

Seqüenciamento do plasmídeo simbiótico da estirpe CFN 299 de *Rhizobium tropici*

Daisy Rickli Binde¹; Ligia 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; José Eduardo Garcia⁷; Mariangela Hungria². ¹Bolsista de Especialização da Embrapa Soja; ²Embrapa Soja; ³Centro de Fijación de Nitrógeno, Cuernavaca, México; ⁴Laboratório Nacional de Computação Científica; ⁵Bolsista de pós-doutorado do CNPq; ⁶Bolsista de AT do CNPq; ⁷UEL.

Introdução

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N_2) (FBN) é o processo de redução do N_2 a amônia (NH_3), catalisado pelo complexo enzimático da nitrogenase. Esse complexo é encontrado somente em procariotos denominados fixadores de N_2 , ou diazotróficos, incluindo bactérias e arqueobactérias. Nenhum organismo eucarioto, animal ou planta, é capaz de utilizar o N_2 diretamente em seus processos biossintéticos, apesar da larga disponibilidade desse gás na atmosfera (cerca de 80%). A FBN constitui a principal via de incorporação do N_2 à biosfera, perfazendo cerca de 65% do total, ou 96% da fixação por processos naturais e é considerada, após a fotossíntese, como o processo biológico mais importante, sendo fundamental para a vida na Terra (Hungria et al., 2005)

Hoje o Brasil é o segundo maior produtor de feijão do mundo (*Phaseolus vulgaris* L.), que é a fonte mais importante de proteína para a população. A cultura ocupou 4,8 milhões de hectares em 2001/2002, mas o país também apresenta uma das mais baixas produtividades mundiais, de apenas 834 kg/ha. O baixo nível de tecnologia empregado na cultura e o cultivo em solos de baixa fertilidade, especialmente pobres em N contribuem, fortemente, para esse cenário. Conseqüentemente, o suprimento adequado de N, pela simbiose com bactérias capazes de fixar o N_2 de modo

eficaz, representa uma alternativa para aumentar o rendimento do feijoeiro nacional com baixo custo, além de evitar a contaminação dos recursos hídricos, pelo nitrato, e de diminuir a emissão de gases com efeito estufa (Hungria et al., 2003).

Rhizobium tropici é uma bactéria Gram-negativa, com a habilidade de nodular leguminosas como o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e a leucena (*Leucaena leucocephala*). Pode-se citar, dentre as principais características dessa espécie, a resistência a metais pesados, à acidez do solo e a temperaturas elevadas (Martinez-Romero et al., 1991). As características de adaptabilidade de *R. tropici* resultaram em que, para a cultura do feijoeiro, esta seja a única espécie de *Rhizobium* recomendada para o uso de inoculantes no Brasil (Hungria et al., 2003).

O genoma de *R. tropici* inclui vários plasmídeos e, em um deles, conhecido como plasmídeo simbiótico (pSym), estão todos os genes necessários à nodulação e FBN. Uma característica interessante do pSym é que seu "replicon" confere a capacidade de nodular e fixar N_2 a diferentes bactérias, que normalmente não possuem essa habilidade, como *Agrobacterium tumefaciens*, *Ochrobactrum antropii*, *Brucella melitensis* e *Ensifer adherens*. Em um esforço para caracterizar geneticamente o pSym, o grupo de pesquisa de Cuernavaca tentou curar esse replicon. Contudo, só foram conseguidas deleções, sugerindo que o plasmídeo contém, além dos genes relacionados à nodulação e FBN, outros genes necessários para a sua viabilidade.

Este projeto propõe-se a realizar o seqüenciamento do pSym, da estirpe CFN 299 de *R. tropici*. Com isso, poderá ser possível: 1) Identificar novos genes envolvidos na interação planta-rizóbio; 2) Verificar se o pSym possui genes essenciais à sobrevivência da bactéria; 3) Verificar se o plasmídeo contém ilhas patogênicas ou simbióticas, bem como genes de metabolismo. Além disso, a análise dos genes do pSym permitirá entender os mecanismos que conduzem à grande adaptação de *R. tropici* em solos tropicais, ácidos e submetidos, com frequência, a temperaturas elevadas, definindo estratégias para a inoculação do feijoeiro que permitam a maximização do processo de FBN para esta cultura no Brasil.

Objetivo

Realizar o seqüenciamento do plasmídeo simbiótico da estirpe CFN 299 de *Rhizobium tropici*, procurando genes relacionados à competitividade e eficiência do 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 do pSym foi obtido no Centro de Fijación de Nitrógeno, Cuernavaca, México e enviado para a Embrapa Soja. Até o presente momento, foram realizadas duas bibliotecas do pSym. O DNA foi extraído utilizando, para o rompimento da parede celular, degradação de proteínas, polissacarídeos, restos de parede e RNA, os reagentes SDS, proteinase-K, fenol, clorofórmio e RNase. Após a purificação, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro.

