

Banco ativo de germoplasma de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos: acervo estruturado como Coleção Institucional da Embrapa Milho e Sorgo.

Maycon Campos Oliveira⁽¹⁾; Christiane Abreu de Oliveira⁽²⁾; Thábata Alvares Fernandes⁽³⁾; Luciano Viana Cota⁽⁴⁾; Fernando Hercos Valicente⁽⁵⁾; Ivanildo Evódio Marriel⁽⁶⁾.

⁽¹⁾Analista; Embrapa Milho e Sorgo; Sete Lagoas, MG; maycon.oliveira@embrapa.br; ⁽²⁾Pesquisadora; Embrapa Milho e Sorgo; ⁽³⁾Estagiária; Embrapa Milho e Sorgo. ⁽⁴⁾Pesquisador; Embrapa Milho e Sorgo; ⁽⁵⁾Pesquisador; Embrapa Milho e Sorgo; ⁽⁶⁾Pesquisador; Embrapa Milho e Sorgo;

RESUMO: Devido a grande importância dos recursos microbianos na geração de novos produtos, em 2012, a Embrapa Milho e Sorgo iniciou, junto à Rede de Recursos Genéticos Microbianos da Embrapa, a criação de uma Coleção Institucional de Microrganismos, denominada de Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos (CMMF). Este trabalho teve como objetivo descrever as principais técnicas de preservação aplicadas ao acervo e características do banco de dados online da CMMF. A CMMF tem como objetivos estabelecer um acervo central, contendo o maior número possível de acessos de microrganismos, pertencentes a diferentes laboratórios de pesquisa da Embrapa Milho e Sorgo, além de organizar e facilitar o acesso à informação sobre os microrganismos preservados. Até o momento, encontram-se incorporados ao acervo da CMMF cerca de 4640 acessos de microrganismos, todos preservados por ultracongelamento a -80°C, e alguns preservados também sob óleo mineral e/ou liofilizados. Os dados disponíveis referentes a cada linhagem da coleção estão inseridos no sistema de informação da Embrapa (AleloMicro), que possui um módulo com acesso restrito, onde é realizado o cadastro e o gerenciamento das linhagens, e um módulo para consulta do público externo, que pode ser acessado por meio do endereço eletrônico: <http://alelomicro.cenargen.embrapa.br/>. Coleções de microrganismos, como a CMMF, representam uma fonte importante de genes e substâncias com grande potencial biotecnológico. A preservação adequada desses microrganismos é de grande interesse para instituições de pesquisa, para o agronegócio, indústria e meio ambiente.

Termos de indexação: Recursos genéticos microbianos, sistema de informação AleloMicro, preservação em longo prazo de microrganismos.

INTRODUÇÃO

A conservação de recursos genéticos microbianos, assim como a pesquisa com esses organismos, constituem práticas estratégicas para o desenvolvimento científico e tecnológico do setor agropecuário. Os microrganismos desempenham papel importante na sustentabilidade da agricultura, e as regiões tropicais são provavelmente aquelas que constituem a mais rica fonte de novas espécies (Figueiredo et al., 2008).

Desde 1991, a Embrapa Milho e Sorgo investe na formação de coleções de microrganismos de interesse agrícola. Estas coleções incluem diferentes grupos de microrganismos, como: bactérias diazotróficas associativas isoladas de milho, sorgo ou milheto, fungos micorrízicos arbusculares, microrganismos fitopatogênicos, bactérias e vírus com potencial no controle biológico de insetos-praga e microrganismos promotores do crescimento de planta, como os biossolubilizadores de nutrientes (fósforo e potássio).

Para assegurar a rastreabilidade da informação das amostras depositadas e a viabilidade em longo prazo dos microrganismos, atendendo às normas de qualidade nacionais e internacionais, a Embrapa Milho e Sorgo iniciou em 2012 a organização e estruturação de um acervo institucional de microrganismos: Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos (CMMF) (Paiva et al., 2013).

A CMMF faz parte da Rede de Recursos Genéticos Microbianos da Embrapa e tem como objetivos em curto prazo padronizar a metodologia de conservação, além de providenciar o cadastro dos dados relacionados aos microrganismos no Sistema de Informação da Embrapa (AleloMicro). Em longo prazo, a CMF pretende implementar processos gerenciais e operacionais seguindo as Diretrizes e os Requisitos Corporativos de

Qualidade para Coleções de Microrganismos da Embrapa (Castro et al., 2015; Pontes et al., 2015).

