



## Screening molecular do gene *nifH*

Francielle de Matos Feitosa, Débora Francine Gomes Silva Pereira, Pedro Thiago Medeiros Paixão, Gleika Larisse Oliveira Dorasio de Souza, Bruno Rafael Alves Rodrigues, Silvia Nietzsche, Adelica Aparecida Xavier

### Introdução

Os genes *nif* estão associados ao processo de fixação de nitrogênio, e alguns deles mais especificamente na expressão da enzima nitrogenase, Vance e Griffith [1]. Em termos de propriedades físicas e químicas o mecanismo da fixação do nitrogênio é muito similar entre esses organismos.

A presença do gene *nifH*, que codifica a unidade Fe-nitrogenase do complexo nitrogenase. Este gene tem se tornado um marcador muito utilizado no estudo da diversidade de endofíticos com potencial para fixar N<sub>2</sub>, em estudos independentes do cultivo, Izquierdo e Nusslein [2]. O gene *nifH* é também um dos mais investigados como marcador em estudos de filogenia, diversidade e abundância de microrganismos, Gaby e Buckley [3].

A amplificação do *nifH* pode fornecer informações sobre quais tipo de organismos podem estar envolvidos na fixação de N<sub>2</sub>, confirmar a presença dos genes em determinado organismo que se espera ser fixador ou identificar a presença de organismos que são suspeitos de serem pequenos contribuintes na fixação de N<sub>2</sub>, Zehr *et al.* [4].

Destarte, no presente estudo objetivou-se caracterizar o perfil molecular de bactérias endofíticas diazotróficas associadas a raízes de bananeiras por meio da amplificação do gene *nifH*.

### Material e métodos

O trabalho foi desenvolvido nas dependências da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), Campus Janaúba-MG. Foram coletadas 38 bactérias provenientes dos municípios: Nova Porteirinha (seis áreas de plantio), Janaúba (duas áreas de plantio), Jaíba (cinco áreas de plantio), Porteirinha (uma área de plantio) e Matias Cardoso (uma área de plantio), pólos de produção de bananeira Prata-Anã no Norte de Minas Gerais e no município de Guanambi, região do Sudoeste do Estado da Bahia.

Para a realização da extração de DNA, cada isolado foi cultivado em meio TSB (Tryptic Soy Broth,) 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 Miniprep HiPura, fabricado pela empresa HIMÉDIA.

Foi realizada a amplificação do DNA dos isolados bacterianos para verificação da presença da região gênica *nifH*, segundo Teixeira *et al.* [5], utilizando o *primer* universal 19f 5'GGAATTCTGTGACCTAAAGCTGA- 3' e 19f R5'AGCATACATTGCCATCATTTCACC-3'. As condições de amplificação foram 2,0 µL de dNTPs (2,0 mM de cada), 2,5 µL de tampão 10X, 1µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5 µL de cada *primer* (5 mM), 0,6 µL de Taq DNA polimerase (5 U µL<sup>-1</sup>), 5 µL de DNA (50ng), com volume final de 25 µL. O material foi colocado num termociclador e submetido ao seguinte programa de amplificação: uma etapa de desnaturação (94 °C por 2 min), seguidos de 30 ciclos intermediários (94 °C por 30 segundos, 52 °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 270 pb foram esperados para o gene *nifH*. 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.

### Resultado e Discussão

Dentre os isolados avaliados amplificaram para o gene *nifH* as seguintes espécies: *Bacillus subtilis*, isolados 13, 86, 93 e 112; *Bacillus pumilus*, isolado 61; *Bacillus safensis*, isolado 137 e *Bacillus altitudinus*, isolado 173 (Tab. 1). Teixeira *et al.* [6], trabalhando com *primers* específicos do gene *nifH* para os grupos Proteobacteria, Actinobacteria e *Bacillus*, verificaram que o produto de amplificação para o mesmo foi observado somente em oito espécies bacterianas endofíticas, de um total de 47 isolados de mandioca.

