

## EXPRESSÃO DOS GENES CODIFICADORES DA ENZIMA ASPARAGINA SINTETASE DE *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE*

Milena Eloisa Ribeiro (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Amanda Ruoso Lazzari Almeida (Coautor), Marco Aurelio Schüler de Oliveira (Orientador). E-mail: (masoliveira2@uem.br).

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

**Área e subárea do conhecimento: Bioquímica, Bioquímica dos Microrganismos**

**Palavras-chave:** *Herbaspirillum seropedicae*, Assimilação de amônio, Asparagina sintetase.

### RESUMO

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria fixadora de nitrogênio capaz de colonizar os tecidos internos de plantas e apresenta potencial uso como biofertilizante. Estudos mostram que a perturbação das vias de assimilação de amônio pode gerar estirpes com maior capacidade de fixação de nitrogênio. A bactéria *H. seropedicae* possui em seu genoma 4 genes codificadores da enzima Asparagina Sintetase, os quais também podem participar da via de assimilação de nitrogênio. O presente trabalho analisou o padrão de expressão desses genes por RT-qPCR em diferentes condições de nitrogênio. O RNA total da bactéria foi extraído e o cDNA sintetizado. Os resultados indicaram que três dos quatros genes trabalhados foram expressos, *ansB1*, *ansB3* e *ansB4*. Os resultados também permitiram observar que a expressão desses genes é regulada pelos níveis de nitrogênio ambientais.

### INTRODUÇÃO

*Herbaspirillum seropedicae* é uma  $\beta$ -Proteobactéria gram-negativa capaz de colonizar os tecidos internos das plantas, sem causar nenhum dano aparente ao hospedeiro (Baldani et al., 1986; Olivares et al., 1997). Ela faz parte de um grupo de procariotos capazes de converter nitrogênio atmosférico em moléculas reativas disponíveis para outros seres vivos, ou seja, realiza fixação biológica do nitrogênio. Essa capacidade é de grande importância para a agricultura, já que o nitrogênio é um fator limitante para a produtividade das culturas agrícolas.

A utilização *H. seropedicae* como um inoculante comercial para promoção de crescimento vegetal depende da manipulação seu metabolismo de modo a gerar estirpes bacterianas com maior capacidade de fixação de nitrogênio. Dentre as vias cuja perturbação pode gerar estirpes superfixadoras são as de assimilação de amônio. Uma possibilidade de assimilação de amônio, descrita até o momento, apenas em enterobactérias, é através da enzima Asparagina Sintetase. Recentemente, buscas no genoma da estirpe SmRI de *H. seropedicae* utilizando ferramentas de bioinformática indicaram a presença de quatro diferentes genes

codificantes de isoformas da Asparagina Sintetase, nomeadas AnsB1 a AnsB4. Para determinar o papel de cada isoforma da enzima, faz-se necessário estudar o padrão de expressão dos quatro genes em diferentes condições de disponibilidade de nitrogênio.

## MATERIAIS E MÉTODOS

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFb-malato-HP (Klassen *et al.*, 1997) suplementado com uma fonte de nitrogênio: 20 mM de NH<sub>4</sub>Cl para a condição de alto nitrogênio (S20), e 5 mM de glutamato para a condição limitante de nitrogênio (S5). Após o cultivo, fez-se a extração do RNA pelo método Trizol, quantificou-se por meio da leitura espectrofotométrica em Nanodrop a 260nm e 280nm. O RNA extraído foi tratado com DNase e na continuidade sintetizou-se o cDNA por transcriptase reversa. A qPCR foi executada utilizando o protocolo do SYBR<sup>®</sup> Select Master Mix (Applied Biosystems) utilizando primers específicos para cada gene do estudo e operada no equipamento StepOnePlus<sup>™</sup>.

