: a autora

Diversos fatores podem interferir e direcionar uma amplificação de DNA de forma bem-sucedida. Em nosso estudo, a PCR convencional foi utilizada como método qualitativo, pois a visualização da amplificação só ocorreu após o término do processo, através da formação das bandas específicas no gel de agarose. Em contrapartida, os ensaios de qPCR podem oferecer um meio de identificação quantitativo com maior sensibilidade e especificidade (HADJINICOLAOU et al., 2009). De fato, em estudo anterior, COMB1 se mostrou específica a *B. methyilotrophicus* quando realizada através da qPCR (SILVA, 2021). Portanto, inferimos que os reagentes e a técnica utilizada são essenciais para a obtenção de *amplicons* específicos. Por fim, sugerimos que a quantidade de microrganismos de interesse presentes nas amostras

seja inferior ao esperado e, devido à sensibilidade da qPCR, essa técnica seja recomendada aos objetivos do estudo.

Primeiramente, construímos a curva padrão absoluta referente aos oligonucleotídeos COMB3 (Figura 6). A variação dos pontos da curva foi estabelecida a partir de 1×10^2 cópias de DNA/ μL até 1×10^7 cópias de DNA/ μL de *B. methylotrophicus*. Obtivemos um $R^2 > 0,991$ com uma eficiência de amplificação do material de 92,2% e *Threshold* estabelecido de 0,238476, ou seja, na fase exponencial da amplificação. Portanto, os dados aqui logrados comprovam a acurácia da curva padrão para quantificação absoluta de amostras desconhecidas.

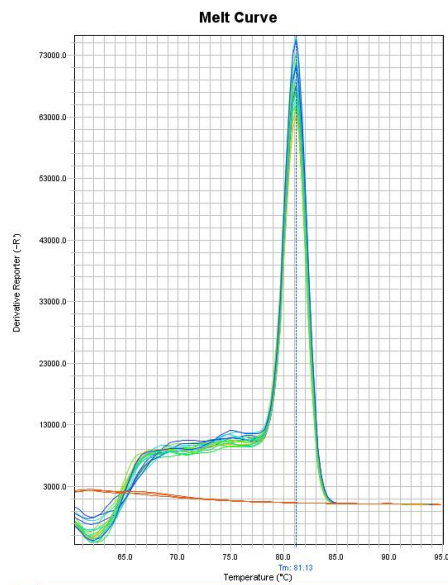
Figura 6. Curva padrão absoluta para a quantificação de DNA de *B. methylotrophicus* utilizando os *primers* COMB3.



Fonte: a autora

Ademais, a especificidade dos marcadores foi igualmente confirmada por meio da análise de uma curva de dissociação. Observamos que a amplificação da amostra obteve um pico apurado em temperatura maior que 81 °C (Figura 7). Além disso, poços em que não foi incluído o DNA não foi observada amplificação, reforçando a otimização dos parâmetros necessários para a condução de ensaios de qPCR.

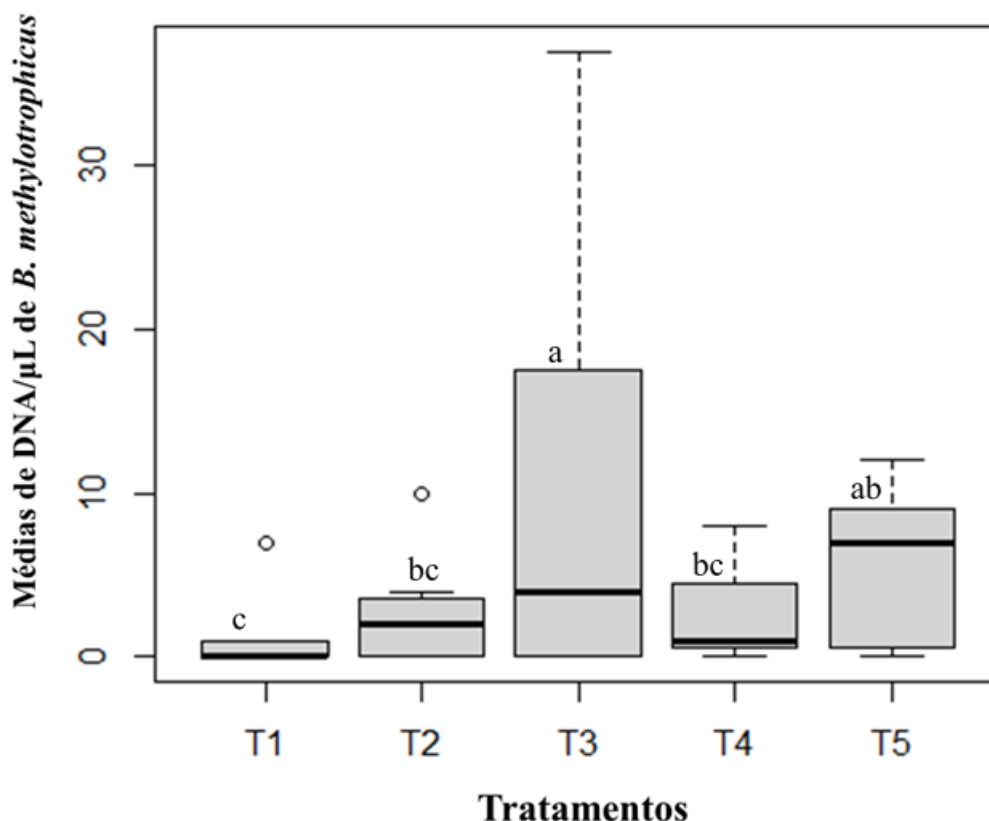
Figura 7 - Curva de dissociação da amplificação referente as amostras de diluição seriada de *B. methylotrophicus* com os marcadores moleculares da COMB3.



