

USO DE TÉCNICAS MOLECULARES NA CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES RIZÓBIOS

Joselma Pinheiro SANTOS¹; Luiz Antonio de OLIVEIRA²; André Luis WILLERDING³
¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientador COTI/INPA; ³Co-orientador LBBM/CBA

1.Introdução

A identificação correta de microrganismos é fundamental para o conhecimento da biodiversidade microbiana do solo e suas relações com os processos ecológicos e agrônômicos. Os métodos convencionais para a identificação de bactérias existentes na rizosfera dependem do isolamento, do cultivo em meios apropriados e da caracterização morfofisiológica e bioquímica. No entanto, a caracterização com base nesses atributos pode resultar, em muitos casos, na identificação errônea de isolados, por ser passível de sofrer influência ambiental. A utilização das metodologias de análises do DNA, principalmente aquelas com base no uso da PCR, e das técnicas de sequenciamento direto do DNA amplificado permitiu o estabelecimento de estratégias de identificação mais precisas dos isolados, baseadas no genótipo, o qual não é influenciado pelo ambiente. O objetivo desse trabalho é caracterizar os isolados de da coleção de Microrganismos do INPA usando técnicas de biologia molecular.

2.Material e Métodos

As estirpes de *Rhizobium* foram obtidos junto ao banco de microrganismos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, setor de Microbiologia do solo. Foram testadas 475 estirpes da coleção do Laboratório de Microbiologia dos Solos. Inicialmente houve a necessidade da reativação das estirpes com inoculação em placa de Petri contendo extrato de levedura-manitol (YM), após o crescimento os inóculos foram passados para meio líquido (LB). Após o crescimento de em meio líquido, foi feita a extração do DNA seguindo o protocolo no descrito em Sambrook *et al.* (1989) para a extração do DNA genômico (com adaptações), posteriormente foi feito a quantificação do DNA em gel de agarose 1% e realizado a PCR, para que amplificação do DNA. Para avaliar as características genotípicas, os géis foram corados com brometo de etídeo (25 mg L⁻¹) por 30 min., e as bandas foram visualizadas em transluminador com lâmpada ultravioleta e fotografado com câmera KODAK Digital Science ID 3.5. Com o auxílio do programa Kodak Digital Science os géis foram analisados, sendo atribuídos valores de zero para ausência e um para presença de bandas e construída uma matriz binária. Paralelamente a isso foi feita a reativação da coleção de *Rhizobium* em nova metodologia de conservação seguindo a metodologia de Araújo *et al.* (2002).

3.Resultados

Foram usadas 475 de estirpes para o estudo, e verificou o crescimento em 224 estirpes e 251 estirpes sem crescimento (Figura1). Após a extração de DNA verificou-se presença e ausência do mesmo.

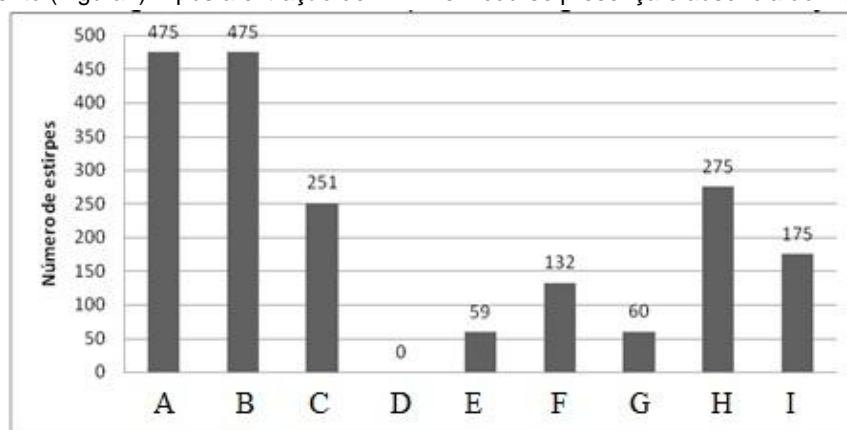


Figura 01- (Resultados obtidos com a coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA no período de agosto de 2011 a março de 2012). Legenda: A-quantidade de estirpes; B- quantidade de estirpes em meio YMA; C- quantidade de estirpes sem crescimento; D- estirpes crescidas em 24 horas; E- estirpes crescidas em 48 horas; F- estirpes crescidas em 72 horas; G- quantidade de estirpes renovadas para coleção; H- estirpes em meio líquido para extração de DNA; I- Estirpes com DNA extraído.

