

Panorama genômico de *Rhizobium tropici* estirpe PRF 81 (Semia 4080)

Fabiana Gisele da Silva Pinto¹; Lígia Maria de Oliveira Chueire²; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos³; Marisa Fabiana Nicolas³; Luiz Gonzaga³; Emilene André⁴; Mariangela Hungria². ¹Bolsista de Doutorado UEL/Embrapa Soja; ²Embrapa Soja; ³Laboratório Nacional de Computação Científica; ⁴Bolsista de Iniciação Científica do CNPq.

Introdução

O Brasil é o segundo maior produtor e o maior consumidor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). A cultura do feijoeiro ocupou, nas três safras anuais conduzidas em 2004, cerca de 4.000.000 ha, com uma produção de mais de 3.000.000 toneladas, mas com rendimento médio nacional bastante baixo, de apenas 826 kg ha⁻¹ (CONAB, 2004). 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 diazotróficas, de modo eficaz, representa uma alternativa para aumentar os rendimentos nacionais a um baixo custo, além de evitar a contaminação dos recursos hídricos pelo nitrato e de diminuir a emissão de gases com efeito estufa. A eficiência do processo de fixação biológica do N₂ (FBN) com a cultura do feijoeiro, porém, tem sido considerada baixa, por problemas relacionados à nodulação, dificuldade de introdução de melhores estirpes e baixa tolerância a estresses ambientais, como temperaturas elevadas e deficiência hídrica.

Contudo, a seleção, por nosso grupo de pesquisa, de estirpes mais eficientes e competitivas, dentro da variabilidade natural da população do solo, conseguiu identificar a estirpe PRF 81 (= SEMIA 4080) de *R. tropici*. A obtenção de rendimentos elevados de até 4.000 kg ha⁻¹, obtidos com a inoculação da estirpe PRF 81 conduziram à sua recomendação para o uso em inoculantes comerciais desde 1998 (Hungria et al., 2000, 2003).

Como o Brasil é, atualmente, o país que mais utiliza a tecnologia de inoculação (Hungria et al., 2003), torna-se importante desenvolver estudos de genômica com estirpes brasileiras, particularmente com o microssimbionte do feijoeiro, cultura que necessita um impulso tecnológico para incrementar os rendimentos a um baixo custo.

Por meio de uma estratégia denominada determinação do panorama genômico, baseada no seqüenciamento parcial, de cerca de 10% a 15% do genoma (Viprey et al., 2000), da estirpe PRF 81 de *R. tropici* é possível identificar, por homologia com os demais genomas, genes relacionados com o processo de FBN, bem como com a capacidade saprofítica. Pela análise desses genes é possível, ainda, identificar diferenças na estrutura do genoma dessa estirpe eficiente e competitiva e que permitam delinear novas estratégias que contribuam para minimizar as limitações à FBN, freqüentemente relatadas na simbiose com a cultura do feijoeiro.

Objetivo

Obter o panorama genômico, com a cobertura de 10 a 15% do genoma da estirpe de *Rhizobium tropici* PRF 81 (= SEMIA 4080), utilizada em inoculantes comerciais para a cultura do feijão.

Material e Métodos

- Extração do DNA genômico

A partir dos "pellets" obtidos de células da estirpe PRF 81 de *R. tropici*, após o crescimento em meio de cultura LB (Sambrook et al., 1989), centrifugação a 10.000 g por 20 minutos e estocagem a -70°C, o DNA genômico das bactérias foi extraído pelo método descrito por Sambrook et al. (1989). Após o rompimento da parede celular das bactérias, os restos de parede celular, polissacarídeos e proteínas remanescentes foram seletivamente precipitados com o reagente CTAB ("hexadecyltrimethylammonium bromide") e o DNA de alto peso molecular

foi recuperado do sobrenadante por precipitação com etanol. Este DNA de alto peso molecular e de boa qualidade foi utilizado para a construção das bibliotecas de "shotgun".

- Construção de bibliotecas "shotgun"

Após a purificação do DNA genômico, a fragmentação do DNA foi realizada ao acaso, por meio mecânico (nebulização). Após a fragmentação, as extremidades foram reparadas e fosforiladas pelo uso do fragmento Klenow da DNA polimerase de *Escherichia coli* e/ou a DNA polimerase T7-fago. Fragmentos com tamanho entre 1,5-4,0 kb foram separados em gel de agarose "low melting". Após a recuperação destes 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. e desfosforilados 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 LB contendo ampicilina (100 mg. mL⁻¹) e crescidas durante a noite a 37°C. Os clones recombinantes produzidos foram, então, transferidos para placas do tipo ELISA de 96 poços, contendo meio líquido "Terrific Broth" suplementado com ampicilina (100 mg. mL⁻¹) e glicerol a 8% e armazenados a -70°C.