Fonte: a autora

O material genético extraído do experimento em casa de vegetação foi, então, submetido à quantificação por qPCR utilizando os oligonucleotídeos COMB3 (Figura 8). Os tratamentos não apresentaram normalidade e homogeneidade quanto à quantificação do DNA/ μ L de *B. methylotrophicus*, sendo que o tratamento T1 (controle) não diferiu de T2 (tratamento apenas com *B. methylotrophicus*) e de T4 (*B. methylotrophicus* + *T. asperellum*).

Figura 8 - Quantificação absoluta de DNA de *B. methylotrophicus* extraído das raízes de soja mantidas em casa de vegetação. T se refere aos tratamentos realizados sendo (T1) Controle, (T2) *B. methylotrophicus*, (T3) *B. methylotrophicus* e *B. subtilis*, (T4) *B. methylotrophicus* e *T. asperellum* e (T5) *B. methylotrophicus*, *B. subtilis* e *T. asperellum*. Letras diferentes representam diferença estatística.



Fonte: a autora

Os tratamentos T3 e T5 diferiram estatisticamente do controle. Estes resultados evidenciam a importância de *B. subtilis* na recuperação de uma maior quantidade de DNA de *B. methylotrophicus*. Além disso, T3 e T5 diferiram pela presença de *T. asperellum* em T5, o qual pode ter influenciado negativamente na quantificação de *B. methylotrophicus*. O estudo desenvolvido por Karuppiyah et al. (2019), o qual utilizou *T. asperellum* em co-cultivo com *B. amyloliquefaciens*, demonstrou a influência do perfil metabólico na população de microrganismos. Os autores observaram a interação competitiva entre *T. asperellum* e *B. amyloliquefaciens*, o que influenciou na taxa de crescimento, na expressão diferencial de genes vitais e na presença de metabólitos durante o processo de fermentação realizado. No estudo de Dunlap et al. (2016) a análise genômica comparativa demonstrou apenas pequenas diferenças existentes entre cepas e os genomas de *B. velezensis*, *B. methylotrophicus* e *B. amyloliquefaciens*. Devido à essa similaridade entre *B. methylotrophicus* e *B. amyloliquefaciens*, sugerimos que a competição com *T. asperellum* possa ter também ocorrido

no ambiente rizosférico das sojas cultivadas no presente estudo. Nossos dados evidenciam a importância de se otimizar a população a ser incorporada em diferentes produtos destinados ao tratamento dessa leguminosa.

5 CONCLUSÃO

A PCR é sensível e aplicável à identificação de *B. methylotrophicus*. Contudo, o método convencional não apresentou a acurácia necessária sendo a qPCR mais adequada para a quantificação molecular de *B. methylotrophicus*. Ao realizar a quantificação absoluta do DNA desse *Bacillus* em raízes de soja mantidas em casa de vegetação, observamos a importância da associação de *B. methylotrophicus* com *B. subtilis* e que a influência de *T. asperellum* precisa ser amplamente estudada, pois pode interferir diretamente no microbioma do ambiente rizosférico.

