



SCREENING MOLECULAR PARA O GENE *NIRK*

Anunciene Barbosa Duarte, Débora Francine Gomes Silva Pereira, Francielle de Matos Feitosa, Bruno Rafael Alves Rodrigues, Gleika Larisse Oliveira Dorasio de Souza, Silvia Nietzsche, Adelica Aparecida Xavier

Introdução

A banana (*Musa spp.*) é explorada na maioria dos países tropicais com produção mundial de 90,7 milhões de toneladas [1]. Minas Gerais é quarto maior produtor, tendo em 2010, um total de 40.373 hectares de área colhida dessa cultura. Entre as regiões mineiras, o Norte de Minas destaca-se como maior produtora, alcançando em 2009 uma produção de 241 mil toneladas em uma área de 11.600 hectares [2]. Assim, nas últimas décadas, tem se investido muito em pesquisas para disponibilizar formas alternativas de nutrientes às plantas, e em metodologias alternativas como o uso de microrganismos endofíticos [3]. Os microrganismos endofíticos são todos aqueles que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas, emergindo dos tecidos vegetais [4].

A capacidade de desnitrificar é uma característica facultativa espalhada entre uma grande variedade de grupos fisiológico e taxonômico. Cerca de 130 espécies bacterianas desnitrificantes são encontradas dentro de mais de 50 gêneros [5].

A via de desnitrificação dá-lhes uma vantagem competitiva em ambientes de baixa oxigenação. No entanto, alguns também desnitrificam aerobicamente. Bactérias desnitrificantes prosperam em praticamente todos os habitats, e processo de redução é uma preocupação global. Desnitrificação causa perda de nitrogênio em solos agrícolas, e o N_2O emitido destrói a camada de ozônio e contribui para o aquecimento global. Ainda assim, a desnitrificação preenche uma função importante no tratamento de resíduos, eliminando o excesso de nitrogênio em ambientes locais por via anaeróbia degradando poluentes orgânicos [6].

A abordagem clássica, usando seqüências de genes 16S rRNA para detectar e analisar as comunidades bacterianas em amostras de meio ambiente sem isolamento e cultivo, não é possível quando se estuda bactérias desnitrificantes. Em vez disso, a diversidade filogenética de bactérias desnitrificantes sugere a utilização de sondas funcionais e *primers* de PCR com base em genes NIR estruturais para detectar bacteriasdes nitrificantes em geral. Isto implica homologia genética suficiente do gene estrutural [6].

Visto o exposto o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil molecular para o gene *nirK* de bactérias endofíticas associadas a raízes de bananeiras.

Material e Métodos

O presente estudo foi realizado nas dependências da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), no Campus de Janaúba. As bactérias utilizadas neste trabalho foram sendo coletadas nos municípios de Nova Porteirinha, Janaúba, Jaíba, Porteirinha e Matias Cardoso, pólos de produção de bananeira Prata-Anã.

Para a realização da extração de DNA, cada isolado foi cultivado em meio TSB (TrypticSoyBroth,) líquido por 24 h a 37 °C, sob agitação constante de 180 rpm. A extração de DNA genômico das bactérias foi realizada com o auxílio de um Kit de extração de DNA Genômico de Bactérias MiniprepHiPura, fabricado pela empresa HIMÉDIA.

Os isolados foram identificados através do seqüenciamento parcial da região 16S rDNA. Foi amplificada a região 16S utilizando os iniciadores 27F (5'AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG3') e 1492R (5'ACGG(CT)TACCTTGTTACGACTT-3') através da técnica de PCR. O seqüenciamento das amostras foi realizado pela empresa Hellixxa utilizando o seqüenciador automático ABI-PRISM 3100 GeneticAnalyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (AppliedBiosystems). As amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol 75% e lavadas com etanol 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida, desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no seqüenciador automático.

Feito isso, foram realizados os testes bioquímicos no qual os tratamentos foram constituídos de 38 isolados bacterianos endofíticos. Para cada teste foram usadas três repetições e o delineamento foi inteiramente casualizado.

Após os testes bioquímicos, foram testados 1 par de primers: F1acu (ATC ATGGT(C/G) CTG CCG CG) e R3cu (GCC TCG ATC AG(A/G) TTG TGG TT) referentes ao gene *nirK*, relacionado a enzima nitrito redutase (THROBACK *et al.*, 2003), através da técnica de PCR. As condições de amplificação foram 2,0 µL de dNTPs (2,0 mM de cada), 2,5 µL de tampão 10X, 0,75 µL de $MgCl_2$ (50mM), 5,0 µL de cada *primer* (5 mM), 0,25 µL de TaqDNApolimerase (5 U μL^{-1}), 5 µL de DNA (50ng), com volume final de 25 µL. Em seguida, o material foi colocado



FÓRUM

ENSINO · PESQUISA
EXTENSÃO · GESTÃO

FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos · Apresentações artísticas
e culturais · Debates · Minicursos e Palestras



24 a 27
setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

num termociclador e submetido ao seguinte programa de amplificação: uma etapa de desnaturação (94 °C por 2 min), seguidos de 35 ciclos intermediários (94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos), e uma etapa de final de extensão (72 °C por 7min).

Os produtos de amplificação foram observados em gel de agarose 1,2% e fragmentos de aproximadamente 450bp, foram esperados para o *nirK*. O marcador de peso molecular 100bp-DNA Ladder foi utilizado para servir como parâmetro para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados. A análise foi feita analisando a presença ou ausência da banda que caracterizava o gene.