Estes resultados embora relevantes demonstrem que somente a presença do gene no isolado não significa que os mesmos irão expressar a capacidade de fixação biológica do nitrogênio, dessa forma é necessário realizar estudos in



vitro para comprovação dessa capacidade de fixar biologicamente o nitrogênio antes de utilizá-lo como possíveis bioinoculantes.

### Conclusão

Dos 38 isolados estudados apenas sete apresentaram amplificação da reação de PCR pelo gene *nifH* com aproximadamente 270 pb.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPEMIG e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

### Referências

- [1] VANCE, C.P.; GRIFFITH, S.M. (1995). The molecular biology of n metabolism. In: DENNIS, D.T.; TURPIN, D.H.( Ed) Plant physiology biochemistry and molecular biology.4.ed.Singapore: Editora. p.371-469.
- [2] IZQUIERDO, J. A.; NUSSLEIN, K. Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments. **Microbial Ecology**, Oslo, v.51, p. 441-452, 2006.
- [3] GABY, J.C.; BUCKELY, D.H. A Comprehensive Evaluation of PCR Primers to Amplify the *nifH* Gene of Nitrogenase. **PLoS ONE**, n.7, n.7, 2012.
- [4] ZEHR, JP, Braun S, Chen Y e Mellon M (1996) Nitrogen fixation in the marine environment: relating genetic potential to nitrogenase activity. **J Exp Mar Biol Ecol** 203, 61-73
- [5] TEIXEIRA, M. A. *et al.* Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovariiedades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecária Brasileira**, v. 42, n. 1, p. 43-49, 2007.
- [6] TEIXEIRA, M. A. *et al.* Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovariiedades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 1, p. 43-49, 2007.



FÓRUM ENSINO • PESQUISA  
EXTENSÃO • GESTÃO

# FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

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

REALIZAÇÃO:



APOIO:



FAPEMIG



FADENOR

# 24 a 27 setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

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

Isolados	Organismo mais relacionado	<i>nifH</i>
6	<i>Bacillus pumilus</i>	-
13	<i>Bacillus subtilis</i>	+
18	<i>B. axarquiensis</i>	-
20	<i>Bacillus safensis</i>	-
22	<i>K. pneumoniae</i>	-
29	<i>Bacillus pumilus</i>	-
31	<i>Bacillus subtilis</i>	-
36	<i>B. megaterium</i>	-
43	<i>Bacillus pumilus</i>	-
59	<i>Bacillus pumilus</i>	-
61	<i>Bacillus pumilus</i>	+
78	<i>Bacillus pumilus</i>	-
80	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-
86	<i>Bacillus subtilis</i>	+
93	<i>Bacillus subtilis</i>	+
97	<i>Bacillus subtilis</i>	-
100	<i>Enterobacter sp.</i>	-
102	<i>Bacillus sp.</i>	-
105	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-
112	<i>Bacillus subtilis</i>	+
115	<i>Rhizobium sp.</i>	-
119	<i>Bacillus safensis</i>	-
123	<i>Bacillus subtilis</i>	-
130	<i>Bacillus altitudinis</i>	-
131	<i>Bacillus cereus</i>	-
135	<i>Bacillus pumilus</i>	-
137	<i>Bacillus safensis</i>	+
142	<i>Bacillus subtilis</i>	-
156	<i>Bacillus subtilis</i>	-
163	<i>Bacillus safensis</i>	-
171	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-
172	<i>Bacillus subtilis</i>	-
173	<i>Bacillus altitudinis</i>	+
177	<i>Bacillus pumilus</i>	-
179	<i>Bacillus pumilus</i>	-
189	<i>Bacillus pumilus</i>	-
192	<i>Bacillus cereus</i>	-
193	<i>Bacillus aerophilus</i>	-

+ positivo para a reação; - negativo para a reação.