REFERÊNCIAS

ALZATE-MARIN, Ana Lilia et al. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, [s. l], v. 4, n. 30, p. 333-342, fev. 2005.

ASHIDA, H. et al. Enzymatic Characterization of 5-Methylthioribulose-1-phosphate Dehydratase of the Methionine Salvage Pathway in *Bacillus subtilis*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 72, n. 4, 2008/04/23, p. 959-967. 2008.

BACON, Charles W.; PALENCIA, Edwin R.; HINTON, Dorothy M.. Abiotic and Biotic Plant Stress-Tolerant and Beneficial Secondary Metabolites Produced by Endophytic *Bacillus* Species. **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets**, [S.L.], p. 163-177, 4 out. 2014. Springer India. http://dx.doi.org/10.1007/978-81-322-2068-8_8.

BELBAHRI, Lassaad et al. Comparative Genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* Strains Reveals a Core Genome with Traits for Habitat Adaptation and a Secondary Metabolites Rich Accessory Genome. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. 1438, p. 1-15, 3 ago. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01438>.

BETTIOL, Wagner; GHINI, Raquel. Impacto das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo A. B. (ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. Cap. 3. p. 1-341.

BRAGA, Adeliâne Ferreira. **INTERAÇÃO DE *Trichoderma asperellum* E *Bacillus spp.* UTILIZADOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS NA SOJA**. 2021. 35 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioenergia e Grãos, Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2021

CONCEIÇÃO, Gersa Massuquini et al. DESEMPENHO DE PLÂNTULAS E PRODUTIVIDADE DE SOJA SUBMETIDA A DIFERENTES TRATAMENTOS QUÍMICOS NAS SEMENTES. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 30, n. 6, p. 1711-1720, dez. 2014.

COSTA, J.A.; MARCHEZAN, E. **Características dos estádios de desenvolvimento da soja Campinas**: Fundação Cargil, 1982. 30p.

CHENG, H.-R. e JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 1, p. 55-59. 2006. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-4688-z>

COBER, E.R.; CURTIS, D.F.; STEWART, D.W.; MORRISON, M.J. 2014. Quantifying the effects of photoperiodic, temperature and daily irradiance of flowering time of soybean isolines. **Plants**, v.3, p.476-497.

COLLETTI, Alessandro et al. Valorisation of By-Products from Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Processing. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 9, p. 2129-1, 1 maio 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25092129>.

COSTA, Nilton Pereira da et al. QUALIDADE FISIOLÓGICA, FÍSICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE SOJA PRODUZIDAS NO BRASIL. **Revista Brasileira de Sementes**, [S.I.], v. 25, n. 1, p. 128-132, 29 jul. 2003.

CORTE, Gerson dalla et al. Tecnologia de aplicação de agrotóxicos no controle de fitonematoides em soja. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 44, n. 9, p. 1534-1540, set. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20130738>.

DIAS, L. et al. The lanthipeptides of *Bacillus methylotrophicus* and their association with genomic islands. **Systematic And Applied Microbiology**, [S.L.], v. 38, n. 8, p. 525-533, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2015.10.002>.

DUNLAP, Christopher A. et al. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 66, n. 3, p. 1212-1217, 1 mar. 2016. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.000858>.

EMPRAPA, 2006. Sistema de produção 11: tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2007. Londrina: **EMBRAPA SOJA**, 2006. 225P.

FAN, Yuanfang et al. Soybean (*Glycine max* L. Merr.) seedlings response to shading: leaf structure, photosynthesis and proteomic analysis. **Bmc Plant Biology**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 34, 21 jan. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-019-1633-1>.

FATIMA, Faria; PATHAK, Neelam; VERMA, Smita Rastogi. An Improved Method for Soil DNA Extraction to Study the Microbial Assortment within Rhizospheric Region. **Molecular Biology International**, [S.L.], v. 2014, p. 1-6, 15 set. 2014. Hindawi Limited .<http://dx.doi.org/10.1155/2014/518960>.

FRIED, Harrison Gregory; NARAYANAN, Sruthi; FALLEN, Benjamin. Characterization of a soybean (*Glycine max* L. Merr.) germplasm collection for root traits. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 7, p. e0200463, 11 jul. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0200463>.

FRIED, Harrison Gregory; NARAYANAN, Sruthi; FALLEN, Benjamin. Evaluation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] genotypes for yield, water use efficiency, and root traits. **Plos One**, [S.L.], v. 14, n. 2, e0212700, 22 fev. 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0212700>.

