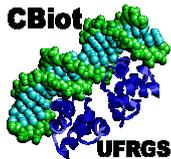


Análise de genes relacionados ao metabolismo de uréia e salicina em *Azospirillum amazonense*



Tiago Ebert Fritsch, Ricardo Cecagno, Irene Silveira Schrank*
*Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia
CBiot – Centro de Biotecnologia da UFRGS
tefritsch@gmail.com



Introdução

O gênero *Azospirillum* compreende bactérias diazotróficas que estão associadas com gramíneas. As espécies deste gênero têm sido estudadas devido a sua capacidade de promover o crescimento vegetal. O sequenciamento do genoma de *Azospirillum amazonense*, realizado no LNCC em colaboração com o nosso laboratório, identificou a presença de genes relacionados ao metabolismo de uréia e de salicina, conferindo a esta espécie a propriedade de crescer em fontes alternativas de nitrogênio e carbono, respectivamente.

Estudos de regulação da expressão gênica demonstraram que a fixação do nitrogênio ocorre apenas em condições especiais devido ao grande gasto energético por parte do microrganismo, uma destas condições é a baixa disponibilidade de nitrogênio intracelular. Portanto a utilização de fertilizantes nitrogenados, como a uréia, inibe a fixação biológica, além de possuir altos custos e causar danos ambientais.

A metabolização da salicina é realizada por uma enzima da família das β -glicosilase, que hidrolisa a conversão de salicina em glicose permitindo que a bactéria utilize salicina como fonte alternativa de carbono em condições de estresse.

Este trabalho tem como objetivo compreender o processo de metabolização de uréia e salicina em *A. amazonense*, já que não existem na literatura trabalhos relacionados a estudos de urease no gênero *Azospirillum* e a presença de genes que codificam proteínas para utilização de salicina somente foi descrita na espécie *Azospirillum irakense*.

Métodos e Resultados

- A sequência dos genes das espécies estudadas foram obtidas no NCBI, com exceção das sequências de *A. amazonense* que foi sequenciado no LNCC em colaboração com o nosso laboratório.
- As sequências de nucleotídeos relacionadas ao metabolismo da uréia e da salicina encontradas durante o sequenciamento do genoma de *A. amazonense* foram analisadas por BLAST para verificar sua função (Tabela 1) e possibilitar a montagem do *cluster* da urease.
- A construção do *cluster* da urease e salicina das diferentes bactérias foi realizada com o auxílio do programa *Artemis Release 2.0* (Figura 1 e 2).

Tamanho (pb)	Produto	Maior Similaridade (organismo)	E-value
813	Urease accessory protein UreD	Methylobacterium sp. 4-46	2,00E-52
303	Urease, gamma subunit	Rhizobium leguminosarum bv. trifolii	5,00E-43
327	Urease, beta subunit	Labrenzia alexandrii DFL-11	5,00E-41
1713	Urease, subunit alpha	Sinorhizobium meliloti 1021	0
483	UreE urease accessory-like protein	Roseomonas cervicalis ATCC 49957	2,00E-28
611	Urease accessory protein	Starkeya novella DSM 506	1,00E-20
591	Urease accessory protein	Beijerinckia indica subsp. indica	3,00E-89
455	HupE/UreJ protein	Acidovorax avenae subsp. avenae	9,00E-06
2232	Beta-glucosidase protein (SalA)	Caulobacter sp. K31	0
1878	Beta-glucosidase protein (SalB)	Agrobacterium vitis S4	0
2208	Sal operon transcriptional repressor (SalR)	Azospirillum irakense	3,00E-89
1056	Putative outer membrane salicin receptor (SalC)	Azospirillum irakense	0

Tabela 1. Resultado do BLASTX das sequências relacionados à expressão de genes relacionados a degradação da uréia e da salicina encontradas em *Azospirillum amazonense* em comparação com o Genbank.

- A análise do *cluster* da urease mostra diferença na organização dos genes entre as bactérias analisadas (Figura 1). *A. amazonense* possui uma proteína de membrana denominada HupE/UreJ (Tabela 1) que não ocorre no mesmo contexto gênico nas outras espécies, além de não possuir genes para outras proteínas dentro do *cluster*, semelhante ao que ocorre em *Klebsiella*.

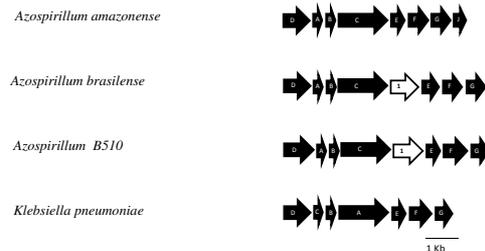


Figura 1- Organização do *cluster* de urease em diferentes bactérias. As setas pretas referem-se aos genes que estão envolvidos na expressão da urease, sendo que cada letra se refere a proteína da tabela anterior. A seta branca 1 – representa o gene da proteína glutamato racemase.

- A organização dos genes envolvidos na degradação da salicina é similar entre as duas espécies do gênero *Azospirillum* que possuem este grupo de genes. Em relação ao *Caulobacter sp. K31* só ocorre uma inversão no sentido do gene *salR*.

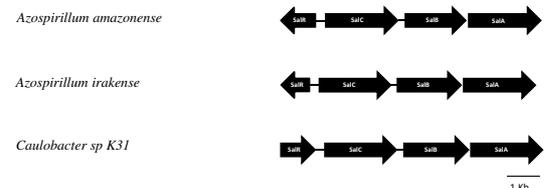


Figura 2- Organização do *cluster* da salicina em diferentes bactérias. As setas referem-se aos genes que estão envolvidos na degradação da salicina e estão especificados na Tabela 1.

- A capacidade de *A. amazonense* em utilizar salicina como fonte de carbono foi comprovada por meio da realização de uma curva de crescimento em três diferentes meios de cultura.

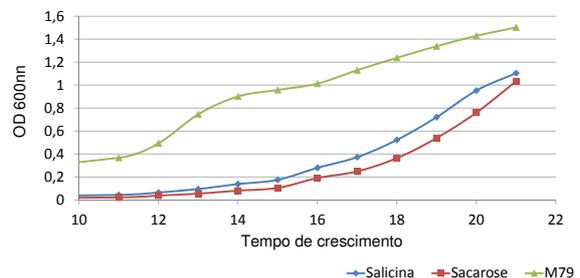


Figura 3. Curva de crescimento de *A. amazonense* em meio rico M79 (triângulo verde), e em dois meios mínimos suplementados com diferentes fontes de carbono, AMM + salicina (losango azul) e AMM + sacarose (quadrado vermelho) à 37 °C e 200rpm.

Conclusão

- O *cluster* de genes que codificam urease em *A. amazonense* possui uma organização diferente das demais espécies de *Azospirillum*.
- A organização do *cluster* de genes codificantes para salicina é bem conservada entre *A. amazonense* e *A. irakense*.
- O crescimento de *A. amazonense* em meio com salicina como fonte de carbono confirmou a presença destes genes nesta espécie.
- Dando prosseguimento ao trabalho vamos tentar elucidar a regulação da expressão destes dois conjuntos de genes por meio de RT-PCR.



Apoio Financeiro