



# FERTBIO 2012

A responsabilidade socioambiental da pesquisa agrícola  
17 a 21 de Setembro - Centro de Convenções - Maceió/Alagoas

## Caracterização Genética e Morfofisiológica da “Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja”

**Ligia Maria de Oliveira Chueire<sup>(1)</sup>; Renan Augusto Ribeiro<sup>(2)</sup>; Jakeline Renata Marçon Delamuta<sup>(3)</sup>; Eduara Ferreira<sup>(4)</sup>; Marco Antonio Nogueira<sup>(5)</sup>; Mariangela Hungria<sup>(5)</sup>**

<sup>(1,2)</sup> Assistente: Laboratório de Biotecnologia do Solo; Embrapa Soja, Rodovia Carlos João Strass, CEP 86001-970, Londrina, PR; [ligia@cnpso.embrapa.br](mailto:ligia@cnpso.embrapa.br) e [ribeiro@cnpso.embrapa.br](mailto:ribeiro@cnpso.embrapa.br); <sup>(3)</sup> Doutoranda; Departamento de Microbiologia/CCB; Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Londrina, PR; [jake\\_renata@hotmail.com](mailto:jake_renata@hotmail.com); <sup>(4)</sup> Analista: Laboratório de Biotecnologia do Solo; Embrapa Soja; [eduarda@cnpso.embrapa.br](mailto:eduarda@cnpso.embrapa.br); <sup>(5) (7)</sup> Pesquisadores: Embrapa Soja; [nogueira@cnpso.embrapa.br](mailto:nogueira@cnpso.embrapa.br); [hungria@cnpso.embrapa.br](mailto:hungria@cnpso.embrapa.br)

**RESUMO** - A degradação do meio ambiente gera uma grande preocupação com a sustentabilidade do planeta para os anos futuros. A principal maneira de reverter essa situação é através do aproveitamento da biodiversidade em prol de sistemas de baixa emissão de carbono, biorremediação, produção de medicamentos, vacinas entre outros. Dentre os vários ecossistemas, o solo apresenta importante destaque, pois apesar da alta diversidade procariótica que possui, ainda precisa ser mais explorado para que essas informações sejam utilizadas a favor do aumento de produtividade da agricultura. A criação e a manutenção de coleções de culturas são de extrema importância para o estudo nas áreas biológicas e agrônomicas. Nesse sentido, o Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja mantém uma coleção de culturas seguindo rigorosos padrões de qualidade. O objetivo desse trabalho foi o de caracterizar morfofisiologicamente e geneticamente as bactérias dessa coleção. As características morfofisiológicas avaliadas foram: tamanho, forma e elevação da colônia, produção e consistência do muco e alteração de pH em meio YMA, enquanto que as análises genéticas consistiram do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S e a determinação do perfil genético por BOX-PCR. Das 4.000 estirpes da coleção, até o presente momento 1.681 foram caracterizadas morfofisiologicamente, 314 foram caracterizadas geneticamente pelo gene ribossomal 16S enquanto 709 através do BOX-PCR. A geração e preservação de dados da coleção de culturas são de extrema importância para estudos futuros nas diversas áreas de conhecimento.

**Palavras-chave:** Bactérias, Fixação biológica do nitrogênio, Sistema de qualidade

**INTRODUÇÃO** - Devido à grande preocupação com a degradação crescente dos ecossistemas, algumas medidas têm sido tomadas com relação à sustentabilidade e à biodiversidade do planeta, os quais têm apresentado um papel fundamental em auxiliar nos sistemas de baixa emissão de carbono, biorremediação, produção de

