



Categoria: Doutorado

Núcleo temático: Microrganismos na agricultura

Otimização do extrato de nódulos e Tween® 20 para detecção da estirpe elite *Rhizobium freirei* PRF 81 em nódulos de feijoeiro comum por PCR convencional

Cleudson Gabriel Nascimento da Silva¹; Marcia Soares Vidal²; Ederson da Conceição Jesus²

¹Doutorando em Microbiologia Agrícola, UFLA, cleudson@msn.com;

²Pesquisadores Embrapa Agrobiologia, marcia.vidal@embrapa.br; ederson.jesus@embrapa.br.

Uma das formas de se avaliar a ocupação nodular de leguminosas inoculadas com rizóbios é utilizar primers específicos para a estirpe alvo nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR). Essa avaliação pode ser dificultada pela presença de substâncias inibidoras da DNA polimerase no tecido do nódulo. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar condições ideais para viabilizar a detecção da estirpe *Rhizobium freirei* PRF 81 (= SEMIA 4080) em nódulos de feijoeiro comum cultivado em solo. Dois fatores foram testados: o volume do extrato de nódulo e a concentração do otimizador da PCR Tween® 20. O par de primers utilizado foi o PRF81/G534, que amplifica um fragmento de DNA específico do genoma da estirpe PRF 81 em amostras contendo até 0,1 ng de DNA alvo. Os extratos foram preparados a partir de nódulos com aproximadamente 2 mm de diâmetro, superficialmente desinfestados e macerados com auxílio de pinça em 90 µL de água ultra pura estéril, em triplicatas biológicas. Três volumes do extrato de nódulos (1, 2 e 3 µL) foram testados em combinação com quatro concentrações de Tween®20 (0,00; 0,06; 0,13 e 0,20%) utilizando o kit GoTaq® DNA Polymerase. Além disso, os diferentes volumes do extrato de nódulos também foram avaliados utilizando o kit KAPA 2G Robust PCR que contém seu próprio otimizador. Os produtos da PCR (7,5 µL) foram submetidos a eletroforese (80V/70min) em gel de agarose a 1,8% (m:v). O gel foi corado com brometo de etídeo, descorado por 30 min em água destilada e fotodocumentado para posterior análise. Os resultados mostram que a combinação de 2 µL do extrato de nódulos com 0,13% de Tween® 20 no volume final da amostra favoreceu a melhor amplificação na PCR de todas as repetições biológicas. As demais combinações e a utilização do kit KAPA 2G Robust PCR proporcionaram a observação de bandas pouco visíveis. Portanto, conclui-se que é possível fazer a detecção efetiva da bactéria *R. freirei* PRF 81 a partir do extrato de nódulos com a adição do otimizador Tween® 20 na PCR convencional.

Palavras chave:

monitoramento; SEMIA 4080; padronização.