Os dados experimentais obtidos foram à análise de distribuição de frequência.

Resultados e Discussão

Dentre os isolados avaliados 7,5% amplificaram o gene *nirK*, com destaque para o isolados 22, 61 e 137 das espécies *K. pneumoniae*, *B. pumilus* e *B. safensis*, respectivamente. Os demais isolados não amplificaram em nenhuma das ampliações realizadas (Tabela 1) (Figura 1).

Os recentes estudos publicados sobre a amplificação e sequenciamento dos genes associados a nitrito redutase (*nirK*) demonstraram que as bactérias dos gêneros *Blastobacter*, *Alcaligenes*, *Paracoccus* e *Pseudomonas* apresentam substancial diversidade e que os *primers* podem ser utilizados como marcadores para seleção de bactérias desnitrificantes, ao mesmo tempo que constituem mais uma ferramenta para acessar a diversidade destes microorganismos[7]. O fato dos isolados 22, 61 e 137 das espécies *K. pneumoniae*, *B. pumilus* e *B. safensis*, respectivamente terem amplificado para o gene *nirK* demonstram que apesar destes isolados possuírem características bioquímicas semelhantes aos demais microrganismos estudados, geneticamente eles divergem, pois possuem uma região distinta no DNA que foi capaz de amplificar para os *primers* estudados. Entretanto, o fato de poucos isolados terem amplificado os genes *nirK*, pode estar associado a especificidade dos *primers*, que foram desenhados a princípio para *Pseudomonas*, demonstrando que em futuros trabalhos a aplicação de *primers* a partir de sequências de espécies do gênero *Bacillus* devem ser priorizadas.

Conclusões

Três isolados apresentaram reações de PCR positivas para o gene *nirK*. Os estudos moleculares preliminares confirmam os testes bioquímicos, indicando que os microrganismos em questão em sua maior parte atuam como desnitrificantes, e que em futuros trabalhos a aplicação de *primers* a partir de sequências de espécies do gênero *Bacillus* devem ser priorizadas.

Agradecimento

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] FAO. **Food and Agricultural Organization. Faostat**. Disponível em: <http://www.faostat.fao.org/site/567/default.aspx>. Acesso em: 03 Mar. 2010.
- [2] ABANORTE - **Associação dos Bananicultores do Norte de Minas Gerais**. Disponível em: <http://www.abanorte.com.br/contact-info>. Acesso em: 05 jan.2008.
- [3] LUCON, C. M. M. *et al.* Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, p. 225-232, 2009.
- [4] AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, Anamaya Publishers, 2007. p. 189-207.
- [5] Zumft, W. G. 1992. The denitrifying prokaryotes, p. 554-582. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- [6] Hallin, S.; Lindgren, P. E. **PCR Detection of Genes Encoding Nitrite Reductase in Denitrifying Bacteria**. Received 25 September 1998/Accepted 15 January 1999
- [7] THROBÄCK, I. N. *et al.* Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, n. 3, p. 401-417, 2004.

Tabela 1: Reação de PCR positiva para amplificação do gene *nirK*.

Isolado	Organismo mais relacionado ***	<i>nirK</i>
13	<i>Bacillus subtilis</i>	-
18	<i>B. axarquiensis</i>	-
22	<i>K. pneumonia</i>	+
43	<i>Bacillus pumilus</i>	-
61	<i>Bacillus pumilus</i>	+
86	<i>Bacillus subtilis</i>	+
93	<i>Bacillus subtilis</i>	+
105	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-
112	<i>Bacillus subtilis</i>	+
137	<i>Bacillus safensis</i>	+
173	<i>Bacillus altitudinis</i>	+
193	<i>Bacillus aerophilus</i>	-

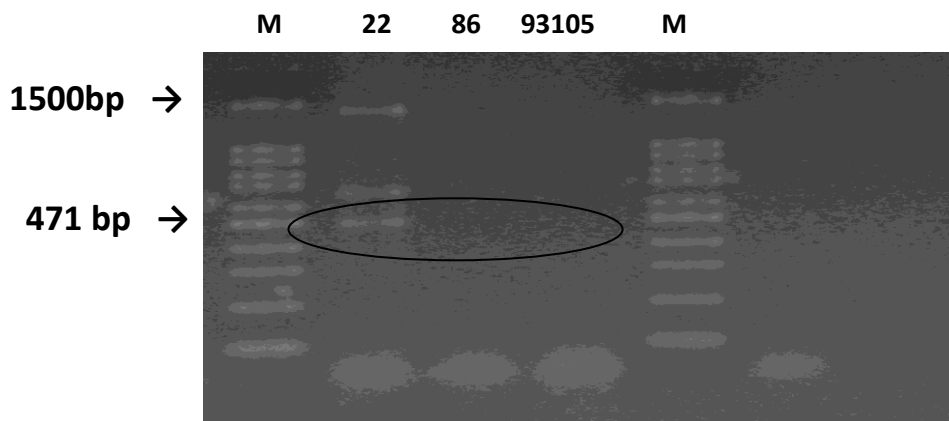


FIGURA 4. Reação de PCR positiva para a amplificação do gene *nir K*; (M) marcador de peso molecular 100 pb; 18 a 193: códigos dos isolados.