

# Sequenciamento genômico e bioprospecção de genes de *Rhizobium tropici* estirpe PRF 81 (SEMIA 4080) utilizada em inoculantes comerciais para a cultura do feijoeiro

---

Fabiana Gisele da Silva Pinto<sup>1,2,3,4</sup>; Lígia Maria de Oliveira Chueire<sup>1,5</sup>; Ana Tereza Ribeiro Vasconcelos<sup>6,7</sup>; Marisa Fabiana Nicolás<sup>6</sup>; Luiz Gonzaga<sup>6</sup>; Rangel Celso Souza<sup>6</sup>; Mariangela Hungria<sup>1,2,7</sup>. <sup>1</sup>Embrapa Soja, Laboratório de Biotecnologia do Solo, fabigsp@cnpso.embrapa.br; <sup>2</sup>Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia; <sup>3</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR; <sup>4</sup>Bolsista de doutorado do CNPq; <sup>5</sup>Bolsista de AT do CNPq; <sup>6</sup>Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, RJ; <sup>7</sup>Bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq.

## Introdução

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). O rendimento médio nacional é bastante baixo, devido, a pouca tecnologia empregada na cultura e ao cultivo em solos pobres, especialmente em N. Conseqüentemente, o suprimento adequado de N, pela simbiose com bactérias diazotróficas, representa uma alternativa para aumentar os rendimentos nacionais a um baixo custo, além de evitar a contaminação dos recursos hídricos pelo nitrato e diminuir a emissão de gases de efeito estufa. A eficiência do processo de fixação biológica do nitrogênio pela cultura do feijoeiro tem sido considerada baixa. Tal fato é atribuído a problemas relacionados à nodulação, pela dificuldade de introdução de melhores estirpes e baixa tolerância a estresses ambientais, como temperaturas elevadas e deficiência hídrica. Através de um programa de seleção de estirpes mais eficientes no processo de fixação de N<sub>2</sub> e com boa capacidade saprofítica e competitiva, foi identificada a estirpe PRF 81 de *Rhizobium tropici*, recomendada desde 1998 para a produção de inoculantes comerciais destinados à cultura do feijoeiro (Hungria et al., 2000, 2003). Como o Brasil é, hoje, o país que mais utiliza inoculantes com rizóbios, torna-se importante desenvolver estudos de genéticos com estirpes brasileiras. A relevância desses estudos genéticos é ainda maior

no caso do microssimbionte do feijoeiro, cultura que necessita de impulso tecnológico para incrementar rendimentos a um baixo custo.

Viprey et al., 2000 propuseram uma estratégia de obtenção parcial do genoma, que pode ser denominada de “panorama genômico”, baseada no seqüenciamento de, aproximadamente, 10% a 15% do genoma. Esses autores conseguiram identificar, utilizando essa estratégia, muitos genes importantes da estirpe NGR234, atualmente classificada como *Sinorhizobium fredii*. Essa mesma técnica será utilizada para obter o panorama genômico da estirpe PRF 81 *R. tropici* com o objetivo de detectar genes relacionados as altas capacidades competitiva e saprofítica, e a eficiência de fixação N<sub>2</sub> dessa estirpe.

## Material e Métodos

### Extração do DNA genômico

As células da estirpe PRF 81 foram obtidas após crescimento em meio de cultura LB, centrifugação a 10.000 g por 20 minutos e estocagem a -70°C. O DNA das bactérias foi extraído pelo método usual descrito por Sambrook et al. (1989) e utilizado para a construção das bibliotecas de “shotgun”.

### Construção de bibliotecas “shotgun”

A purificação do DNA genômico foi realizada conforme descrito por Fleishmann et al. (1995) e a fragmentação do DNA ao acaso, por meio mecânico (nebulização). Após a fragmentação, as extremidades serão reparadas e fosforiladas pelo uso do fragmento Klenow da DNA polimerase de *Escherichia coli*. Fragmentos com tamanho entre 1,0 -3,0 kb foram separados em gel de agarose “low melting”. Após a recuperação destes fragmentos a partir do gel de agarose, foi realizada a ligação ao vetor pUC18, digerido com a enzima de restrição *Sma*I, e desfosforilados (BAP), e posterior ligação com T4 DNA ligase. Após a ligação, o material foi utilizado para transformação de células de *E. coli* estirpe Top10, através da técnica de eletroporação. As células foram plaqueadas em meio LB (Sambrook et al., 1989) contendo ampicilina (250 µg. mL<sup>-1</sup>) 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 “Terrif Broth, TB”

(Invitrogen™), suplementado com ampicilina (250 µg. mL<sup>-1</sup>) 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 (250 µg. mL<sup>-1</sup>) e foram crescidas com agitação de 300 rpm, por 16 horas, a 37°C. O DNA foi extraído pelo método usual de rompimento alcalino. O DNA purificado foi ressuspenso em água e verificado em gel de agarose a 0,8%, conforme descrito por Sambrook et al. (1989). Para o seqüenciamento, utilizou-se 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.

### Montagem e bioprospecção automática de genes

As seqüências obtidas foram submetidas e armazenadas no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC). As "ORFs" ("open reading frames"), ou "CDSs" (coding DNA sequences) foram submetidas a uma análise por ferramentas de bioinformática e integradas a um "software" **SABIÁ: System of Automated Bacterial Integrated Annotation**, que integra a montagem e a anotação de genomas (Almeida et al., 2004a,b).

## Resultados

O seqüenciamento dos clones resultou no depósito de 10.046.403 pares de bases (pb), que corresponderiam a 1,44 vezes o genoma, com 43,45% das bases com qualidade  $\geq 20$ , 34,84% de bases com qualidade  $\geq 30$  e somente 3,57% de bases com vetores (dados não apresentados). Inicialmente foi previsto o seqüenciamento de 10% a 15% do genoma da estirpe PRF 81, estimado em sete milhões de pb, mas a cobertura real obtida correspondeu ao dobro do previsto (Tabela 1).

