

# Amplificação de Fragmentos dos Genes *nifH* e *nodC* em Bactérias Obtidas de Nódulos de Amendoim

## Amplification of *nifH* and *nodC* Gene Fragments in Peanut Root Nodule Bacteria

---

*Tainá Santos Dourado Ferreira*<sup>1</sup>; *Jussara Barboza Alencar Cunha*<sup>2</sup>; *Rejane de Carvalho Nascimento*<sup>3</sup>; *Tailane Ribeiro do Nascimento*<sup>3</sup>; *Helanne Silva Santos Barden*<sup>4</sup>; *Carlos Alberto Tuão Gava*<sup>5</sup>; *Lindete Miria Vieira Martins*<sup>6</sup>; *Paulo Ivan Fernandes Júnior*<sup>7</sup>

### Resumo

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar 577 isolados bacterianos, obtidos de nódulos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), pertencentes à Coleção de Micro-organismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido, quanto à amplificação de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC*. As bactérias foram crescidas em meio de cultura líquido e a extração do DNA genômico foi realizada por meio de choque térmico. As reações de PCR foram realizadas com a utilização simultânea de dois pares de iniciadores. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de

---

<sup>1</sup>Estudante de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), bolsista Pibiti, Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>2</sup>Engenheira-agrônoma, pós-graduanda em Horticultura Irrigada, Universidade do Estado da Bahia (Uneb), Juazeiro, BA.

<sup>3</sup>Estudante de Ciências Biológicas, UPE, estagiária da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>4</sup>Bióloga, pós-graduanda em Fitotecnia, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Bom Jesus, PI.

<sup>5</sup>Engenheiro-agrônomo, D. Sc. em Proteção de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>6</sup>Engenheira-agrônoma, D. Sc. em Ciência do Solo, professora adjunta da Uneb, Juazeiro, BA.

<sup>7</sup>Biólogo, D. Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br.

agarose. Dos 577 isolados de amendoim analisados, em 51 houve a amplificação de um dos genes e em cinco destes houve a amplificação simultânea dos genes *nifH* e *nodC*. Estes resultados indicam a presença de bactérias não rizobianas em nódulos de amendoim.

**Palavras-chave:** rizóbio, diversidade, fixação biológica de nitrogênio.

## Introdução

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é realizada por um grupo de procaríotos que possuem o complexo enzimático nitrogenase. Algumas destas bactérias podem se associar a espécies vegetais e disponibilizar nitrogênio para a sua assimilação. Dentre as associações entre bactérias diazotróficas e espécies vegetais, a mais bem estudada e caracterizada é a simbiose rizóbio-leguminosa (IBÁÑEZ et al., 2009).

Após estruturar uma coleção de culturas de rizóbio, um passo importante nas primeiras avaliações seletivas é a autenticação, ou seja, a avaliação da capacidade nodulífera dessas bactérias na planta hospedeira.

A equipe da Embrapa Semiárido desenvolveu, recentemente, um protocolo que permite a redução do número de bactérias que serão autenticadas pela reinoculação no hospedeiro original. A técnica consiste na amplificação concomitante de fragmentos do gene *nifH*, que codifica a enzima nitrogenase redutase do complexo enzimático nitrogenase, e do gene *nodC*, que codifica enzimas envolvidas na síntese dos fatores nod. Este procedimento tem sido adotado no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido para a seleção inicial de rizóbios isolados de diferentes plantas hospedeiras. O objetivo deste trabalho foi realizar a amplificação dos genes *nifH* e/ou *nodC* para uma coleção com 577 isolados de rizóbio de amendoim (*Arachis hypogaea* L.).

## Material e Métodos

Os isolados bacterianos analisados neste estudo foram obtidos por Cunha (2014), de diferentes genótipos de amendoim cultivados em quatro amostras de solos, coletadas na superfície, provenientes dos municípios de Petrolina, PE e Barbalha, CE. Após o cultivo em um

experimento utilizando o amendoim como planta-isca, as bactérias foram isoladas e purificadas, totalizando uma coleção com 577 isolados. Esses isolados estão depositados na Coleção de Microorganismos de Interesse Agrícola da Embrapa Semiárido (Coleção ESA).

Para a extração de DNA dos isolados, as bactérias foram crescidas em meio de cultura YM líquido, sob agitação de 120 rpm, pelo tempo de crescimento adequado a cada isolado (VINCENT, 1970). Uma alíquota de 1 mL do caldo de cultivo foi centrifugado a 6.000 *g* por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado com igual volume de água destilada esterilizada (ADE). A suspensão bacteriana foi centrifugada e ressuspensionada nas mesmas condições por mais uma vez.

A extração do DNA foi realizada por meio do choque térmico de acordo com Fernandes Júnior et al. (2013). Em todas as extrações, foi utilizada a estirpe BR 322 de *Rhizobium tropici* como controle positivo. Assim como a extração de DNA, as amplificações dos fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* também foram realizadas de acordo com Fernandes Júnior et al. (2013).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal a 100 V durante 30 minutos em gel de agarose a 1,5% (p/v) e corado com brometo de etídeo. Para comparar o tamanho das bandas, foi utilizado um marcador molecular de 1 kb DNA Leader. As amplificações para os fragmentos foram consideradas positivas de acordo com o tamanho molecular de, aproximadamente, 360 pb para o gene *nifH* e 980 pb para o gene *nodC*.

