

X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DOS GENES DE NODULAÇÃO (*NOD*) NO DNA GENÔMICO DE *Burkholderia phenoliruptrix* CLA1

Nayanne Hardy Lima Pontes¹; Rodrigo Maranguape Silva da Cunha²; Antônio Francisco de Sousa³

¹Estudante do Curso de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular Aplicadas, com Ênfase em Saúde, Meio Ambiente e Agropecuária – UVA; E-mail: nayannelima@hotmail.com, ²Coordenador do Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS – UVA, ³Docente/pesquisador do Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS – UVA. E-mail: francisco-bio@hotmail.com.

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio atmosférico por rizóbios é atualmente uma excelente alternativa natural de adubação nitrogenada no cultivo de leguminosas de importância comercial. Dentre os gêneros de rizóbios empregados como inoculantes de leguminosas podemos citar o gênero *Burkholderia*. Estas bactérias estabelecem nas raízes de leguminosas, estruturas chamadas de nódulos, em cujo interior ocorre à fixação biológica do nitrogênio atmosférico. O processo de nodulação no rizóbio é iniciado pelos fatores Nod os quais promovem o desenvolvimento do nódulo. Estes fatores são codificados por um grupo de genes chamados de *nodABCD*. Objetivou-se com este trabalho verificar a presença dos genes de nodulação (*nodABCD*) na estirpe *Burkholderia phenoliruptrix* CLA1. A estirpe CLA1 estudada neste trabalho é oriunda da coleção de rizóbios do gênero *Burkholderia* isolada de nódulos de raízes de *Mimosa flocculosa* do cerrado brasileiro. A verificação da presença dos genes de nodulação no DNA de CLA1 foi realizada por meio da técnica de PCR em Tempo Real (RT-qPCR). Foi verificado que os genes de nodulação (*nodABCD*) estão presentes em CLA1, evidenciando o potencial do uso desta bactéria como inoculante microbiano para o cultivo de leguminosas.

Palavras-Chave: *Burkholderia*; Fixação de Nitrogênio; Genes *nod*

INTRODUÇÃO

O nitrogênio corresponde o nutriente exigido em maior quantidade, estimando-se que para a produção de 1000 kg de soja seja necessário cerca de 80 kg de nitrogênio (EMBRAPA, 2010). A fixação biológica de nitrogênio atmosférico por rizóbios é atualmente uma excelente alternativa natural de adubação nitrogenada no cultivo de leguminosas de importância comercial como a soja (*Glycine max* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L) e amendoim (*Arachis hypogaea* L.).

Em comparação com o emprego de fertilizantes nitrogenados, estes apresentam um custo muito mais elevado além de ser uma fonte de poluição ambiental, uma vez que são estimados a necessidade de 6 barris de petróleo para produção de 1 tonelada de NH₃ sintetizada, além disso, vale ressaltar que as plantas são pouco eficientes na absorção desses fertilizantes (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001).

Dentre os gêneros de rizóbios empregados como inoculantes de leguminosas podemos citar o gênero *Burkholderia*. Estas bactérias estabelecem nas raízes de leguminosas, estruturas chamadas de nódulos, em cujo interior ocorre à fixação biológica do nitrogênio atmosférico (MENNA et al., 2006).

O processo de nodulação no rizóbio é iniciado pelos fatores Nod (lipo-quitto-oligossacarídeos) os quais promovem o desenvolvimento do nódulo (OLIVEIRA, 2009). Estes fatores são codificados por um grupo de genes chamados de *nodABCD*.

De acordo com o exposto objetivou-se com este trabalho verificar a presença dos genes de nodulação (*nodABCD*) na estirpe *Burkholderia phenoliruptrix* CLA1.

METODOLOGIA

A estirpe CLA1 estudada neste trabalho é oriunda da coleção de beta-rizóbios do gênero *Burkholderia* do Dr. Cláudio de Oliveira Cunha (pesquisador do CNPq, Brasília, DF, Brasil) isolada de nódulos de raízes de *Mimosa flocculosa* do cerrado brasileiro.

A bactéria armazenada a -80°C foi inicialmente ativada por meio de um cultivo inicial em meio caldo TY (yeast-tryptone) na temperatura de 28°C e 250 rpm (TOLEDO; MARCONDES; LEMOS, 2009).

A extração de DNA de CLA1 foi realizado de acordo com Menna et al. (2006). A concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria (GenQuant, GE Healthcare®), com leituras das absorbâncias a 260 nm de acordo com a fórmula: Concentração do DNA=leitura de A260nm x diluição da amostra x 50ng/μl (SAMBROOK et al., 1989). A pureza foi verificada com leituras da relação entre as absorbâncias 260nm e 280 nm e a qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo (0,25 mg/mL).

A verificação da presença dos genes de nodulação no DNA de CLA1 foi realizada por meio da técnica de PCR em Tempo Real (RT-qPCR). Para tanto, na reação de RT-qPCR, utilizou-se DNA (300 ng), iniciadores específicos para gene *nod* (300 nM cada) e 2X Power SYBR Green Master Mix (10 μl) (Applied Biosystems), com volume final de 20 μl. A reação de amplificação ocorreu de acordo com as seguintes condições térmicas: uma desnaturação inicial de 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 55 °C por 15 segundos e extensão a 60°C. Como controle endógeno foi utilizado: Burk16S-F/R correspondem ao gene 16S ribossomal de *Burkholderia*. Realizou monitoramento em tempo real da PCR através de um termociclador RealPlex 4S (Eppendorf). Todas as reações, tanto dos genes alvo quanto do controle endógeno, foram realizadas em triplicatas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia empregada para extração de DNA foi satisfatória, proporcionando amostras cujas concentrações variaram entre 1053ng/ul a 2370 ng/ul. No tocante, a pureza das amostras verificadas pela relação entre as absorbâncias 260nm e 280nm, foram obtidos valores que variaram entre 1,907 a 1,958 o qual segundo Sambrook et al. (1989) são consideradas de boa qualidade, ao considerarem que relação entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm deve ser maior que 1,75 para assegurar sua pureza.

