

## **O papel das nodulinas na fixação biológica do nitrogênio na cultura de soja**

---

SOUZA, R.C.<sup>1</sup>; SANTOS, M.A.<sup>2</sup>; HUNGRIA, M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário Filadélfia - Unifil, renata@cnpso.embrapa.br; <sup>2</sup>Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz - ESALQ/USP; <sup>3</sup>Embrapa Soja

A soja é uma das fontes mais importantes de alimentos e ração no Brasil e no mundo. Essa planta é muito versátil na natureza, e produz abundantes suplementos de proteínas e óleo em ambientes temperados e tropicais (Keyser & Fud Li, 1992). A soja demanda grandes quantidades de nitrogênio (N), que podem ser garantidas através do processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN).

Na associação simbiótica entre as leguminosas e os rizóbios ocorre o desenvolvimento de uma nova estrutura na raiz da planta, o nódulo. Nos nódulos, os rizóbios ficam agregados dentro de células da planta hospedeira, num compartimento subcelular rodeado por uma membrana, que é chamada de membrana peribacteróide (Verma et al., 1978).

Vários estudos identificaram genes que estão envolvidos com o processo de desenvolvimento do nódulo e fixação do nitrogênio, e algumas destas proteínas codificadas por esses genes são chamadas de nodulinas. As nodulinas são proteínas das plantas que são induzidas especificamente durante o desenvolvimento de nódulos nas raízes em leguminosas, logo após a infecção com rizóbios microssimbiontes (Legocki, et al., 1980). Essas proteínas desempenham papel importante na formação e manutenção do nódulo radicular. O exemplo mais conhecido de nodulina

é a leghemoglobina, responsável pela coloração avermelhada dos nódulos ativos, cuja função é o transporte de  $O_2$ , funcionando como barreira de difusão do  $O_2$  nos nódulos e evitando que ocorra a inibição da atividade do complexo da enzima Nitrogenase, inibido por  $O_2$  (Mylona et al., 1995).

O nódulo é um novo órgão que se forma nas raízes das leguminosas como resposta à troca de sinais que ocorre entre bactérias coletivamente denominadas como rizóbios e a planta, no caso da soja, *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*. No interior dos nódulos, os rizóbios se transformam em bacteróides e ficam agregados dentro de células da planta envoltos por uma membrana denominada de membrana peribacteróide. Todo intercâmbio metabólico entre os dois parceiros ocorre através dessa membrana (Verma & Fortin, 1989).

A nodulina-24H é um polipeptídeo de 24 kDa localizada na membrana peribacteróide de soja (Fortin et al., 1987). Análises das sequências de nucleotídeos da nodulina-24 indicam que ela pode ser codificada na membrana peribacteróide (Fortin, et al., 1985). Sua expressão é especificamente induzida nos nódulos, não sendo encontrada em nódulos que não produzem a membrana peribacteróide.

Ao amplificar um fragmento desse gene em cultivares do banco de germoplasma Embrapa Soja, buscando identificar SNPs em sequências de genes que codificam nodulinas (Fig. 1), verificou-se a produção de fragmentos de tamanhos diferentes para o produto de amplificação da nodulina- 24H. Para identificar as causas desse polimorfismo foram selecionadas 6 cultivares com base nos fragmentos produzidos, cujos fragmentos gerados serão sequenciados.

O objetivo deste trabalho é o de estudar as causas da variação no tamanho de um fragmento do gene que codifica para a nodulina-24H em seis cultivares de soja.

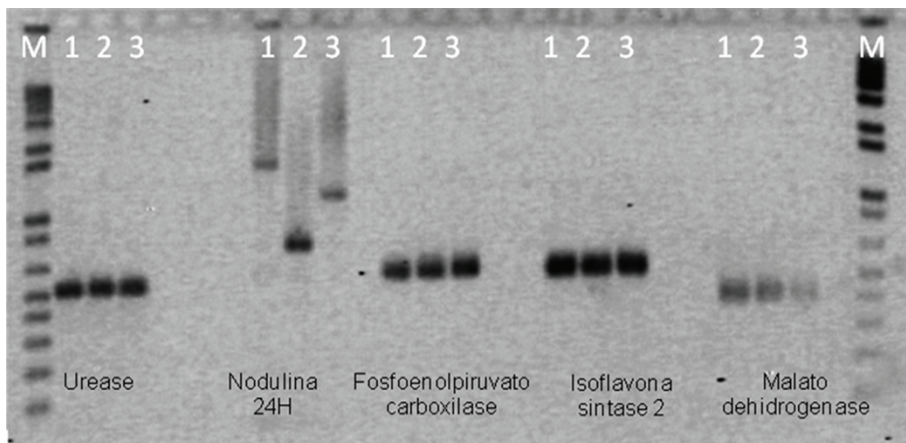
Foram utilizados seis cultivares de soja: BR28, Embrapa-5, FT-100, IAC-4, Bossier e Embrapa-20. As plantas cresceram em casa de vegetação por 50 dias. O DNA foi extraído a partir de duas a três folhas (primeiras folhas trifoliadas) pelo método descrito por Keim et al. (1988),

e mantido na concentração de 100 ng/ $\mu$ L a -80 °C; para a análise, e a concentração foi ajustada em 10 ng/ $\mu$ L. O DNA de cada cultivar foi amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com o *primer* soynod-24H para a região do gene soynod-24, que codifica proteínas conhecidas como nodulinas. Cada amostra continha, em um volume de 50  $\mu$ L: 29,97  $\mu$ L de água MilliQ; 3,33  $\mu$ L de dNTPs (1,5 mM de cada); 5,0  $\mu$ L de Tampão 10X; 2,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50 mM de cada), 3  $\mu$ L de cada oligonucleotídeo (*primer*) (*forward* AGTCCTAATAACAAGAGTAGTA e *reverse* GCAGCAGCCATGCCATGTAG) a 10 pmol/L e 0,2  $\mu$ L de Taq DNA polimerase. Foi utilizado o termociclador Applied Biosystems, usando um ciclo inicial de desnaturação de 95 °C por 1 minuto; seguido por 39 repetições das etapas de desnaturação a 95 °C por 20 segundos, anelamento a 50 °C por 30 segundos, e extensão a 60 °C por 1 minuto.

