

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

Leandro Pereira Godoy^{1,2}; Lígia Maria de Oliveira Chueire¹; Fernando Gomes Barcellos^{1,2}; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos³; Luiz de Paula Gonzaga³; Marisa Fabiana Nicolás³; Rangel C. Souza³; Mariangela Hungria¹. ¹Laboratório de Biotecnologia dos solos, Embrapa Soja, godoylp@cnpso.embrapa.br; ²Universidade Estadual de Londrina; ³Laboratório Nacional de Computação Científica. Agência financiadora: CNPq.

Introdução

A cultura da soja se beneficia do processo de fixação biológica do N₂ (FBN), dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados. Atualmente, quatro estirpes de *Bradyrhizobium* são recomendadas para a formulação de inoculantes comerciais no Brasil, duas pertencentes à espécie *B. elkanii*, a SEMIA 587 (recomendada no período de 1968 a 1975 e após 1979) e a SEMIA 5019 (=29W), recomendada desde 1979 e duas estirpes de *B. japonicum* selecionadas pela Embrapa Cerrados, a SEMIA 5079 (=CPAC 15) e a SEMIA 5080 (=CPAC 7), que vêm sendo recomendadas desde 1992. (Hungria et al., 2006). A estirpe SEMIA 5079 pertence ao mesmo sorogrupo da SEMIA 566 e, no Brasil, essas estirpes apresentam baixa competência saprofítica, contudo, logo depois se estabelecem no solo fortemente (Hungria et al., 2006).

A importância de determinação dos genes da estirpe SEMIA 5079, de alta competitividade e eficiência de fixação do N₂ reside em que, com o lançamento de cultivares de soja mais produtivas, uso de novas práticas agrícolas e o cultivo em solos inoculados anteriormente, torna-se necessário selecionar estirpes mais eficientes e competitivas, bem como isso irá facilitar a identificação das estirpes estabelecidas nos solos brasileiros, para futuros estudos em FBN.

Realizar o seqüenciamento completo de um genoma de bactéria, porém, é um processo caro e demorado, que está muito além da capacidade da maioria dos laboratórios. Uma estratégia alternativa seria a de seqüenciamento parcial de genomas. Está demonstrado, por exemplo, que informações importantes e representativas da estrutura e do conteúdo do genoma de *Sinorhizobium fredii* NGR234 puderam ser obtidas a partir do seqüenciamento parcial e ao acaso de bibliotecas de DNA do tipo "shotgun" (Viprey et al., 2000).

Para o desenvolvimento deste trabalho, o objetivo foi de realizar a cobertura de 10% a 15% do genoma da estirpe SEMIA 5079, procurando genes relacionados à capacidade saprofítica, à competitividade e à eficiência do processo de fixação biológica do N₂.

Material e Métodos

A partir dos péletes obtidos de células da estirpe SEMIA 5079, crescida em meio de cultura Luria-Bertani (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 usual descrito por Sambrook et al. (1989).

O preparo da biblioteca "shotgun", conforme descrito por Fleishmann et al. (1995), envolveu a purificação do DNA e fragmentação ao acaso, por meio mecânico (nebulização). O DNA misturado com glicerol a 50% e NaOAc 3M foi nebulizado por 30 segundos a uma pressão de 2 kgf cm⁻², a fim de obter fragmentos de 500 pares de bases (pb) a 3 kb. A fragmentação foi confirmada em gel de agarose a 1%. A seguir, as extremidades foram reparadas e fosforiladas pelo fragmento enzimático Klenow da DNA polimerase de *Escherichia coli*. Os fragmentos foram separados em gel de agarose "low melting" (g.a.). Após a 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 (Sambrook et al., 1989) contendo ampicilina (100 µg.mL⁻¹), IPTG e X-gal e as bactérias foram crescidas durante a noite a 37°C.

No processo de seqüenciamento, colônias brancas individuais (clones recombinantes) foram inoculadas em placas de crescimento de cultura com 96 poços contendo meio "Terrific Grow - TB" (Invitrogen™). 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. Após o crescimento, foram obtidos péletes por centrifugação a 4.000 rpm, por 8 min. 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 últiplos (MultiScreen, Millipore) para obtenção do DNA que através da filtragem e purificação, foi ressuspensão em água, verificando a concentração em gel de agarose a 1%. O DNA precipitado foi seqüenciado utilizando o "kit" "DYEnamic™ ET dye terminator". As reações de PCR foram realizadas com os "primers" "Universal" e "Reverso", para a amplificação dos genes. Os produtos da reação foram analisados em um seqüenciador automático (MegaBace1000, Amersham), pelo método dos terminadores fluorescentes.