Os isolados que apresentaram amplificação para ao menos um dos genes estudados tiveram suas características fenotípicas classificadas de acordo com o seu tempo de crescimento (rápidas, intermediárias ou lentas); reação de pH do meio (reação ácida, sem reação ou reação alcalina); tamanho da colônia (menor que 1 mm, entre 1 mm e 2 mm ou maior que 2 mm) cor da colônia, quantidade de muco (pouco ou muito muco); tipo de muco (viscoso ou butírico).

## Resultados e Discussão

Dentre os isolados bacterianos avaliados, 51 apresentaram amplificação positiva para, pelo menos, um dos genes estudados.

Destes, cinco (101-2, 81-4, 109-4, 109-5 e 39-10) apresentaram amplificação simultânea dos dois genes (Tabela 1). A baixa frequência dos genes *nodC* na coleção estudada indicou que diversos isolados não rizobianos foram obtidos no processo de isolamento, o que indica a coexistência destas bactérias em nódulos de amendoim.

Isolados não rizobianos, pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Klebsiela* e *Enterobacter* já foram obtidos a partir de nódulos de amendoim por Ibañes et al. (2009). Neste estudo, os isolados obtidos apresentavam características compatíveis com bactérias promotoras de crescimento vegetal. O posicionamento taxonômico de algumas das bactérias obtidas neste estudo foi realizado por Cunha (2014) e os resultados revelaram a presença de diversas bactérias pertencentes a gêneros não rizobianos, principalmente *Enterobacter*. Estudos complementares estão sendo realizados com esses isolados para avaliar a sua diversidade e o seu potencial biotecnológico.

**Tabela 1.** Isolados bacterianos obtidos de nódulos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) que apresentaram a amplificação do gene *nodC* e/ou *nifH* e suas características fenotípicas.

Isolado	Fragmento amplificado	Características fenotípicas <sup>1</sup>
81-5	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, CR, MM, V
123-10	<i>nifH</i>	L, Alc, >2mm, Cr, PM, FI
94-10	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
100-4	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
115-7	<i>nifH</i>	L, Alc, >2mm, Cr, PM, FI
90-9	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, CR, MM, V
81-4	<i>nodC</i> + <i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
81-3	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
101-2	<i>nodC</i> + <i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
55-13	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
81-10	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
71-12	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Cr, MM, V
102-2	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
90-10	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Cr, MM, V
55-12	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
70-7	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
118-2	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Cr, MM, V
109-5	<i>nodC</i> + <i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
55-11	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
115-8	<i>nifH</i>	L, Alc, >2mm, Cr, PM, FI
109-4	<i>nodC</i> + <i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
69-2	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Cr, MM, V
55-8	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
52-14	<i>nifH</i>	R, N, 1 a 2 mm, Cr, MM, V

Continua ...

Continuação.

Isolado	Fragmento amplificado	Características fenotípicas <sup>1</sup>
8-3	<i>nifH</i>	R, Ác, 1 a 2 mm, Am, PM, V
109-9	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
67-3	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
72-4	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Cr, MM, V
81-7	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
50-15	<i>nifH</i>	R, Ác, 1 a 2 mm, Am, PM, V
115-7 a	<i>nifH</i>	I, Alc, P, R, PM, V
11-4	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
67-1	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
39-10	<i>nodC</i> + <i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
69-16	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
127-1	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
50-16	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
50-18	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
109-3	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Cr, MM, V
70-5	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Cr, MM, V
67-2	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
91-7	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
50-2	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
61-5-2	<i>nifH</i>	I, N, P, Cr, PM, V
55-4	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
109-1	<i>nifH</i>	R, N, 1 a 2 mm, Am, PM, V
90-14	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
127-2	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Cr, MM, V
102-1	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
58-11	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V
77-10	<i>nifH</i>	R, ÁC, >2mm, Am, MM, V

Tempo de crescimento: R = rápido; I = intermediário; L = lento. Alteração de pH do meio: ÁC = ácida, Alc = alcalina, N = neutra. Tamanho da colônia (em mm); Cor da colônia: Am = amarela, Cr = Creme; Produção de muco: MM = muito muco; PM = Pouco muco; Tipo de muco: V = viscoso; F = floculoso; B = butírico.

## Conclusão

As 51 bactérias que apresentaram a amplificação para ao menos um dos genes estudados também apresentam elevada diversidade fenotípica.

## Referências

CUNHA, J. B. A. **Caracterização de bactérias isoladas de nódulos de amendoim cultivado em solos do Semiárido**. 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia, Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro.

FERNADES JÚNIOR, P. I.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; SANTOS, C. A. F.; CUNHA, J. B. A.; MARTINS, L. M. V. **Duplex PCR para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes H e C em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas.** Petrolina: Embrapa Semiárido, 2013. 6 p. (Embrapa Semiárido. Comunicado Técnico,158).

IBAÑEZ, F.; ANGELINI, J.; TAURIAN, T.; TONELLI, M.L.; FABRA, A. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.32, p.49-55, 2009.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria.** Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164 p.