XXVIII Encontro Anual de Iniciação Científica
V Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior
eaic 2019

QUANTIFICAÇÃO POR qPCR DO GENE *nosZ* EM AMOSTRAS DE SOLO DE CULTURAS DE INTERESSE AGRÍCOLA

Laís Priscila Karas (PROVIC/CNPq/FA/UEPG), Salomé Urrea-Valencia, Rafael Mazer Etto, Helyemari Valentim Althaus, Daniel Ruiz Potma Gonçalves, Daiane de Fátima Barreto, Carolina Weigert Galvão (Orientadora), e-mail: carolinawgalvao@hotmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/DEBIOGEM

Ciências Biológicas, Bioquímica

Palavras-chave: Nitrogênio, desnitrificação, óxido nitroso redutase.

Resumo

Devido ao aumento populacional, a escassez de alimentos é uma das maiores preocupações da atualidade. Na tentativa de elevar a produção agrícola e suprir a demanda do mercado, o consumo de fertilizantes está ganhando cada vez mais espaço. Entretanto cerca de 50-70% do nitrogênio aplicado mundialmente acaba sendo perdido por diversos fatores, entre eles o processo de desnitrificação. Visto a importância da desnitrificação não só na atividade agrícola, mas também na geração de gases do efeito estufa, com a finalidade de se compreender o comportamento das comunidades desnitrificantes nas culturas de aveia preta e milho, o presente trabalho quantificou por qPCR o gene *nosZ*, avaliando a possível interferência das doses de nitrogênio e da inoculação de *Azospirillum brasilense* como biofertilizante, na abundância do número de cópias do gene. A partir dos dados obtidos foi possível verificar que as diferentes doses de nitrogênio com e sem inoculação de *A. brasilense*, não influenciaram no número de cópias do gene *nosZ* na cultura do milho. A quantificação do gene *nosZ* também sugere que existe um uso eficiente do N no solo para ambas as culturas.

Introdução

O nitrogênio (N) é um dos elementos essenciais para o bom desenvolvimento vegetal, e cerca de 50% de todo o nitrogênio produzido em escala industrial é destinado às culturas de milho (16%), arroz (16%) e trigo (18%), sendo estes os três principais cereais que constituem a base do consumo mundial (LADHA et al., 2016).

Entretanto, o consumo excessivo desse fertilizante na agricultura vem sendo associado a uma elevação nos níveis de poluição e degradação ambiental, sendo importante destacar que aproximadamente 50-70% do nitrogênio aplicado mundialmente por ano, é perdido por diferentes processos, entre eles, a desnitrificação, responsável pela perda de aproximadamente 1,15 Tg de N por ano (COSKUN et al., 2017; HUANG et al., 2019).

A desnitrificação é um processo que ocorre em condições anaeróbicas, onde por uma sequência de reduções o nitrato é transformado em N_2 (CASTELLANO – HINOJOSA et al., 2019). Nesse processo o nitrato (NO_3^-) e o nitrito (NO_2^-) são reduzidos a óxido nítrico gasoso (NO), óxido nitroso (N_2O), e finalmente a N_2 (ZUMFT, 1997).

Durante a desnitrificação ocorre a liberação de N_2O, um potente gás de efeito estufa, que chega ser cerca de 300 vezes mais reativo que o dióxido de carbono. Nesse contexto o gene *nosZ* possui papel fundamental, uma vez que codifica a única enzima capaz de reduzir N_2O a N_2 (USYSKIN-TONNE et al., 2019).

Diante da importância do uso eficiente de N nas culturas e a relevância do processo de desnitrificação, o presente projeto teve por finalidade quantificar o gene *nosZ*, em culturas de aveia preta e milho, permitindo correlacionar as mudanças no número de cópias do gene com as diferentes doses de nitrogênio que são empregadas em cada cultura.

Material e Métodos

Especificidade dos *primers*: Foi verificada a especificidade dos *primers nosZ*-F [KLOOS et al., 2001] e *nosZ*-R [RUIZ-RUEDA et al., 2009], pela técnica de PCR utilizando o DNA de *Azospirillum brasilense* e de *Bradyrhizobium japonicum*. A reação no termociclador Mastercycler® (Epperdorf), utilizou os seguintes parâmetros, 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57°C, 1 minuto a 72°C, e uma etapa final de 10 minutos a 72°C. Os produtos foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados no fotodocumentador (Fusion FX Vilber loumart).

Curva de calibração: A curva de calibração foi construída a partir da diluição seriada de 2 x 10^8 até 2 x 10^2 UFC. mL^{-1} de *A. brasilense* inoculado em solo estéril. Foram utilizados os mesmos parâmetros da quantificação, entretanto, sem BSA.

