

Panorama genômico da estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15, recomendada para o uso em inoculantes comerciais para a cultura da soja

Leandro Pereira Godoy¹; Ligia Maria de Oliveira Chueire²; Fernando Gomes Barcellos³; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos⁴; Luiz de Paula Gonzaga⁴; Marisa Fabiana Nicolás⁴; Mariangela Hungria². ¹Bolsista de Mestrado da Embrapa Soja; ²Embrapa Soja; ³Bolsista de pós-doutorado do CNPq; ⁴Laboratório Nacional de Computação Científica.

Introdução

A cultura da soja se beneficia do processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN), dispensando o uso de N de fertilizantes nitrogenados. Atualmente, quatro estirpes de *Bradyrhizobium* são recomendadas para uso nos inoculantes comerciais, duas pertencentes à espécie *B. elkanii*, a SEMIA 587 (recomendada no período de 1968 a 1975 e, novamente, desde 1979) e a SEMIA 5019 (=29w), recomendada desde 1979 e duas estirpes de *B. japonicum*, selecionadas pela Embrapa Cerrados, a CPAC 15 e a CPAC 7, que vêm sendo utilizadas desde 1992. Essas quatro estirpes são capazes de fornecer N para as cultivares de soja mais produtivas recomendadas atualmente, permitindo a obtenção de rendimentos superiores a 4.000 kg/ha (Hungria et al., 2005).

A estirpe CPAC 15 (= SEMIA 5079, =566a, =DF 24) pertence ao mesmo sorogrupo da SEMIA 566. Em relação ao histórico da SEMIA 566, muitos inoculantes americanos empregados na década de 1960 não se mostraram eficientes e, então, foi realizado o isolamento da estirpe adaptada SEMIA 566 (= BR 40) (SEMIA, Seção de Microbiologia Agrícola), que pode ser considerada como uma das primeiras estirpes brasileiras. A SEMIA 566 foi isolada em 1966, de um nódulo da cultivar Hardee, em vaso de Leonard que havia recebido inoculante americano distribuído pela firma Dixie Inoc, provavelmente um inoculante da Nitragin (Milwaukee, E.U.A.),

quando se buscava superar problemas de nodulação a campo com essa cultivar. A CPAC 15 é uma variante natural da CPAC 15, obtida a partir do reisolamento em solos do DF, de estirpes vários anos após a sua última inoculação, quando se buscava isolados adaptados com elevada capacidade de FBN e com alta competitividade (Hungria et al., 2005).

A estirpe SEMIA 566, bem como sua variante CPAC 15 são, sem dúvida, as mais competitivas estabelecidas em solos brasileiros. Essa estirpe pertencente ao mesmo sorogrupo da USDA 123 (=311b123, =TAL 376, =ACCC15036), que foi isolada em 1960 de um nódulo de soja em Iowa, nos E.U.A., sendo considerada indígena naquele país. As estirpes relacionadas sorologicamente ao sorogrupo USDA 123 sorogrupo têm sido consideradas como as mais competitivas da região do meio-oeste dos E.U.A., ocupando, caracteristicamente, de 60% a 80% dos nódulos formados, sendo muito difícil introduzir novas estirpes em solos com estirpes desse sorogrupo (Hungria et al., 2005).

No Brasil, há relatos de que, nos primeiros dois anos, a SEMIA 566 e a CPAC 15 apresentam baixa competência saprofítica, contudo, logo depois se estabelecem fortemente. Relatos semelhantes foram feitos para a USDA 123 nos E.U.A., sugerindo que a estirpe deva residir no solo por um determinado período antes de dominar os nódulos. Um exemplo dessa capacidade foi, recentemente, mostrado por Mendes et al. (2004), em um ensaio conduzido por sete anos na Região dos Cerrados. No quarto e sexto anos desse experimento, como conseqüência da dispersão, estirpes do sorogrupo SEMIA 566 foram encontradas em todas as parcelas, mesmo naquelas que haviam sido inoculadas com outras estirpes, onde chegou a ocupar mais de 50% dos nódulos.