- Seqüenciamento dos clones

As colônias individuais das bibliotecas obtidas foram inoculadas em meio "Terrific Grow" acrescido de ampicilina (100 mg. mL⁻¹) e foram crescidas com agitação de 300 rpm, por 16 horas, a 37°C. O DNA foi extraído pelo método usual de rompimento alcalino (Sambrook et al., 1989), com uma modificação no final do procedimento, que é o da passagem do sobrenadante por filtros múltiplos (MultiScreen, Millipore) antes da precipitação do DNA. O DNA purificado foi ressuspenso em água e verificado em gel de agarose a 0,8%, conforme descrito por Sambrook et al. (1989). O DNA foi precipitado, procedendo-se ao seqüenciamento utilizando o "kit" "DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACE™)" (Amersham Pharmacia Biotech). As reações de PCR foram realizadas com os "primers" "Universal" e "Reverso" (Invitrogen), para se conseguir a

amplificação dos genes. Os produtos da reação foram analisados em um seqüenciador automático (MegaBace1000, Amersham), pelo método dos terminadores fluorescentes. As seqüências obtidas foram enviadas para a "homepage" "<http://www.nbf.lncc.br>" e submetidas a um programa de alinhamento de seqüências e construção de possíveis "contigs" (Phred, Phrap e Consed), e as seqüências "consensus" resultantes desses alinhamentos foram posteriormente analisadas para verificar alinhamentos significativos (BLAST nucleotide-nucleotide) com seqüências de DNA de outras bactérias depositadas em banco de dados disponível no GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Resultados e Discussão

Foram feitas oito bibliotecas e foram realizadas 4.789 leituras, 94% delas com ótima qualidade, possuindo menos de 10% de vetores, confirmando a validade das bibliotecas. Ao todo, já foram lidas 52 placas, provenientes de oito bibliotecas, que resultaram em 5.074.975 pares de bases (pb), 2.221.754 pb das quais com qualidade igual ou superior a 20 (Quadro 1). Estimando-se o genoma em 7.000.000 de pb, essas bases de boa qualidade seriam suficientes para cobrir cerca de 32% do genoma. Contudo, pela natureza da biblioteca "shotgun", em que vários fragmentos correspondem a seqüências idênticas, a cobertura obtida, até o presente momento, é de 13,69% (Quadro 2).

Quadro 1. Total de bases obtidas no seqüenciamento do genoma da estirpe PRF 81 de *R. tropici*

Número de bases depositadas (pb) (excluindo vetores, incluindo bases de baixa qualidade)	5.074.975 (100%)
Número de bases com qualidade ≥ 20 (pb)	2.221.754 (42.22%)
Número de bases com qualidade ≥ 30 (pb)	1.795.154 (34.12%)
Número de vetores (pb)	186.815 (3.55%)
Comprimento médio (bp)	1059,71
Comprimento médio (qualidade ≥ 20) (pb)	463,93

Quadro 2. Parâmetros no seqüenciamento da estirpe PRF 81 de <i>R. tropici</i>	
Parâmetro	Situação em 05/2005
Número de “singlets” isolados de phrap	2.053 (42,87% do no. total de leituras)
Número de “phraps” não vetores isolados nos “singlets”	1.175 (57,23% dos “singlets”)
Número de “singletons” isolados	1.239
Número de “contigs” phrap	868
Tamanho médio dos “contigs”	1104,27
Número médio de leituras em um “contig”	2,34
Número total de “contigs”	2.043
Cobertura por “contigs” phrap (pb)	890.686
Cobertura por “singletons” (pb)	67.822
Qualidade media das bases nos “contigs” phrap	22,30
Cobertura do genoma (estimado em 7.000.000 pb), considerando-se a soma dos “contigs” (pb)	958.508
Cobertura do genoma	13,69%

Os genes putativos estão sendo identificados com o uso de ferramentas da bioinformática, de predição de genes. Pelo uso do BLASTX, já foi possível identificar mais de 1.500 genes putativos, podendo-se citar, como exemplo, aqueles que codificam a proteína SMb20348, de *S. meliloti*, adesinas, proteína blr4512 de *B. japonicum*, mlI2848 e mlr8056 de *M. loti*, Y4ql de *Rhizobium* sp. NGR234, NifA, NodA, NodQ, NodU, NodS, proteína regulatória P-II, proteína “heat shock” ClpX, entre outros.

Considerações Finais

O panorama genômico foi uma estratégia excelente para a cobertura parcial do genoma da estirpe de *Rhizobium tropici* PRF 81 (=SEMIA 4080), utilizada em inoculantes comerciais para a cultura do feijoeiro.

Agradecimentos

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

Referências

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Análise conjuntural de 2002**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 18 fev. 2004.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia strains. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.32, p.1515-1528, 2000.

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.

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

VIPREY, V.; ROSENTHAL, A.; BROUGHTON, W.K.; PERRET, X. Genetic snapshots of the *Rhizobium* species NGR234 genome. **Genome Biology**, v.1, p.1-17, 2000.