medicamentos, vacinas entre outros. O aproveitamento dessa biodiversidade depende principalmente da exploração científica dos ecossistemas, dos quais o solo apresenta importante destaque, pois está intimamente ligado à agricultura, que é essencial ao desenvolvimento do País, bem como para o estabelecimento de políticas de combate à fome. Apesar da alta diversidade procariótica existente no solo, o grande desafio atual consiste em identificar e classificar um número cada vez maior de microrganismos, de modo que se consiga extrair ao máximo o potencial tecnológico dessas bactérias em favor de um incremento no rendimento das culturas e na sustentabilidade dos agroecossistemas. Nesse contexto, a criação e a manutenção de coleções de culturas são de extrema importância, por fornecerem “matéria prima” para estudos em diversas áreas de pesquisa, dentre elas a Taxonomia, Biotecnologia, Microbiologia e Genética, convergindo para o desenvolvimento de novas tecnologias. A partir dessa visão, a “Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas” foi criada em 1991, estando localizada no Laboratório de Biotecnologia do Solo, em Londrina, PR. Desde a sua criação houve uma busca contínua para a implementação de metodologias que pudessem contribuir para uma melhor caracterização genética das estirpes, mas sempre procurando correlacionar os grupos genéticos com as propriedades simbióticas e de promoção de crescimento das plantas. As bactérias da coleção têm sido objeto de diversos estudos de taxonomia, filogenia, bem como de estudos aplicados sobre a fixação de nitrogênio e a promoção de crescimento vegetal, incluindo estudos em parceria com o setor privado. Nos últimos dois anos, esforços têm sido alocados com o objetivo de implementação do sistema de qualidade ISO/TEC 17025 e dos princípios da OCDE (*Organization for Economic Co-Operation and Development*) à coleção, visando garantir a qualidade e pureza das estirpes mantidas e distribuídas para instituições de pesquisa, para indústrias de inoculantes, ou para projetos em parceria com a iniciativa privada. Com isso, o objetivo desse trabalho foi

o de caracterizar morfofisiologicamente e geneticamente as bactérias da "Coleção de Culturas de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja".

**MATERIAL E MÉTODOS - Material Biológico** - A coleção conta hoje com cerca de 4.000 estirpes. As estirpes são mantidas: 1) criopreservadas (-80°C) em meio líquido adequado para cada espécie com a adição de 30% de glicerol; 2) criopreservadas (-150°C) no mesmo meio utilizado em (1); 3) liofilizadas; e d) a 4°C, em meio sólido adequado para cada espécie para uso corrente. A viabilidade das estirpes é verificada com base em um percentual das estirpes (2%), verificadas a cada ano para o crescimento e propriedades morfo-fisiológicas das colônias. Para as estirpes de maior importância agrônoma, como as indicadas para produção de inoculantes, é realizada a verificação do crescimento de plantas inoculadas em condições de casa de vegetação a cada dois anos, avaliando-se assim a estabilidade genética e fisiológica das estirpes.

**Avaliação morfofisiológica** - A avaliação morfofisiológica das bactérias foi realizada observando o tamanho, forma e elevação da colônia, produção e consistência do muco e alteração de pH em meio YMA.

**Extração de DNA e PCR** - A extração de DNA foi realizada de acordo com Kaschuk et al (2006). Para as análises genéticas foi utilizado o gene ribossomal 16S (Zeigler et al., 2003) e/ou o BOX-PCR (Pinto et al., 2007). As amplificações foram conduzidas de acordo com as especificações de cada autor. O resultado da amplificação foi verificado pela visualização dos fragmentos, em luz UV, em gel de agarose corado com brometo de etídeo.

**Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento** - Os produtos de PCR do gene ribossomal 16S foram purificados com o kit "PureLink" (Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento pelo método de Sanger, com o uso do "kit" "DYEnamic™ ET dye terminator cycle sequencing (MegaBACE™). As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio dos programas phredPhrap versão 0,990722 (1993-2000) e examinadas manualmente.

**Análise do BOX-PCR** - As análises do perfil genético por BOX-PCR foram realizadas através do software Bionumerics versão 4.6 (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica), utilizando coeficiente de similaridade Jaccard e agrupamento com o algoritmo UPGMA.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO** - Das 4.000 estirpes da coleção, 1.681 foram caracterizadas morfofisiologicamente, 314 foram caracterizadas geneticamente pelo gene ribossomal 16S e 709 estão caracterizadas geneticamente através do BOX-PCR, e esses dados estão em constante evolução devido à geração de dados mensalmente. Na figura 1 podem ser visualizadas as diferentes colorações pela reação ácida (amarela), neutra (verde) ou alcalina (azul) em meio de cultura YMB, um exemplo de parâmetro de caracterização morfofisiológica. Dentre 1292 bactérias