Este trabalho teve como objetivo descrever as principais técnicas de preservação aplicadas ao acervo e aspectos do banco de dados online da Coleção de microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo.

MATERIAL E MÉTODOS

Preservação de microrganismos

Para serem incorporados ao acervo da CMMF os microrganismos são reativados em placa de Petri, contendo meio de cultura apropriado, utilizando técnicas de semeadura que possibilitam a obtenção de colônias isoladas para a checagem da pureza da cultura. Posteriormente, uma colônia isolada é recolhida e utilizada para a preparação de novos estoques que podem ser realizados utilizando os seguintes métodos de preservação de microrganismos:

- Ultracongelamento: consiste na preservação dos microrganismos a temperaturas muito baixas (-80°C). Baixas temperaturas protegem o DNA e as proteínas contra danos e desnaturação e diminuem o movimento da água celular. Consequentemente, as atividades bioquímicas e fisiológicas das células microbianas são essencialmente interrompidas e as células se mantêm protegidas por longos períodos (Prakash et al., 2013). Para a preservação dos microrganismos da CMMF uma colônia isolada é recolhida, transferida para uma nova placa de Petri e espalhada sobre toda a superfície do meio de cultura. Após o crescimento, a cultura de microrganismos é recolhida da superfície do meio, solubilizada em uma solução de crioproteção (glicerol 25%), congelada em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

- Armazenamento sob óleo: consiste na adição de óleo mineral às culturas estabelecidas em meio de cultivo inclinado. O óleo evita a desidratação e reduz a atividade metabólica por meio da redução da disponibilidade de oxigênio (Martin, 1964). Os microrganismos da CMMF são cultivados em frascos de penicilina contendo meio de cultura inclinado, após o crescimento é adicionado óleo mineral estéril sobre a cultura até aproximadamente 2/3 do volume do frasco. Os frascos são selados com tampa de borracha e lacre de alumínio e armazenados na sala de preservação da coleção à temperatura de 20°C ± 5°C.

- Liofilização (*Freeze-drying*): trata-se também de uma técnica de preservação em longo prazo, que consiste na dessecação do material congelado, sob vácuo, através da sublimação (Morgan et al., 2006). Assim como no procedimento para a preservação dos microrganismos da CMMF por ultracongelamento, uma colônia isolada é transferida para uma nova placa de Petri e

espalhada sobre toda a superfície do meio de cultura. Após o crescimento, a cultura de microrganismos é recolhida da superfície do meio, solubilizada em uma solução de crioproteção (sacarose 10%) e alíquotas de 1 mL da suspensão de microrganismos são transferidas para frascos de liofilização. Os frascos são congelados em ultrafreezer a -80°C por cerca de 24h, antes de serem transferidos para o liofilizador (Christ, modelo Alpha 2-4 LD plus). As amostras são liofilizadas utilizando os seguintes parâmetros: -50°C e 0,040 mbar durante 24h (secagem primária), e -55°C e 0,021 mbar durante 30 min (secagem secundária). Ao término do processo de liofilização os frascos são selados a vácuo e armazenados na sala de preservação da coleção à temperatura de 20°C ± 5°C.

Sistema de Informação AleloMicro

A CMMF e as outras coleções de microrganismos da Embrapa mantêm todos os dados disponíveis de linhagens inseridos no sistema de informação AleloMicro (<http://alelomicro.cenargen.embrapa.br/>).

O AleloMicro conta com um banco de dados centralizado constituído de dois módulos interligados, o Alelo Micro Base de Dados (Sistema) e o Alelo Micro Web (Consultas). A Base de Dados é de uso restrito, com acesso controlado para curadores e parte das informações são disponibilizadas para acesso externo via Alelo Micro Web.

A Base de Dados contempla informações mínimas requeridas mundialmente sobre determinada linhagem e sua incorporação nas diferentes Coleções [Passaporte], tais como dados de coleta, isolamento e purificação; a identificação taxonômica; a inserção do acesso na coleção; a catalogação das amostras do acesso na Coleção (armazenamento), entre outras. O usuário externo pode consultar via o Alelo Micro Web algumas informações básicas sobre as linhagens mantidas nas Coleções.

Além dos dados de Passaporte, a Base de Dados permite a incorporação de informações sobre características específicas de cada linhagem [Observação]. O usuário externo pode consultar via o Alelo Micro Web as diferentes linhagens que foram submetidas à experimentação e solicitar ao curador as informações sobre os resultados da pesquisa. É também por esse módulo que pode ser feita a solicitação de amostras para os curadores das Coleções que disponibilizam seus materiais para intercâmbio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF)

é composta atualmente por três subcoleções de microrganismos: subcoleção de bactérias e vírus entomopatogênicos (CBE); subcoleção de fitopatógenos de milho e sorgo (CFMS) e subcoleção de microrganismos diazotróficos e promotores de crescimento vegetal (CMPC).