Com os resultados observados no gel de agarose (figura 02) foi feita uma matriz binária onde foi atribuído o valor de zero para ausência e um para presença das bandas, nos quais os que apresentaram resultados positivos no total 175 estirpes, foram feitos clones das mesmas.

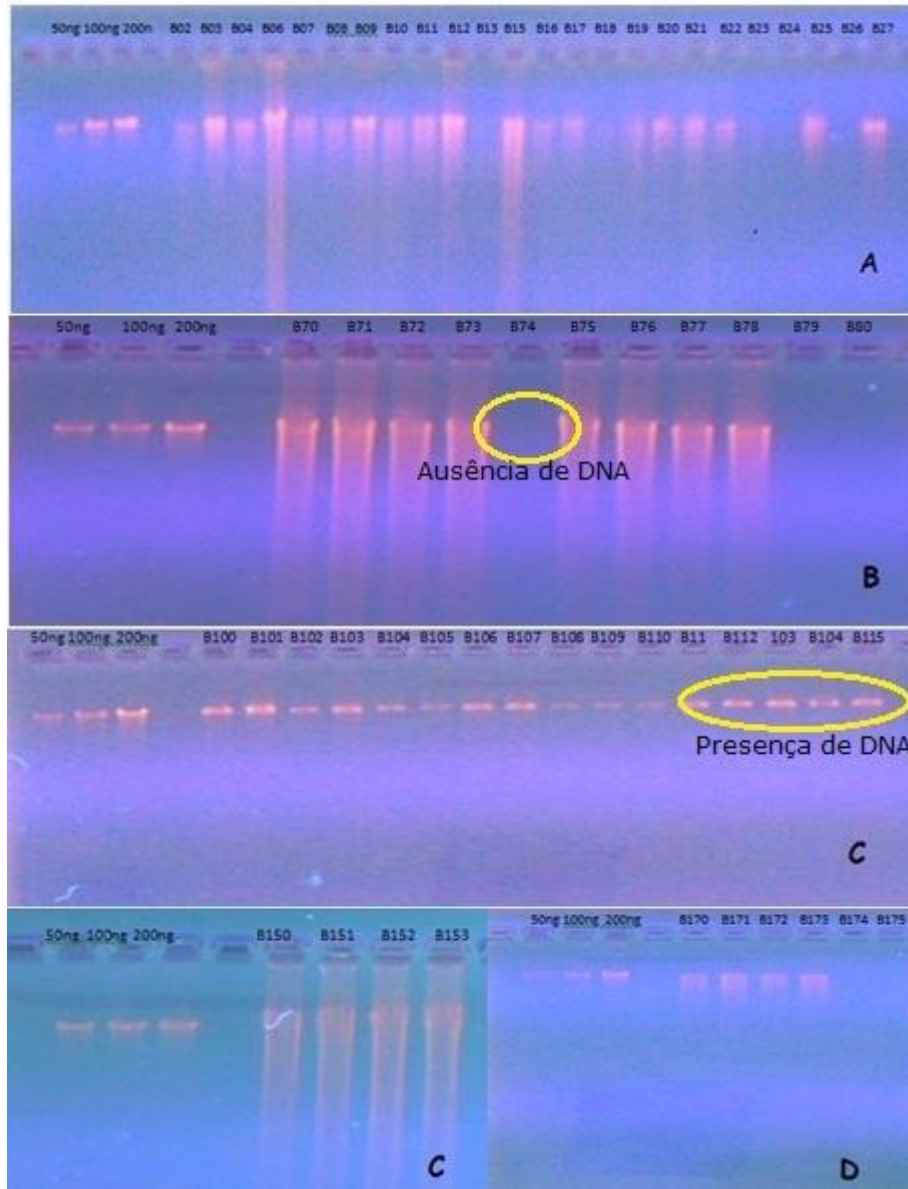


Figura 02: gel de agarose apresentando presença e ausência à amplificação ou não do DNA

RESULTADO DA PARTE MOLECULAR

Gel da extração. Foi extraído o DNA de 175 estirpes de bactérias, porem somente 150 amostras apresentaram presença de DNA e 25 ausência do mesmo.