- Construção de bibliotecas

O preparo da biblioteca "shotgun" envolveu a purificação do DNA e a fragmentação deste DNA ao acaso, por meio mecânico (nebulização). O DNA misturado com glicerol 50% e NaOAc 3M foi nebulizado por 30 segundos a uma pressão de 2 Kgf/cm², a fim de obter fragmentos de 500 pares de bases (pb) a 2 kb. A fragmentação foi confirmada em gel de agarose 1%. Após a fragmentação, as extremidades foram reparadas e fosforiladas pelo uso do fragmento enzimático Klenow da DNA polimerase de *Escherichia coli*. Os fragmentos de 500 pb a 2 kb foram separados em gel de agarose "low melting", grau analítico. Após recuperação dos fragmentos a partir do gel de agarose, os mesmos foram colocados para se ligarem ao vetor pUC18, digerido com a enzima de restrição *Sma*I-BAP e defosforilados com a enzima T4 DNA ligase. Após a ligação, o material foi utilizado para transformação de células de *E. coli* estirpe DH10B, através da técnica de eletroporação. As células foram plaqueadas em meio Luria-

Bertani contendo ampicilina (100 ug/ml, previamente esterilizada com filtro 0,2 µm), IPTG e X-gal e as bactérias foram crescidas durante a noite, a 37°C.

- Seqüenciamento

No processo de seqüenciamento, colônias brancas individuais (clones recombinantes) são inoculadas em placas de crescimento de cultura com 96 poços contendo meio "Terrific Grow" (12 g/L de bactotripton, 24 g/L de extrato de levedura e 4 mL/L de glicerol) e ampicilina (100 µL/mL). As bactérias são crescidas com agitação de 150 rpm, a 37°C, "overnight". As placas de crescimento de cultura são utilizadas para estoque em glicerol (80%), sendo então reinoculadas em blocos de crescimento, seguindo o mesmo procedimento anteriormente descrito. Após o crescimento, são obtidos "pellets", por centrifugação a 4.000 rpm, por 8 minutos. O DNA é, então, extraído pelo método de rompimento alcalino. Após o rompimento da parede celular das bactérias, os restos de parede celular, polissacarídeos e proteínas remanescentes são seletivamente precipitados com KOAc 3M (acetato de potássio estocado a 4°C, pH 4,7-4,9). O sobrenadante é filtrado por filtros múltiplos (MultiScreen, Millipore) e o DNA, obtido através da filtragem, é purificado e resuspenso em água, verificando-se a concentração em gel de agarose a 1%.

O DNA precipitado é seqüenciado, utilizando-se o "kit" "DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACE™)" (Amersham Pharmacia Biotech). As reações de PCR são realizadas com os "primers" "Universal" e "Reverso", para se conseguir a amplificação dos genes. Os produtos da reação são analisados em um seqüenciador automático (MegaBace1000, Amersham), pelo método dos terminadores fluorescentes.

- Montagem do genoma

As leituras obtidas são 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 ORFs ("open reading frames") como os programas "Glimmer", BLAST, KEGG, COG, INTERPRO e PSORT.

Resultados

Duas bibliotecas já foram obtidas e validadas. Foi construída uma "homepage" para o projeto (www.bnf.lncc.br) e os resultados obtidos, até o presente momento, constam dos Quadros 1 e 2.

Quadro 1. Leituras do pSym de *R. tropici* CFN 299.

Número total de leituras	1.325
Número total de leituras sem vetores (<= 10% vector)	1.037
Número de leituras com 10-80% de bases de vetores	208
Número de leituras com mais de 80% de bases de vetores	80

Quadro 2. Bases obtidas do pSym de *R. tropici* CFN 299.

Número de bases depositadas (pb) (excluindo os vetores, incluindo bases de baixa qualidade)	1.220.032 (100%) (61% do genoma, estimado em 2 milhões de pb)
Número de bases com qualidade elevada >= 20 (pb)	718.579 (51,50%)
Número de bases com qualidade >=30 (pb)	585.373 (41,95%)
Número de bases com vetores (pb)	175.288 (12,56%)
Comprimento médio (pb)	920,78
Média de comprimento (qualidade >=20) (pb)	542,32
Cobertura do genoma sem considerar sobreposição	257.338 (12,9%)

Considerações Finais

A estratégia de construção e validação das bibliotecas foi confirmada e deverá permitir o sequenciamento do plasmídeo simbiótico da estirpe CFN 299 de *R. tropici*.

Agradecimentos

Ao CNPq, pelo financiamento parcial do Projeto (50.5499/2004-5, 50.5946/2004-1 e 301241/2004-0).

Referências Bibliográficas

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., eds. **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston, Texas: Studium Press, LLC, 2005. (no prelo).

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.H.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.417-426, 1991.