A subcoleção de bactérias e vírus entomopatogênicos (CBE) é composta por linhagens de *Bacillus thuringiensis* e *Baculovirus spodoptera* isoladas no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo com o objetivo de serem utilizadas no desenvolvimento de novos biopesticidas para o controle de insetos praga. A CBE conta com cerca de 5000 acessos destes microrganismos, dentre os quais 3408 já estão cadastrados no sistema Alelo Micro, 77 deles disponíveis para consulta do público externo via Alelo Micro Web (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Número de microrganismos da subcoleção CBE cadastrados no Alelo Micro.

Microrganismos	Nº de Acessos
<i>Bacillus thuringiensis</i>	3408
Total	3408
Consulta via Alelo Micro Web	Nº de Acessos
Sim	77
Não	3331
Total	3408

A subcoleção de fitopatógenos de milho e sorgo (CFMS) contém cerca de 4000 linhagens de fungos fitopatogênicos isolados no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Milho e Sorgo após coleta em diferentes regiões do Brasil de plantas de Milho ou Sorgo apresentando sintomas de doenças. Atualmente, 1341 acessos de microrganismos pertencentes à CFMS encontram-se cadastrados no sistema Alelo Micro, a maioria deles (1318) disponível para consulta do público externo via Alelo Micro Web (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Número de microrganismos da subcoleção CFMS cadastrados no Alelo Micro.

Microrganismos	Nº de Acessos
<i>Colletotrichum graminicola</i>	63
<i>Colletotrichum sublineolum</i>	1045
<i>Fusarium verticillioides</i>	227
<i>Phaeocytostroma ambiguum</i>	6
Total	1341
Consulta via Alelo Micro Web	Nº de Acessos
Sim	1318
Não	23
Total	1341

A subcoleção de microrganismos diazotróficos e promotores de crescimento vegetal (CMPC) é composta por uma grande diversidade de grupos de microrganismos que incluem bactérias diazotróficas associativas isoladas de milho, sorgo ou milheto, leveduras endofíticas de sorgo sacarino, fungos endofíticos de milho ou sorgo, bactérias e fungos solubilizadores de fosfato ou potássio, microrganismos antagonistas, fungos micorrízicos arbusculares, entre outros. A CMPC possui cerca de 4000 acessos de microrganismos, dentre os quais 1193 encontram-se cadastrados no sistema Alelo Micro e 638 disponíveis para consulta do público externo via Alelo Micro Web (**Tabela 3**). A grande maioria dos microrganismos pertencentes à subcoleção CMPC foi isolada na Embrapa Milho e Sorgo pelo Laboratório de Microbiologia do Solo ou pelo Laboratório de Ecologia Microbiana, entretanto, alguns isolados de fungos de interesse ambiental ou alimentar foram incorporados à CMPC provenientes da Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ – Campus Sete Lagoas).

Tabela 3 – Número de microrganismos da subcoleção CMPC cadastrados no Alelo Micro.

Microrganismos	Nº de Acessos
<i>Arthrobacter</i> sp.	2
<i>Aspergillus</i> sp.	8
<i>Azospirillum</i> sp.	67
<i>Bacillus</i> sp.	35
Bactérias não identificadas	733
<i>Bionectria</i> sp.	2
<i>Burkholderia</i> sp.	7
Fungos não identificados	174
<i>Klebsiella</i> sp.	4
Leveduras	25
<i>Mucor</i> sp.	5
Outros	20
<i>Paenibacillus</i> sp.	5
<i>Pantoea</i> sp.	17
<i>Penicillium</i> sp.	24
<i>Pseudallescheria</i> sp.	2
<i>Pseudomonas</i> sp.	3
<i>Rhizobium</i> sp.	2
<i>Talaromyces</i> sp.	5
<i>Trichoderma</i> sp.	53
Total	1193
Consulta via Alelo Micro Web	Nº de Acessos
Sim	638
Não	555
Total	1193

Os acervos originais das subcoleções CBE, CFMS ou CMPC estão localizados nos diferentes laboratórios da Embrapa Milho e Sorgo onde os microrganismos foram primeiramente isolados. Nestes acervos, também chamados de coleções de trabalho, a maioria dos microrganismos é mantida conservada a temperatura ambiente em ágar inclinado sob óleo mineral esterilizado (CFMS e CMPC) ou congelada a -20°C (CBE).