Quantificação de amostras: a quantificação do número de cópias do gene *nosZ* foi realizada no termociclador *AriaMx Real-Time PCR System*, Agilent Technologies. Cada reação consistiu de 12,5 µL de SYBR Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green, 1 µL de cada par de *primers*, 0,5 µL de BSA e 2,5 µL da amostra, e completou-se com água ultrapura estéril para um volume de reação de 25 µL.

Todas as amostras foram quantificadas em triplicata técnica, os produtos foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados no fotodocumentador (Fusion FX Vilber loumart).

Resultados e Discussão

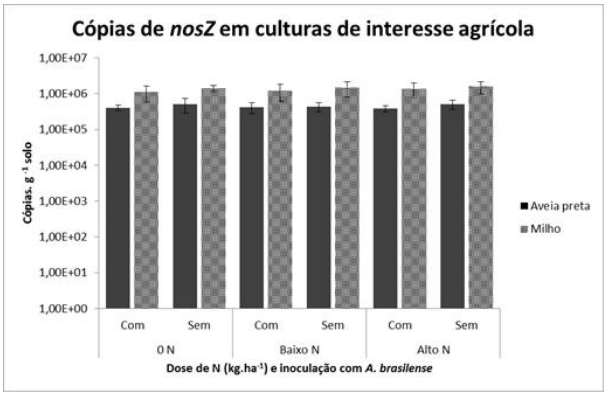
Os *primers* para a quantificação do gene *nosZ* foram específicos para a região de interesse, e amplificaram apenas produtos 450 pb.

Em relação à curva de calibração, foi possível observar uma eficiência de E= 95% indicando que a reação apresenta uma boa eficiência, sendo aceitos valores entre 85 – 110%. O limite de detecção foi 2 x 10^7 - 2 x 10^3 UFC. mL^{-1}.

Foi verificada a ausência de picos inespecíficos na curva de melting observando pico único na temperatura de 88ºC, também foi possível verificar um *slope* de -3,43 e um r^2 de 0,99, indicando que os parâmetros da curva de calibração foram bem ajustados. Todos os produtos foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados no fotodocumentador (Fusion FX Vilber loumart), observando fragmentos de 450 pb e banda única para cada amplificação.

Os dados da quantificação do gene *nosZ* (Fig. 1) revelaram que em ambas as culturas o número de cópias de *nosZ* não ultrapassou 10^6 cópias/g de solo. Comparando com a literatura, os valores obtidos são baixos, uma vez que trabalhos anteriores avaliaram a resposta do *nosZ* à aplicação de fertilizantes nitrogenados, e detectaram valores na ordem de 10^8 – 10^9 cópias/g^{-1} (KASTL et al., 2015, MAO; YANNARELL; MACKIE, 2011, WAGHMODE et al., 2018, YANG et al., 2018).

Figura 1. Efeito das doses de nitrogênio e da inoculação com *Azospirillum brasilense* AbV5/AbV6 no número de cópias do gene *nosZ*, em um sistema agrícola de plantio direto.



Os valores representam as médias e ± o desvio padrão (n= 9). Baixo/alto N= 80/240 kg ha^{-1}, Com/Sem = inoculação com *A. brasilense* AbV5/AbV6 para a cultura do milho. Aveia preta não recebeu tratamento com N nem inoculação já que é uma cultura de cobertura de inverno.

Para a cultura do milho houve homogeneidade no número de cópias, não apresentando uma resposta decorrente da inoculação ou das diferentes doses de N aplicadas na cultura do milho. Além disso, foi possível verificar que a quantidade de bactérias desnitrificantes na cultura do milho foi maior em todos os tratamentos se comparada à aveia preta.

A homogeneidade do número de cópias de *nosZ* poderia ter sido influenciada pela precipitação durante a safra do milho, na qual foram registrados valores de 250 – 300 mm durante os meses de outubro a janeiro, tais valores foram acima da média anual dos últimos dez anos. Segundo Moreira e Siqueira (2006) a umidade e a aeração do solo afetam diretamente as taxas de desnitrificação, as quais aumentam quando a água preenche os espaços porosos do solo, já que isso contribui com a ausência de oxigênio. Segundo Kuypers e colaboradores (2018), os genes NOS são sensíveis à presença de oxigênio, fato que foi recentemente testado por Yang e colaboradores (2018), os quais demonstraram que a irrigação contribui com o aumento do número de cópias de *nosZ*, quando implementados diferentes regimes de irrigação no trigo.