FRIKHA-GARGOURI, Olfa. et al. Antibiosis and bmyB Gene Presence As Prevalent Traits for the Selection of Efficient *Bacillus* Biocontrol Agents against Crown Gall Disease. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 5-6, 14 ago. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2017.01363>

FREEMAN, S. et al. Use of *Trichoderma* spp. for biocontrol of *Colletotrichum acutatum* (anthracnose) and *Botrytis cinerea* (grey mould) in strawberry, and study of biocontrol population survival by PCR. **IOBC WPRS Bull.** 2002, v. 25, p. 167–170.

GODORNES, C. et al. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Cytokine*, 38(1), 1-7, doi:10.1016/j.cyto.2007.04.002. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.04.002>

GOLDENBERGER, Daniel; SCHMIDHEINI, Tobias; ALTWEGG, Martin. Detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* by a simple and rapid procedure using broad-range PCR amplification and direct single-strand sequencing of part of the 16S rRNA gene. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 240-245, abr. 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.1997.tb00604.x>.

HADJINICOLAOU, Andreas V. et al. Use of molecular beacons and multi-allelic real-time PCR for detection of and discrimination between virulent *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* isolates. **Journal Of Microbiological Methods**, [S.I.], v. 78, n. 1, p. 45-53, jul. 2009.

HASHEM, Abeer; TABASSUM, Baby; ABD_ ALLAH, Elsayed Fathi. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], ano 2019, p. 1291-1297, 20 maio 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>.

HENNING, Ademir Assis. **Patologia e tratamento de sementes**: noções gerais. 2. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 52 p.

HENNING, Ademir Assis. **Documentos 256**: manual de identificação de doenças de soja. 5. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 76 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/991687/1/Doc256OL.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2022.

ITO, Margarida Fumiko. PRINCIPAIS DOENÇAS DA CULTURA DA SOJA E MANEJO INTEGRADO. **Nucleus**, [S.L.], v. 3, n. 3, p. 83-101, 7 jun. 2013. Fundacao Educational de Ituverava. <http://dx.doi.org/10.3738/nucleus.v0i0.908>

JEMIL, Nawel et al. Antioxidant properties, antimicrobial and anti-adhesive activities of DCS1 lipopeptides from *Bacillus methylotrophicus* DCS1. **Bmc Microbiology**, [S.I.], v. 17, n. 1, p. 144, jun. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1050-2>

JEUKENS, Julie et al. Draft Genome Sequences of Two Lipopeptide-Producing Strains of *Bacillus methylotrophicus*. **Genome Announcements**, [S.L.], v. 3, n. 5, 29 out. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/genomea.01176-15>.

KANG, Wonchull et al. Structural and biochemical basis for the inhibition of cell death by APIP, a methionine salvage enzyme. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 111, n. 1, p. 54-61, 23 dez. 2013. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1308768111>.

KARUPPIAH, Valliappan et al. Simultaneous and sequential based co-fermentations of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and *Bacillus amyloliquefaciens* 1841: a strategy to enhance the gene expression and metabolites to improve the bio-control and plant growth promoting activity. **Microbial Cell Factories**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-16, 29 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-019-1233-7>.

KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004. 452 p.

KREDICS, László et al. Molecular Tools for Monitoring *Trichoderma* in Agricultural Environments. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 9, n. 1599, p. 1-17, 25 jul. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01599>.

KIM, So-Yeon et al. Discrimination of Cultivated Regions of Soybeans (*Glycine max*) Based on Multivariate Data Analysis of Volatile Metabolite Profiles. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 763, 10 fev. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25030763>.

MCSPADDEN GARDENER, B. B. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1252-1258. 2004.

MARIANO, Rosa de Lima Ramos et al. IMPORTÂNCIA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS PARA UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, jan. 2004

MADHAIYAN, Munusamy et al. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s. l], v. 60, n. 10, p. 2490-2495, 01 out. 2010.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia**. 2001. Desenvolvida por UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO. Disponível em: <https://www.bibliotecaagptea.org.br/agricultura/defesa/livros/FUNDAMENTOS%20DE%20FITOPATOLOGIA.pdf>. Acesso em: 2 jan. 2022.

MENDES, Rodrigo; GARBEVA, Paolina; RAAIJMAKERS, Jos M.. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 37, n. 5, p. 634-663, set. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12028>

MERTZ, Liliane Marcia; HENNING, Fernando Augusto; ZIMMER, Paulo Dejalma. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 13-18, fev. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782009000100003>.