A importância de determinação dos genes dessa estirpe com alta competitividade e capacidade elevada de FBN reside em que, com o lançamento de cultivares de soja mais produtivas, o uso de novas práticas agrícolas e o cultivo em solos que já receberam inoculantes anteriormente, existe a necessidade de selecionar estirpes mais eficientes e competitivas, bem como de conhecer melhor o genoma das estirpes estabelecidas nos solos brasileiros, visando prever o seu comportamento e as respostas à inoculação.

Objetivo

Realizar a cobertura de 10% a 15% do genoma da estirpe CPAC 15 de *Bradyrhizobium japonicum*, procurando genes relacionados à capacidade saprofítica, competitividade e eficiência do processo de fixação biológica do nitrogênio.

Material e Métodos

Construção de biblioteca genômica de *Bradyrhizobium japonicum* CPAC15

- Extração de DNA genômico

Até o presente momento, foi feita uma biblioteca da CPAC 15. Os "pellets" foram obtidos de células da CPAC 15, crescidas em meio de cultura contendo extrato-de-levedura e manitol a 28 °C, por sete dias e, então, centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min. O DNA genômico das bactérias 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 3 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 3 a 5 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 µg/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) foram 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 foram crescidas com agitação de 150 rpm, a 37 °C, "overnight". As placas de crescimento de cultura foram utilizadas para estoque em glicerol (80%), sendo então reinoculadas em blocos de crescimento, seguindo o mesmo procedimento anteriormente descrito. Após o crescimento, foram obtidos "pellets" por centrifugação a 4.000 rpm por 8 minutos. O DNA foi, então, extraído pelo método de rompimento alcalino. Após o rompimento da parede celular das bactérias, os restos de parede celular, polissacarídeos e proteínas remanescentes foram seletivamente precipitados com KOAc 3M (acetato de potássio estocado a 4 °C, pH 4,7-4,9). O sobrenadante foi filtrado por filtros múltiplos (MultiScreen, Millipore) e o DNA obtido através da filtração é purificado e ressuspendido em água, verificando a concentração em gel de agarose 1%.

O DNA precipitado foi seqüenciado 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", para se conseguir a amplificação dos genes. Os produtos da reação foram 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

O projeto iniciou em janeiro de 2005 e uma primeira biblioteca foi obtida e validada. Foi construída uma “homepage” para o projeto (www.bnf.Incc.br) e os resultados obtidos até o presente momento constam dos Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Leituras do genoma de *B. japonicum* CPAC 15.

| | |
|--|-----|
| Número total de leituras | 625 |
| Número total de leituras sem vetores (<= 10% vector) | 563 |
| Número de leituras com 10-80% de bases de vetores | 46 |
| Número de leituras com mais de 80% de bases de vetores | 16 |

Tabela 2. Bases obtidas no genoma de *B. japonicum* CPAC 15.

| | |
|---|--|
| Número de bases depositadas (pb) (excluindo os vetores, incluindo bases de baixa qualidade) | 627.090 (100%) (? 0,07% do genoma, estimado em 9 milhões de pb) |
| Número de bases com qualidade elevada >= 20 (pb) | 309.709 (46,70%) |
| Número de bases com qualidade >=30 (pb) | 243.682 (36,75%) |
| Número de bases com vetores (pb) | 36.057 (5,44%) |
| Comprimento médio (pb) | 1003,34 |
| Média de comprimento (qualidade >=20) (pb) | 495,53 |
| Cobertura do genoma | 151.083 (? 1,67%) |

Considerações Finais

A estratégia de construção e validação das bibliotecas foi confirmada e deverá permitir a cobertura parcial do genoma da estirpe CPAC 15 de *B. japonicum*.

Agradecimentos

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

Referências

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. (no prelo).

MENDES, I.C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Establishment of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains in a Brazilian Cerrado oxisol. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.40, p.28-35, 2004.