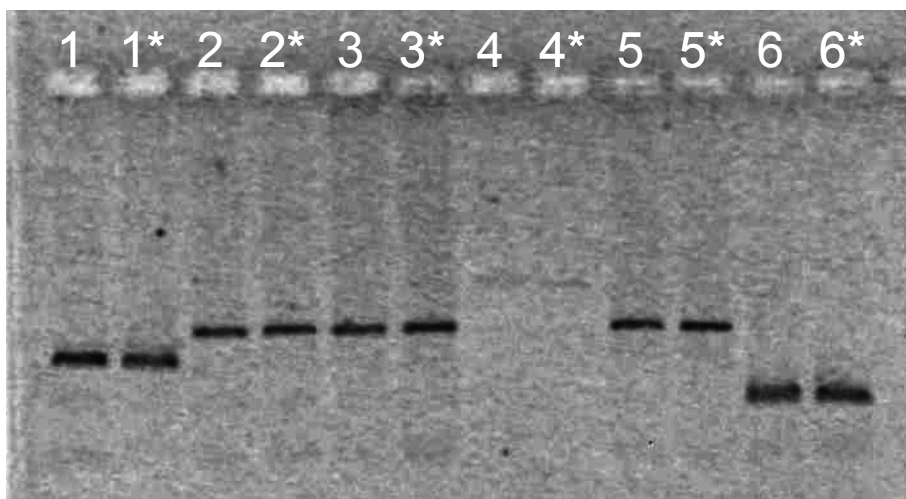
Após as etapas de amplificação os fragmentos gerados foram purificados por meio do Kit PureLink™ PCR Purification Kit Invitrogen. Os fragmentos purificados serão sequenciados para posterior análise das diferenças dos tamanhos dos fragmentos em nível de sequência de DNA.

Depois de feita a reação de PCR para o gene soynod-24H, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % para verificar a eficácia da reação com a visualização dos fragmentos (Fig. 2). Nesse gel pôde-se observar uma diferença no tamanho do fragmento desse gene para as diferentes cultivares. As cultivares Embrapa-5, Bossier e FT-100 não apresentaram diferença no tamanho do fragmento em gel de agarose, porém quando visualizados em gel de poliacrilamida 10 %, foram identificadas diferenças pequenas no tamanho dos fragmentos desses materiais (dados não mostrados). Enquanto em BR-28, Embrapa-20 e IAC-4 foram detectadas diferenças ao gel de agarose.

A segunda etapa deste trabalho consiste em sequenciar os fragmentos gerados nesses materiais para investigar o que causa a alteração do tamanho das seqüências, bem como possíveis implicações dessa variação sobre a sequência da proteína gerada, procurando relacionar com a fixação biológica do nitrogênio.



**Fig. 1.** Otimização da amplificação de fragmentos de sequências gênicas que codificam nodulinas. As amostras número 1 correspondem à cultivar Bossier; as de número 2 correspondem à cultivar Embrapa 20; as amostras número 3 são referentes à cultivar BRS133 e o M é referente ao marcador Kb plus.



**Fig. 2.** Diferenças no tamanho do fragmento do gene soynod-24H. As amostras número 1 são referentes à cultivar BR28; as de número 2 referente à cultivar Embrapa-5; as de número 3 correspondem à cultivar Bossier; as de número 4 são referentes à cultivar Embrapa-20; as de número 5 correspondem à FT-100; e as amostras número 6 são referentes à cultivar IAC-4. \*Amostras com repetição

## Referências

FORTIN, M. G.; ZELECHOWSKA, M.; VERMA, D. P. S. Specific targeting of membrane nodulins to the bacteroid-enclosing compartment in soybean nodules. **The EMBO Journal**, v.4, n.12, p.3041-3046, 1985.

FORTIN, M. G; MORRIZON, N. A.; VERMA, D. P. S. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. **Nucleic Acids Research**, v.15, n.2, p.813-824, 1987.

KEIM, P.; OLSON, T.C.; SHOEMAKER, R.C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. **Soybean Genetics Newsletter**, Ames, v. 15, p. 150-152, 1988.

KEYSER, H. H.; FUD LI. Potential for increasing biological nitrogen fixation in soybean. **Plant and Soil**, v.141, p 119-135, 1992.

LEGOCKI, R. P.; VERMA, D. P. S. Identification of "nodule-specific" host proteins (nodulins) involved in the development of Rhizobium-Legume symbiosis. **Cell**, v.20, p.153-163, 1980.

MYLONA, P; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic Nitrogen Fixation. **The Plant Cell**, v.7, p.869-885, 1995.

VERMA, D. P. S.; FORTIN, M. G. **The molecular biology of plant nuclear genes**. San Diego: Academic Press, 1989. p.329-353.

VERMA, D. P. S.; KAZAZIAN, V.; ZOGBI, V; BAL, A. K. Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. **Journal Cell Biology**, v.78, p.919-936, 1978.