NAEF, Andreas et al. A microsatellite based method for quantification of fungi in decomposing plant material elucidates the role of *Fusarium graminearum* DON production in the saprophytic competition with *Trichoderma atroviride* in maize tissue microcosms. **Fems Microbiology Ecology**, [S.L.], v. 55, n. 2, p. 211-220, fev. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00023.x>.

NGALIMAT, Mohamad Syazwan et al. A Review on the Biotechnological Applications of the Operational Group *Bacillus amyloliquefaciens*. **Microorganisms**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 614, 17 mar. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9030614>.

NOGUEIRA, Ana Paula Oliveira. **Análise discriminante na caracterização de novos descritores em soja [Glycine Max (L.) Merrill]**. 2007. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

OZER, Egon A. et al. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGEnt. **Bmc Genomics**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-17, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-737>.

PIRES, J.L.F. 2002. **Estimativa do potencial produtivo da soja e variabilidade espacial de área de produção**. Tese (Doutorado – Plantas de Lavoura) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre. 136p.

PORTET, Stéphanie. A primer on model selection using the Akaike Information Criterion. **Infectious Disease Modelling**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 111-128, 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idm.2019.12.010>.

PUIGNAU, Juan P.. **Producción de soja**. Montevideo: IICA - Procisur, 1992. 261 p.

RIZZO, Gianluca; BARONI, Luciana. Soy, Soy Foods and Their Role in Vegetarian Diets. **Nutrients**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 43, 5 jan. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu10010043>

REIS JUNIOR, Fabio Bueno dos et al. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 33 p

SILVA, Adriane das Graças. **IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Bacillus methylotrophicus* EM RAÍZES DE SOJA**. 2021. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2021.

SOTERRONI, Aline C. et al. Expanding the Soy Moratorium to Brazil's Cerrado. **Science Advances**, [S.L.], v. 5, n. 7, p. aav7336, jul. 2019. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.aav7336>.

THOMAS, A. L. Soja: tipos de crescimento da planta. v., n., p. 59, Porto Alegre: **UFRGS**, 2018.

TORKAMANEH, Davoud et al. Soybean (*Glycine max*) Haplotype Map (GmHapMap): a universal resource for soybean translational and functional genomics. **Plant Biotechnology Journal**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 324-334, 14 set. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/pbi.13466>.

TRINDADE, M. M. S. **Mecanismo de defesa e resistência das plantas a agentes patogênicos**. 2021. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônoma) - Universidade de Évora, Évora, 2021.

TUMBARSKI, Yulian et al. ANTIFUNGAL EFFECT OF A BACTERIOCIN OF BACILLUS METHYLOTROPHICUS BM47 AND ITS POTENTIAL APPLICATION AS A BIOPRESERVATIVE IN TRADITIONAL BULGARIAN YOGURT. **Journal Of Microbiology**, Biotechnology And Food Sciences, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 659-662, 1 ago. 2018. Slovak University of Agriculture in Nitra. <http://dx.doi.org/10.15414/jmbfs.2018.8.1.659-662>.

VERMA, B. et al. Characterization of Rhizoctonia spp. isolates, disease occurrence and management in various crops. In: SNEH, B. et al. **Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular biology, ecology, pathology and disease control**. [s.l.], 1995. p. 247- 391

VIOLATTI, Marcela Ribeiro; TEBALDI, Nilvanira Donizete. Detecção de Xanthomonas axonopodis pv. glycines em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 268-270, set. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/2127>.

WANG, Chengqiang et al. Draft Genome Sequence of Bacillus methylotrophicus FKM10, a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Isolated from Apple Rhizosphere. **Genome Announcements**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. [S.I.], 25 fev. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/genomea.01739-15>.

WOO, P.C.y. et al. Then and now: use of 16s rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 14, n. 10, p. 908-934, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L.. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya.. Proceedings Of The National Academy Of Sciences, [S.L.], v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1 jun. 1990. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>.

ZILLI, Jerri Édson et al. Efeito de glyphosate e imazaquin na comunidade bacteriana do rizoplane de soja (Glycine max (L.) Merrill) e em características microbiológicas do solo. **Rev. Bras. Ciên. Solo: Biologia do solo**, [S.I.], v. 32, n. 2, p. [S.I.], abr. 2018. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000200018>