



ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS EFICIENTES (ME)

Laura da Silva Zacarias¹, Josiane Ap. Gomes-Figueiredo¹

¹Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos (LAGEM) -
Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR) *Campus*
Paranaguá/Paranaguá, PR.

Palavras-chave: Agricultura Orgânica, Identificação molecular, UNESPAR

Resumo: Os Microrganismos Eficientes (ME) consistem em culturas mistas que podem ser usados como inoculantes, pois promovem crescimento vegetal e aumentam a produtividade agrícola. Embora sejam produzidos comercialmente, o método de caldos fermentados caseiros é muito utilizado por pequenos agricultores familiares. O objetivo foi avaliar a variabilidade genética de leveduras isoladas a partir de três caldos fermentativos (M, R1 e R2). Foram inoculados 200 µL de cada caldo em placas de Ágar Sabouraud contendo fungicida Tiofanato de Metila. Após incubação a 28°C por 7 dias, os isolados foram transferidos e preservados. Foi realizada a extração de DNA com protocolo utilizando Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) (CTAB 2,0%, NaCl 5M, EDTA pH 8,0 20 mM, Tris-HCl pH 8,0 100 mM e H₂O ultrapura) dos isolados purificado. O DNA foi analisado quanto à sua qualidade, quantidade e viabilidade de amplificação. As amostras foram amplificadas por PCR utilizando o oligonucleotídeo microssatélite [GTG]⁵ numa reação final de 12,5 µL submetidas a três ciclos de 94°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguindo-se 34 ciclos de 94°C por 10 segundos, 40°C por 20 segundos e 72°C por 2 minutos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. As análises de bandas foram realizadas utilizando o programa Past4. Para estimar a distância genética foi usado o coeficiente de similaridade de Jaccard e as análises de agrupamento pelo método UPGMA. Foram isolados 17 microrganismos leveduriformes. A extração de DNA foi bem-sucedida. A razão OD 260/OD 280 mostrou concentrações superiores a 1000 ng/µl em 88,24% dos isolados, no entanto, precisou de tratamento com RNase. As análises de agrupamento confirmaram a diversidade genética e formaram quatro grupos distintos: Grupo 1 com isolados R2I e R2G apenas do caldo R2; Grupo 2 com R2F, R2D, R1C, R1B, R1Aa, Ml e Mh, isolados dos três caldos; Grupo 3 com Mg e Me do caldo M; e Grupo 4 com Mc, Mb e Ma do caldo M. A partir daqui, consideramos seguir para o processo de sequenciamento dos genes de isolados tendo em vista a alta variabilidade genética.

Apoio financeiro: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (FA).