Finalmente, os baixos valores de *nosZ* podem sugerir que existe um baixo potencial para a conversão de N_2O a N_2, tanto na aveia preta, como cultura de cobertura, como no milho plantado após aveia preta

Conclusões

Os dados obtidos com a quantificação do gene *nosZ* em aveia preta e milho possibilitam inferir que na área existe uma baixa conversão de N_2O a N_2, uma vez que o número de cópias do gene encontra-se baixo.

O baixo número de cópias de *nosZ* pode dever-se a uma baixa disponibilidade de substrato, isto é, de N_2O, provavelmente decorrente de baixa atividade de desnitrificação na área, sugerindo que as diferentes doses de nitrogênio que foram aplicadas, não impactaram no aumento do número de cópias do gene e como consequência, a taxa de N perdido por desnitrificação poderia ter sido baixa.

A precipitação é um fator abiótico que influencia de forma direta a atividade microbiana de microrganismos anaeróbicos ou anaeróbicos facultativos, como aqueles que participam no processo de desnitrificação.

Agradecimentos

Agradeço à PETROBRAS, INCT, CNPq, CAPES e Fundação Araucária do estado do Paraná pelo suporte financeiro, e o LABMOM /UEPG pelo suporte técnico.

Referências

CASTELLANO-HINOJOSA, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.; BEDMAR, E. J. Effect of nitrogen fertilisation on nitrous oxide emission and the abundance of microbial nitrifiers and denitrifiers in the bulk and rhizosphere soil of *Solanum lycopersicum* and *Phaseolus vulgaris*. **Plant and Soil**, p. 1-14, Jun. 2019.

COSKUN, D.; BRITTO, D. T.; SHI, W.; KRONZUCKER, H. J. How Plant Root Exudates Shape the Nitrogen Cycle. **Trends in Plant Science**, England v. 20, n. 8, p. 1–13, Jun. 2017.

HUANG, L.; RIGGINS, C. W.; RODRÍGUES-ZAS, S.; ZABALOY, M. C.; VILLAMIL, M.B. Long-term N fertilization imbalances potential N acquisition and transformations by soil microbes. **Science of the Total Environment**, v. 691, p. 562-571, Jul. 2019.

KASTL, E.-M.; SCHLOTER-HAI, B.; BUEGGER, F.; SCHLOTER, M. Impact of fertilization on the abundance of nitrifiers and denitrifiers at the root-soil interface of plants with different uptake strategies for nitrogen. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 1, p. 57-64, Jan. 2015

KLOOS, K.; MERGEL, A.; RÖSCH, C.; BOTHE, H. Denitrification within the genus Azospirillum and other associative bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 991-998, Sep. 2001.

KUYPERS, M. M. M.; MARCHANT, H. K.; KARTAL, B. The microbial nitrogen-cycling network. **Nature Reviews Microbiology**, 2018.

LADHA, J. K.; TIROL-PADRE, A.; REDDY, C.K.; CASSMAN, K.G.; VERMA, S.; POWLSON, D. S.; VAN KESSEL C.; RICHTER, D. B.; CHAKRABORTY, D.; PATHAK, H. Global nitrogen budgets in cereals: A 50-year assessment for maize, rice, and wheat production systems. **Scientific Report**, v. 6, Jan. 2016.

MAO, Y.; YANNARELL, A. C.; MACKIE, R. I. Changes in N-Transforming Archaea and Bacteria in Soil during the Establishment of Bioenergy Crops. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 2–3, 2011.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Biotecnologia do Solo. p. 729, 2006.

RUIZ-RUEDA, O.; HALLIN, S.; BAÑERAS L. Structure and function of denitrifying and nitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland. **FEMS microbiology ecology**, England, v. 67, n. 2, p. 308-19, Feb. 2009.

USYSKIN-TONNE, A.; HADAR, Y.; MINZ, D. Altering N_2O emissions by manipulating wheat root bacterial community. **Scientific Reports**, n. 7693, May. 2019.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. [s.l.] International Biological Programe Handbook, 15, 1970.

WAGHMODE, T. R. et al. Response of nitrifier and denitrifier abundance and microbial community structure to experimental warming in an agricultural ecosystem. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–12, 2018.

YANG, Y. D. et al. Variations of the nirS-, nirK-, and nosZ-denitrifying bacterial communities in a northern Chinese soil as affected by different long-term irrigation regimes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 14, p. 14057–14067, 2018.

ZUMFT, W. G. Cell biology and molecular basis of denitrification. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, United States, v. 61, n. 4, p. 533–616, Dez. 1997.