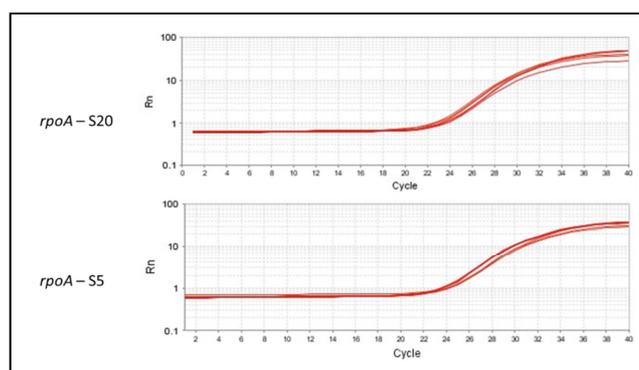
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para determinar a expressão relativa dos genes *ansB1*, *ansB2*, *ansB3* e *ansB4*, os parâmetros curva de melting derivatizada e Ct foram analisados.

A curva de melting derivatizada nos serviu como indicativo de uma amostra sem contaminações. Após a confirmação da qualidade da amostra, com os dados obtidos da qPCR, o Ct de cada gene foi analisado nos gráficos da expressão de cada gene. A análise quantitativa da qPCR foi feita utilizando o método matemático  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ , resultando nos seguintes dados para cada gene:

### *rpoA*

Utilizado como controle neste trabalho, o Ct médio do gene foi igual a 25.83903 para S5 e 25.08833 para S20 (figura 1), resultado similar ao obtido por Pessoa e colaboradores em 2016.



**Figura 1:** PCR em tempo real do gene *rpoA*. Gráficos da amplificação do *rpoA* gerados pelo Software StepOne<sup>™</sup> v2.3 em diferentes condições de nitrogênio disponíveis.

### *asnB1*

Os resultados mostraram que *asnB1* foi mais expresso em condição limitante de nitrogênio, alcançando o *threshold* próximo ao 28º ciclo, enquanto que na condição de S20 isso ocorreu somente no 34º ciclo. Dessa forma, a expressão de *asnB1* é aproximadamente 100 vezes maior em condição de nitrogênio limitante do que em alto nitrogênio disponível, como mostra a figura 2.

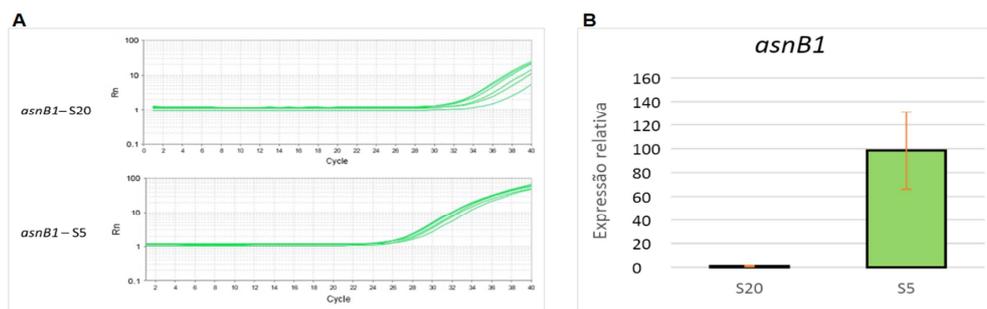


Figura 2: PCR em tempo real do gene *asnB1* (A) e Determinação da expressão relativa de *asnB1* (B)

### *asnB2*

O gene codificante da isoforma *asnB2* não foi expresso em nenhuma das duas condições de nitrogênio testadas, como mostra o gráfico da RT-qPCR (dados não mostrados). A ausência de amplificação não pode ser atribuída a problemas dos primers de *asnB2*, já que todos os mesmos foram testados em PCR convencional usando como o molde o DNA genômico antes de ser feita a RT-qPCR (dados não mostrados).

### *asnB3*

Os resultados mostraram que *asnB3* foi mais expresso em condição limitante de nitrogênio, alcançando o *threshold* próximo ao 25º ciclo, enquanto que na condição de S20 isso ocorreu próximo ao 26º ciclo. Dessa forma, tivemos que a expressão de *asnB3* é aproximadamente 2 vezes maior em condição de nitrogênio limitante do que em alto nitrogênio disponível, como mostra a figura 3.