As leituras obtidas foram submetidas à análise de bioinformática, realizada no LNCC, com o "software" para SABIÁ (System of Automated Bacterial Integrated Annotation), que integra vários programas de domínio público para a montagem e a anotação de genomas (Almeida et al., 2004).

Resultados e Discussão

Foi validada uma biblioteca, totalizando 2.198 leituras, 88% com boa qualidade, possuindo menos de 10% de vetores. Foram lidas 24 placas, que resultaram em 2.470.301 pares de bases (pb), 1.036.812, as quais com qualidade igual ou superior a 20 (Tabela 1). Estimando o genoma em 9.000.000 de pb, essas bases de boa qualidade seriam suficientes para cobrir cerca de 11,5% 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 6,63% (Tabela 1).

Tabela 1. Leituras e cobertura obtidas no genoma de *B. japonicum* SEMIA 5079 (CPAC 15).

Parâmetro	Situação
Número de bases depositadas (bp) (sem vetor)	2.470.301 (100%)
Número de bases com qualidade ≥ 20 (bp)	1.036.812 (39,43%)
Número de bases com qualidade ≥ 30 (bp)	744.334 (28,31%)
Número de bases de vetor (bp)	158.931 (6,04%)
Média do tamanho das leituras (bp)	1123,89
Número total de leituras	2.198
Número de leituras de bases sem vetor ($\leq 10\%$ vetor)	1.939
Número de leituras de 10-80% de bases de vetor	211
Número de leituras com mais que 80% de bases com vetor	48
Tamanho estimado do Genoma (bp)	9.000.000
Cobertura do Genoma	597.517 (6,63% do tamanho estimado do genoma)

A busca de genes putativos com ferramentas da bioinformática já resultou em 560 “contigs”, definindo, cada um, no mínimo uma ORF (“open reading frame”) ou “CDS” (coding DNA sequence). Comparando com o genoma já seqüenciado da estirpe USDA 110 de *B. japonicum*, em que foram encontradas 8.317 CDSs (Kaneko et al., 2002), o número já detectado nessa etapa inicial do panorama genômico é equivalente a, no mínimo, 6,7% dos genes putativos da SEMIA 5079. Já foram identificados, nesta estirpe, genes putativos que codificam enzimas do metabolismo do N, como a glutamato sintetase e a urease, do metabolismo dos ácidos graxos, do metabolismo do Fe, como a bacterioferretina e receptores de Fe, que podem estar envolvidos, tanto com a capacidade competitiva, através da produção de sideróforos, como com a absorção do Fe, genes condicionando a síntese de flagelos, entre outros. Também foram identificados genes de nodulação (*nodI*, *nodN*) e fixação de N₂ (*fixG*, *fixK2*, *fixJ*, *fixL*, *fixN*, *fixO*, *fixP*, *fixQ*).

Conclusão

A estratégia alternativa de seqüenciamento parcial de genomas por "shotgun" mostra-se eficiente para a prospecção de genes de interesse, relacionados à fixação do N₂, à capacidade saprofítica e à competitividade da estirpe SEMIA 5079.

Referências

- ALMEIDA, L. G.; PAIXÃO, R.; SOUZA, R. C.; COSTA, G. C.; BARRIENTOS, J. A.; SANTOS, M. T.; ALMEIDA, D. F.; VASCONCELOS, A. T. R. A system for automated bacterial (genome) integrated annotation – SABIA. *Bioinformatics*, v. 20, p. 2832-2833, 2004.
- FLEISCHMANN, R. D.; ADAMS, M. D.; WHITE, O.; CLAYTON, R. A.; KIRKNESS, E. F.; KERLAVAGE, A. R.; BULT, C. J.; TOMP, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; MERRICK, J. M. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, Washington, v. 269, p. 496-512, 1995.
- 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, 2006. p. 43-93.
- KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; MINAMISAWA, K.; UCHIUMI, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; IRIGUCHI, M.; KAWASHIMA, K.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; SHIMPO, S.; TSURUOKA, H.; WADA, T.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete Genomic Sequence of Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research*, Kisarazu, v. 9, p. 189-197, 2002.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: 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. (<<http://genomebiology.com/2000/1/6/research/0014.1>>).