O projeto previa a identificação de um terço dos genes, estimados em 1.500, mas foram identificadas 2.161 CDSs, das quais, 1208 foram validadas, 691

**Tabela 1.** Panorama genômico da estirpe de PRF 81 de *Rhizobium tropici*.

Parâmetro	Situação
Número total de leituras	9.026
Número total de leituras sem vetores (<=10% vetor)	8.431
Nºde bases depositadas (bp) excluindo vetor, incluindo bases de baixa qualidade	10.046.403 (100%) Cobertura = 1,44 vezes
Número de bases com qualidade >=20 (bp)	4.526.803 (43,45%)
Número de bases com qualidade >=30 (bp)	3.629.712 (34,84%)
Número total de "contigs"	2.789
Tamanho médio dos "contigs"	1.303.99
Cobertura por "contigs" phrap (pb)	2.097.134
Número médio de leituras em um "contig"	3,24
Qualidade media das bases nos "contigs" phrap	23,04
Cobertura do genoma (estimado em 7.000.000 pb), considerando-se a soma dos "contigs" (pb)	2.175.048
Cobertura do genoma	31,07%

foram classificadas como hipotéticas conservadas e 262 como hipotéticas. Foram identificados genes putativos, em todas as classes funcionais. O maior número de CDSs validados foi relacionado ao metabolismo de aminoácidos, de carboidratos e do metabolismo secundário. Contudo, 60,4% das CDSs não puderam ser classificadas em categorias KEGG (Figura 1). Também foram identificados genes de nodulação (*nodA*, *nodC*, *nodI*, *nodQ*, *nodS*, *nodT*, *nodU*, *nodG*) e fixação do N<sub>2</sub> (*nifA*, *nifN*, *nifR*, *nifS*, *nifX*, *nifW*, *fixA*, *fixB*, *fixC*, *fixL*).

Obteve-se um elevado número de CDSs relacionadas à biodegradação e xenobióticos, particularmente do benzoato, bem como a presença de CDs relacionadas a quimiotaxia e síntese de flagelos. Essas CDs devem estar relacionadas à adaptabilidade e à capacidade competitiva elevada da estirpe PRF 81. É importante destacar, também, a presença de quatro proteínas de secreção do tipo II (três relacionadas a "pili" e uma a "fimbrae"), seis do tipo III (biossíntese de flagelos) e quatro do tipo IV (proteínas de

## Classificação Categorias KEGG

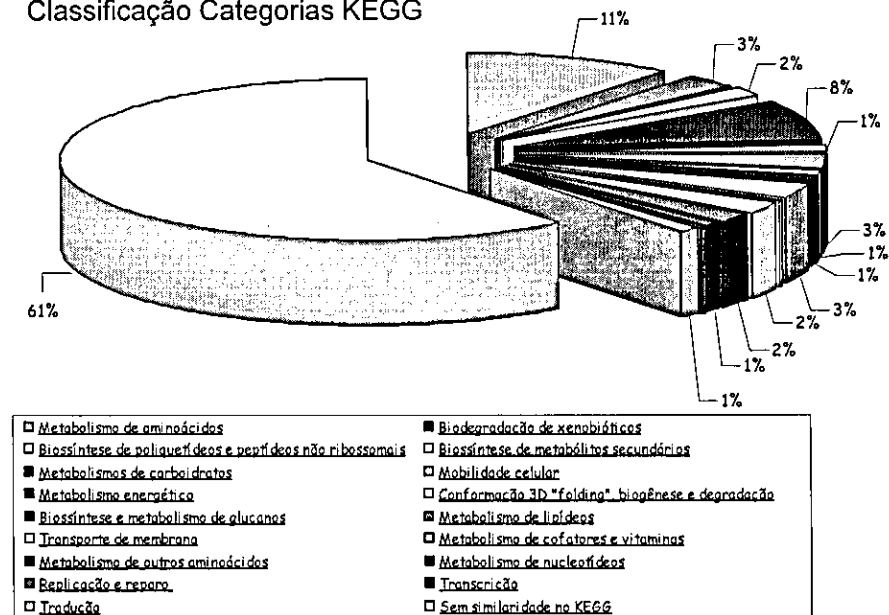


Figura 1. Distribuição percentual das CDSs de *R. tropici* PRF 81, segundo a base de dados KEGG.

transferência de conjugação *traG*—similaridade elevada com *Sinorhizobium meliloti* e *R. etli*; *trb1* – similaridade com NGR 234 e *R. etli*; *trbD*, maior similaridade com *R. etli* e *virB6*, presente em *R. etli* e *S. meliloti*). Essas proteínas de secreção indicam similaridade elevada entre os mecanismos de infecção para a formação de nódulos e patogenicidade.

## Conclusões

A estratégia de obtenção parcial de um genoma mostrou-se viável, permitindo a identificação de genes importantes na estirpe PRF 81 (=SEMIA 4080), de *Rhizobium tropici*, economicamente importante, pois é recomendada para o uso em inoculantes comerciais na a cultura do feijoeiro.

## Agradecimentos

Projeto financiado parcialmente com recursos do CNPq.

## Referências

- ALMEIDA, L. G.; PAIXÃO, R.; SOUZA, R. C.; COSTA, G. C.; ALMEIDA, D. F.; VASCONCELOS, A. T. R. A new set of bioinformatics tools for genome projects. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 26-52, 2004a.
- 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, 2004b.
- 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.; 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**, 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**, v. 39, n. 1, p. 88-93, 2003.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2<sup>nd</sup> 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.