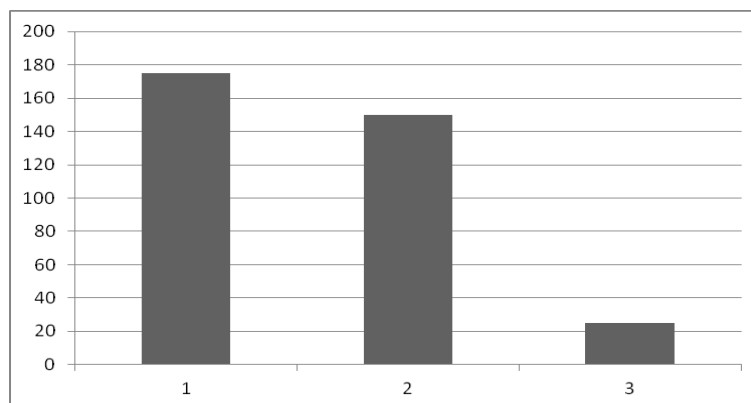


Figura 03: Gel da PCR. Visando à identificação molecular das bactérias, foram amplificadas por PCR as 150 amostras já quantificadas.

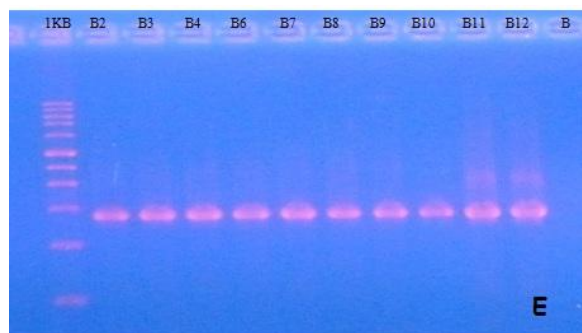


Figura 04: gel da PCR visando à identificação molecular das estirpes sendo Bactérias por meio da amplificação do gene 16S rRNA.

4. Conclusão

1. O número de resultados apresentados se justificam pelo tempo de otimização da metodologia de conservação e protocolo da extração de DNA.
2. Foi evidente que a falta de manutenção, levou a perda de uma quantidade significativa da coleção (ponto C, 251), pois a metodologia de conservação aplicada anteriormente precisava de verificação periódica (repicagem para novos tubos) a cada um ano, máximo três anos, e melhor adequação dos tubos.
3. Foi observado o crescimento inicial das estirpes em 2 a 3 dias, sendo observado o crescimento ótimo no quarto dia (ponto E e F).
4. A quantidade de novos tubos estoques (60 estirpes) foi significativa perante as dificuldades de crescimentos das estirpes adormecidas, umas a mais de quatro anos (ponto G).
5. A nova metodologia a ser empregada para conservação mostra-se eficaz, uma vez que a mesma se “casa” com o ambiente que podemos fornecer para a coleção (local e temperatura), concordando com o método sugerido por Araújo et al (2002).
6. As técnicas moleculares podem fornecer informações necessárias para futuro estudo de caracterização em nível de filogenia e espécie utilizando técnicas de sequenciamento e com posterior análise da sequência no banco de dados BLAST a partir de regiões conservadas em sequências depositadas nos bancos de dados genéticos internacionais do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

5. Referências

- Araujo, w.l. et al.; Manual: isolamento de microrganismo endofíticos. Piracicaba: CALQ 2002.
- Garro, j.; gené, j.; stchigel, a. M. Developments in Fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, DC, v. 12, p. 454-500, 1999.
- Hungria, m.; chueire, I. M. O.; menna, p.; bangel, e. V. Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 12 p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 79).
- Mccartney, h. A.; foster, s. J.; fraaije, b. A.; ward, E. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science*, Sussex, v. 59, p. 129-142, 2003.
- Sambrook, j.; fritsch, e. F.; maniatas, t. *molecular cloning—laboratory manual*. 2.ed. USA: ColdSpring Harbor Laboratory Press, 1989, 1886 p.