A presença de bandas íntegras no gel de agarose 0,8% evidenciou que as amostras possuem boa qualidade e livre de possíveis degradações e contaminações por biomoléculas, que podem dificultar a corrida eletroforética (figura 1).

A amplificação por RT.qPCR revelou que CLA1 apresenta todos os genes de nodulação (*nodA*, *nodB*, *nodC* e *nodD*) em seu DNA genômico (figura 2). Este resultado evidencia que esta bactéria apresenta potencial capacidade de nodular, e fixar o nitrogênio atmosférico em leguminosas.

Segundo Zaat et al. (1989) os genes *nodA*, *nodB* e *nodC* são organizados em três operons, localizados nos chamados plasmídeos Sym, com exceção para *Bradyrhizobium*, em que estes operons estão localizados no cromossomo. Em todo caso, estes operons requerem a presença de um gene regulador, o *nodD*.

Segundo Moulin et al. (2001) a capacidade de nodulação de espécies de *Burkholderia* se devem a presença de genes *nodABCD* responsáveis pela síntese dos fatores de nodulação, da mesma forma como ocorre com demais rizóbios. Além disso, estudos com base em sequenciamento de DNA mostrou que a organização genética dos genes *nodABC* são similares aos presentes nos demais tipos de rizóbios, apresentando a mesma orientação e sobreposição, além de serem precedidos pelo gene regulador *nodD*. Em vista disso, esses autores sugeriram que a presença de genes *nod* no gênero *Burkholderia* provavelmente ocorreu em virtude de transferência horizontal de genes, que ocorreram juntamente com o surgimento das leguminosas a cerca de 70 ou 130 milhões de anos atrás (CHEN et al, 2003).



Figura 1 - Imagem de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz ultravioleta.

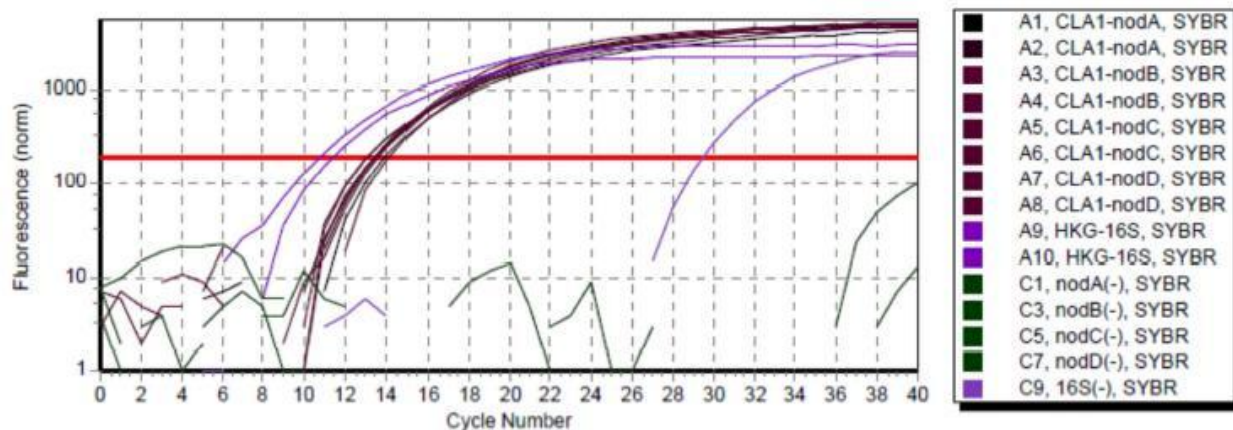


Figura 2 - Imagem da amplificação dos genes de nodulação (*nodA*, *nodB*, *nodC* e *nodD*) por RT-qPCR.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, foi verificado que os genes de nodulação (*nodABCD*) estão presentes na estirpe de *Burkholderia phenoliruptrix* CLA1. De modo geral, os resultados revelaram o potencial do uso desta bactéria como inoculante microbiano para o cultivo de leguminosas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao pesquisador Dr. Cláudio de Oliveira Cunha pelo isolado CLA1 e ao Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS) onde foi realizado a pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja** – Região Central do Brasil 2011. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 2010. 256p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48 p.

MENNA, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 315-332, 2006.

OLIVEIRA, L. R. **Análise da expressão dos genes *nodC* e *nodG* de *Rhizobium trypici* sob indução com flavonóides pela técnica de PCR quantitativo**. 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

TOLEDO, B. F. B.; MARCONDES, J.; LEMOS, E. G. M. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do 16S rRNA. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.4, p.384-391, 2009.

SAMBROOK, J. et al. **Molecular cloning**: A laboratory manual, 2.ed. New York: Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.

ZAAT, S. A. J. et al. Analysis of the major inducers of the *Rhizobium nodA* promoter from *Vicia sativa* root exudate and their activity with different *nod* genes. **Plant Molecular Biology**, v.13, p.175-188, 1989.

CHEN, W. et al. Legume symbiotic nitrogen fixation by β .proteobacteria is widespread in nature. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.24, p.7266-7272, 2003.