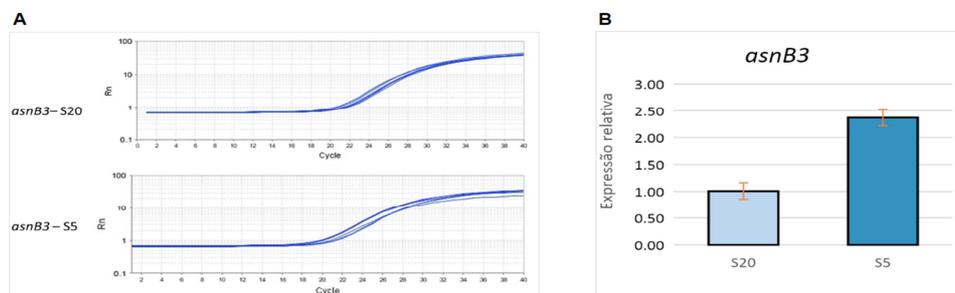
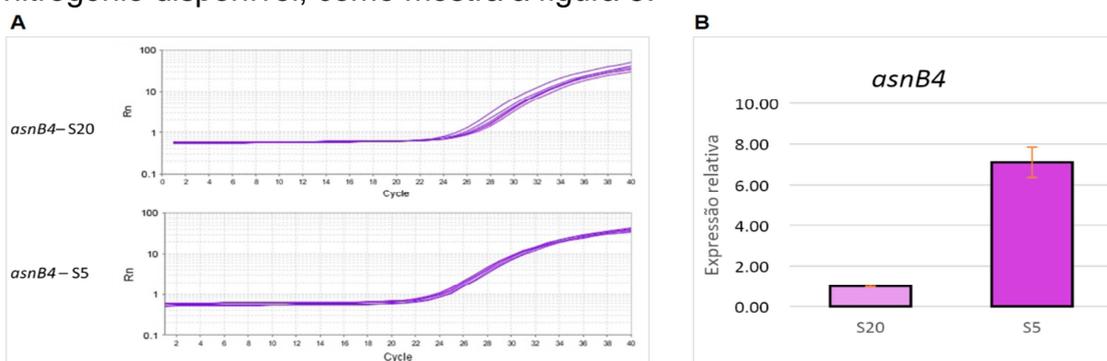


Figura 3: PCR em tempo real do gene *asnB3* (A) e Determinação da expressão relativa de *asnB3* (B).

### *asnB4*

Os resultados mostraram que *asnB4* foi mais expresso em condição limitante de nitrogênio, alcançando o *threshold* estabelecido próximo ao 20º ciclo, enquanto que na condição de S20 isso ocorreu próximo ao 23º ciclo. Para um resultado quantitativo, utilizando o método  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  tivemos que a expressão de *asnB4* é aproximadamente 7 vezes maior em condição de nitrogênio limitante do que em alto nitrogênio disponível, como mostra a figura 5.



**Figura 5:** PCR em tempo real do gene *asnB4* (A) e Determinação da expressão relativa de *asnB4* (B).

## CONCLUSÕES

O trabalho conseguiu demonstrar que os genes *ansB1*, *ansB3* e *ansB4* de *H. seropedicae* são expressos e têm sua expressão regulada pelos níveis de nitrogênio ambiental. A partir desses resultados é possível avançar em mais estudos e investigar a atividade das isoformas da Asparagina Sintetase em *Herbaspirillum seropedicae*.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à UEM, ao CNPq, à CAPES, à FINEP e ao laboratório de biologia molecular que possibilitaram o desenvolvimento deste projeto e também ao encontro EAIC 32, pela oportunidade de divulgar este trabalho.

## REFERÊNCIAS

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Sys. Bacteriol.**, v. 36, p. 86-93, 1986.

OLIVARES, Fábio L. *et al.* Infection sugar cane of mottled varieties stripe by the *Herbaspirillum* resistant and endophytic diazotroph. **New Phytologist**, [S. l.], v. 135, n. 4, p. 723–737, 1997.

KLASSEN, G; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. **Can. J. Microbiol.** n. 43, p. 841–846, 1997.

PESSOA, D. D. V. Validation of reference genes for RT-qPCR analysis in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of microbiological methods**, v. 127, p. 193-196, 2016.