Os microrganismos diferem quanto às condições necessárias para a preservação em longo prazo, o que demanda a utilização de procedimentos diferenciados para assegurar as condições ideais de preservação, viabilidade e pureza. De acordo com as Diretrizes e os Requisitos Corporativos de Qualidade para Coleções de Microrganismos da Embrapa (Castro et al., 2015; Pontes et al., 2015), é recomendável que cada linhagem seja mantida em, pelo menos, dois métodos diferentes de preservação, sendo pelo menos um deles o ultracongelamento ou a liofilização. Diante disso, a coleção institucional de microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo, CMMF, pretende estabelecer um acervo central reunindo o maior número possível de acessos de microrganismos das coleções de trabalho e realizar a preservação destes microrganismos por ultracongelamento e/ou liofilização. Atualmente, já foram incorporados ao acervo da CMMF cerca de 4640 acessos de microrganismos, sendo 2106 sub-amostras da coleção CBE, 1193 sub-amostras da coleção CMPC e 1341 sub-amostras da coleção CFMS. Todos estes acessos estão mantidos na CMF preservados por ultracongelamento a -80°C. Além do ultracongelamento, alguns acessos estão preservados sob óleo mineral e também liofilizados.

CONCLUSÕES

A Embrapa Milho e Sorgo possui cerca de 13000 linhagens de microrganismos espalhadas em diferentes laboratórios de pesquisa. Cópias de cada uma dessas linhagens serão preparadas para a preservação em longo prazo, como o ultracongelamento a -80°C ou a liofilização, e incorporadas ao acervo da Coleção Institucional da Embrapa Milho e Sorgo, denominado de Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos (CMMF). Além disso, os dados disponíveis referentes a cada linhagem de microrganismos serão inseridos no sistema de informação da Embrapa (AleloMicro), facilitando o intercâmbio entre instituições de ensino e pesquisa.

Até o momento, encontram-se incorporados ao acervo da CMMF cerca de 4640 acessos de microrganismos, todos preservados por ultracongelamento a -80°C, e alguns preservados também sob óleo mineral e/ou liofilizados.

As informações disponíveis, referentes a 5942

linhagens de microrganismos já estão inseridas no sistema AleloMicro, sendo que os dados referentes a 2033 destas linhagens podem ser consultas pelo público externo por meio do endereço eletrônico: <http://alelomicro.cenargen.embrapa.br/>.

Coleções de microrganismos, como a CMMF, representam uma fonte importante de genes e substâncias com grande potencial biotecnológico. Assim, a preservação adequada desses microrganismos é de grande interesse para instituições de pesquisa, para o agronegócio e também para o meio ambiente.

AGRADECIMENTOS

Fapemig, CNPq, Embrapa

REFERÊNCIAS

CASTRO, C. S. P. de; COUTINHO, M. V.; SILVA, F. A. da; SILVA, G. A. da; LIMA, L. H. C.; BRITO, M. A. V. de P. e; HUNGRIA, M.; AVIDOS, M. F. D.; BURLE, M. L.; AQUINO, M. de; LOPES, R. B.; PONTES, R. G. M. S. de; COSTA, S. de P. P.; CASTRO, C. S. P. de Diretrizes de gestão para coleções de microrganismos da Embrapa. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2015. 23 p. GESTCOL - Gestão de Coleções Microbiana.

FIGUEIREDO, M. do V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. de R. e S. (Ed.). Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. Guaíba: Agrolivros, 2008. 566 p.

MARTIN, S. M. Conservation of microorganisms. *Annu Rev Microbiol* 18:1-16, 1964.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of micro-organisms by drying; a review. *J Microbiol Methods* 66(2):183-193, 2006.

PAIVA, C. A. O.; OLIVEIRA, M. C.; MARRIEL, I. E.; SOUZA, F. A. de; VALICENTE, F. H.; COTA, L. V. Manual de Gestão da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo (CMMF). Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 47 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 153).

PONTES, R. G. M. S. de; CASTRO, C. S. P. de; COUTINHO, M. V.; LIMA, L. H. C. Requisitos corporativos de qualidade para coleções de microrganismos da Embrapa. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2015. 15 p.

PRAKASH, O.; NIMONKAR, Y.; SHOUCHE, Y.S. Practice and Prospects of Microbial Preservation. *FEMS Microbiol Lett* 339:1-9, 2013.



XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Milho e Sorgo: inovações,
mercados e segurança alimentar"