avaliadas, quanto a esse parâmetro, 756 (58%) apresentaram reação alcalina, 470 (36%) reação ácida e 66 (6%) reação neutra. Todas as sequências do gene ribossomal 16S geradas, foram depositadas no banco de dados do NCBI e seus números de acesso estão descritos no site da coleção (ver abaixo). As estirpes dessa coleção já foram utilizadas em inúmeros trabalhos publicados em diversas revistas de alto impacto na comunidade científica, bem como em teses de mestrado e doutorado em várias Universidades pelo Brasil e no exterior. Alguns exemplos: Kaschuk et al., 2006, Ribeiro et al, 2009, Menna et al, 2006 e 2009, Pinto et al, 2007 e 2009, entre outros, incluindo trabalho relativo à descrição de uma nova espécie de rizóbio (Ribeiro et al., 2012). A maior ênfase atual na caracterização genética das estirpes tem consistido de estudos com base no MLSA (*Multi-Locus Sequencing Analysis*), em que vários genes housekeeping são sequenciados, concatenados e utilizados para definir a posição taxonômica dos isolados (Fig. 2).

Informações sobre a coleção de culturas e os resultados de caracterização, estão disponíveis no site do BMRC (<http://www.bmrc.incc.br>) e na Plataforma Nacional de Recursos Genéticos da Embrapa (<http://mwpin004.cenargen.embrapa.br/jrgnweb/jmcohtml/jmcohome01.jsp>).

**CONCLUSÕES** – A qualidade na geração e preservação dos dados da coleção de culturas é de extrema importância para o desenvolvimento de novas tecnologias e novos trabalhos desenvolvidos nas diversas áreas de interesse biológico e agrônomo.

## REFERÊNCIAS

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.32, p.210-220, 2006.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.315-332, 2006.

MENNA, P.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M.; Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.2934-2950, 2009.

PINTO, F. G. S.; CHUEIRE, L. M. O.; VASCONCELOS, A. T. R.; NICOLÁS, M. F. ALMEIDA, L. G. P.; SOUZA, R. C.; MENNA, P.; BARCELLOS, F. G.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Novel genes related to nodulation, secretion system, and surface structures revealed by a genome draft of *Rhizobium tropici* strain PRF 81. **Functional & Integrative Genomics**, v.9, p.263-270, 2009.

PINTO, F. G. S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F. M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici*

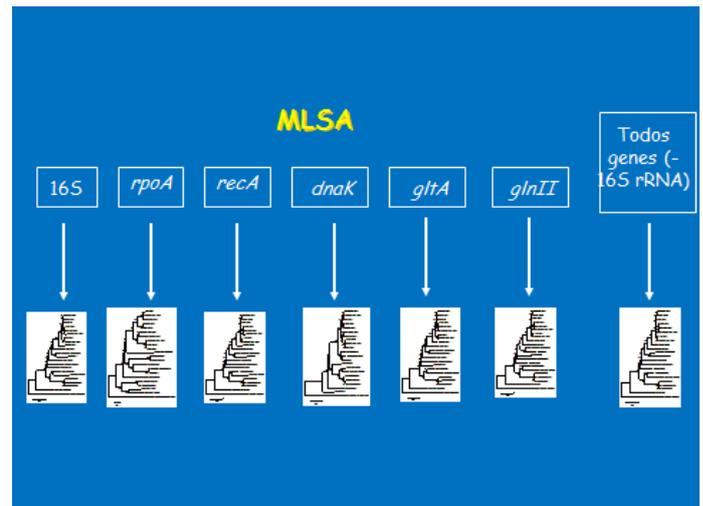
strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p.1851-1864, 2007.

RIBEIRO, R. A.; BARCELLOS, F. G.; THOMPSON, F. L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v.160, p.297-306, 2009.

RIBEIRO, R. A.; ROGEL, M. A.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; BARCELLOS, F. G.; MARTÍNEZ, J.; THOMPSON, F. L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62. p. 1179-1184, 2012.

ZEIGLER, D.R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53: 1893-1900. 2003.

Financiamento parcial do MCT/CNPq/MAPA/SDA (Processo 577933/2008-6), CNPq Repensa



**FIGURA 2.** Esquema mostrando o princípio da análise genética dos isolados por MLSA (*Multi-Locus Sequencing Analysis*).



**FIGURA 1.** Reação ao crescimento de rizóbios em meio YMB, alcalina (azul), neutral (verde) ou ácida (amarelo).