

Análise estrutural do plasmídeo simbiótico de *Rhizobium tropici* CFN299

Daisy Rickli Binde¹; Mariangela Hungria²; Lígia Maria de Oliveira Chueire²; Ismael Hernandez Lucas³; Marisa Fabiana Nicolás⁴; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos⁴; Luiz de Paula Gonzaga⁴; Esperanza Martinez-Romero³; Fernando Gomes Barcellos⁵; Miriam Francisca da Silva⁶. ¹Bolsista de Especialização da Embrapa Soja; ²Embrapa Soja; ³Centro de Fijación de Nitrógeno, UNAM, Cuernavaca, México; ⁴Laboratório Nacional de Computação Científica; ⁵Bolsista ProDoc CAPES; ⁶Bolsista de AT do CNPq.

Introdução

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é usado em larga escala na América Latina, pelo seu baixo custo e alto valor nutricional, sendo a fonte mais importante de proteína para a população. Hoje, o Brasil é o segundo maior produtor do mundo dessa leguminosa. A cultura ocupou 4,8 milhões de hectares em 2001/2002, mas o país apresenta um dos níveis mais baixos de produtividade, sendo de apenas 834 kg/ha (Hungria et al., 2003).

Para obtenção de altas produtividades, é indispensável a reposição de nutrientes essenciais à planta e o emprego de tecnologia na cultura. O nitrogênio é um elemento essencial para o crescimento das plantas e a sua reposição é fundamental. Uma alternativa é o uso de fertilizantes nitrogenados que contudo, apresentam alto custo e sobre tudo, poluem significativamente as águas, alterando seu equilíbrio. Em contrapartida, a inoculação com bactérias do gênero *Rhizobium*, apresenta baixo custo e não possui caráter poluente. Além disso, o uso de inoculantes evita a queda da produtividade, preservando assim a fertilidade do solo (Hungria et al., 2003).

Para o aumento da produtividade é necessária a busca por estirpes cada vez mais eficientes e competitivas com relação às características de eficiência e competitividade na fixação biológica do nitrogênio (FBN). A prospecção de genes (por meio do seqüenciamento genômico) relacionados a características de eficiência e competitividade na FBN em estirpes superiores de

rizóbios (como as utilizadas atualmente nos inoculantes comerciais) tem sido uma estratégia para o entendimento dos fatores relacionados à FBN e para o desenvolvimento de metodologias para a seleção e obtenção de estirpes de rizóbios cada vez mais promissoras.

Objetivo

Realizar o seqüenciamento do plasmídeo simbiótico (*pSym*) da estirpe CFN 299 de *Rhizobium tropici*, procurando genes relacionados à competitividade e eficiência no processo de fixação biológica do nitrogênio.

Material e Métodos

Construção de bibliotecas genômicas do *pSym* da estirpe CFN 299 de *R. tropici*

Extração de DNA genômico

O DNA dos *pSym* da estirpe CFN299 foi fornecido pelo Centro de Fijación de Nitrógeno – Universidade Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México.

Construção de bibliotecas

O preparo da biblioteca “shotgun” envolveu a purificação do DNA e a fragmentação aleatória do mesmo, por meio mecânico (nebulização), gerando fragmentos de 500 pares de bases (pb) a 2 kb. Após a fragmentação, as extremidades foram reparadas pelo uso do fragmento enzimático Klenow da DNA polimerase de *Escherichia coli* e fosforilados com uso da enzima PNK (polinucleotídeo quinase). Os fragmentos de 500 pb a 2 kb foram separados em gel de agarose “low melting” 1%, grau analítico (Invitrogen). Após recuperação, os mesmos foram ligados ao vetor pUC18 (digerido com a enzima de restrição *Sma*I e desfosfatado com a enzima BAP) (GE Healthcare) com o uso da enzima T4 DNA ligase. Após a ligação, o material foi utilizado para transformação de células de *E. coli* estirpe TOP10 (Invitrogen), pela metodologia de eletroporação. As células foram inoculadas em meio LB (sem antibiótico) por mais ou menos 1 hora e em seguida semeadas em

meio LA contendo ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Sigma) e 50 mg.mL^{-1} de X-Gal e $0,1\text{M}$ de IPTG, e cultivadas durante a noite a 37°C .

Seqüenciamento

Colônias brancas individuais (clones recombinantes) foram inoculadas em meio "Terrific Growth" (Sigma) e ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), cultivadas a 37°C , 150rpm , por uma noite. Após o cultivo, foram obtidos "pellets" por centrifugação a 4.000 rpm , por 8 minutos.

O DNA foi extraído pelo método de lise alcalina (Sambrook, 1987). O DNA purificado foi seqüenciado utilizando o "kit" "DYEnamicTM ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACETM)" (GE Healthcare). Foram realizadas duas reações de seqüenciamento, uma com o primer "Universal" ($5'\text{GACGTTGT AAAACGACGGCCAGT3}'$) e a outra com o "Reverso" ($5'\text{TTTCACACAGGAAA CAGCTATGAC3}'$), para a obtenção das seqüências dos fragmentos. Os produtos das reações foram analisados em seqüenciador automático (MegaBace1000, GE Healthcare).

Montagem do genoma e Análise da ORFs obtidas

As leituras obtidas foram submetidas à análise de bioinformática, realizada no LNCC com o programa SABIÁ, que integra vários programas de domínio público: "phred", "phrap", "Consed", "phrapview" e permite a identificação de "CDSs" (coding sequencer) como os programas "Glimmer", BLAST, KEGG, COG, INTERPRO e PSORT.

Resultados e Discussão

O seqüenciamento do pSym já permitiu a cobertura do genoma em 12 vezes, faltando apenas alguns intervalos entre os CDSs para completar o plasmídeo. Os resultados obtidos estão apresentados nos quadros 1, 2 e 3.

Quadro 1. Número de leituras

Número total de leitura	8.769
Número de leituras sem vetor ($\geq 10\%$ vetor)	6.931
Número de leituras com 10-80% de vetor	1.434
Número de leituras com mais de 80% de vetor	404

Quadro 2. Número de bases

Número de bases depositadas (pb) - excluindo vetores e bases de baixa qualidade	8.360.378 (100%) (12,29 vezes o tamanho estimado do genoma)
Número de bases com qualidade ≥ 20 (bp)	4.492.065 (47,12%)
Número de bases com qualidade ≥ 30 (bp)	3.499.634 (36,71%)

Quadro 3. Cobertura do genoma

Comprimento estimado do genoma (pb)	680.000
Cobertura do Genoma	762.909 (112,19% do comprimento estimado)
Cobertura do Genoma usando contigs > 3Kb	417,266 (61,36 % do comprimento estimado)

Referências

- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 39, p. 88-93, 2003.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K., Ed. **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2005.
- SAMBROOK, J. **Molecular cloning: laboratory manual**. 2.ed. Fritsch: T. Maniatis, 1987.