

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal

Fotos: Mariangela Hungria



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos

333 *Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia
ISSN 0102-0110*

332 *Embrapa Soja
ISSN 2176-2937*

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal

Mariangela Hungria
Krisle da Silva

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB – Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal: 02372 - Brasília, DF - Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

Home Page: <http://www.cenargen.embrapa.br>

E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *João Batista Teixeira*

Secretário-Executivo: *Thales Lima Rocha*

Membros: *Jonny Everson Scherwinski Pereira*

Lucília Helena Marcelino

Lígia Sardinha Fortes

Márcio Martinelli Sanches

Samuel Rezende Paiva

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

Daniela Aguiar de Souza Kols

Supervisor editorial: Lígia Sardinha Fortes

Revisor de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Lígia Sardinha Fortes

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

Fotos da capa/Montagem: Mariangela Hungria/Rafaela Marcondes Oliveira

1ª edição (online)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Hungria, Mariangela.

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. / Mariangela Hungria e Krisle da Silva. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011.

21 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 333; Documentos / Embrapa Soja, 332).

1. Recursos Genéticos – Micro-organismos. 2. Conservação. 3. Rizóbios. 4. Bactérias
5. Crescimento Vegetal. I. Silva, Krisle da. II. Título. III. Série.

579 - CDD

© Embrapa 2011

Autores

Mariangela Hungria

Ph.D. em Agronomia (Ciências do Solo), Pesquisadora da Embrapa Soja

mariangela.hungria@embrapa.br

Krisle da Silva

Ph.D. em Microbiologia Agrícola, Pesquisadora da Embrapa Roraima

krisle.silva@embrapa.br

Apresentação

Desde o início da década de 1970, há uma crescente conscientização mundial sobre a necessidade de preservação dos recursos genéticos, que são essenciais para o atendimento das demandas de variabilidade genética dos programas de melhoramento, principalmente aqueles voltados para alimentação.

No Brasil, essa necessidade é especialmente importante, uma vez que a maioria dos cultivos que compõem a base alimentar do país é de origem exótica. Observa-se, por exemplo, que cerca de 95% dos acessos de cereais conservados em coleções do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) são de espécies exóticas. Portanto, a manutenção e o enriquecimento contínuo da variabilidade genética dessas coleções são prioritários e estratégicos, considerando, ainda, as atuais restrições internacionais ao intercâmbio de germoplasma.

Na década de 1970, a *Food and Agriculture Organization* (FAO), órgão das Nações Unidas, estimulou o estabelecimento de uma rede mundial de centros para a conservação de recursos genéticos situados em regiões consideradas de alta variabilidade genética. Em 1974, o *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR) criou o *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), hoje transformado no *Biodiversity International*. No mesmo ano, a Embrapa reconheceu a importância estratégica dos recursos genéticos com a criação do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que mais recentemente adotou a assinatura-síntese Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a consolidação do SNPA estabeleceram ambiente propício para a formatação da Rede Nacional de Recursos Genéticos. A partir de então, paulatinamente, coleções de germoplasma foram estruturadas em diferentes Unidades Descentralizadas, predominantemente na área vegetal.

Em 1993, por intermédio de deliberação da Diretoria Executiva, a Embrapa formalizou, como ferramenta de gestão das coleções, o Sistema de Curadorias de Germoplasma e definiu os papéis e as responsabilidades para os diversos atores envolvidos nesse Sistema, tais como: curadores de coleções de germoplasma, chefes de Unidades Descentralizadas que abrigavam as coleções e a Supervisão de Curadorias. Os projetos em rede foram definidos como figuras programática e operacional, possibilitando o custeio de atividades de coleta, intercâmbio, quarentena, caracterização, avaliação, documentação, conservação e utilização de germoplasma, além da manutenção das coleções. De 1993 até a presente data, muitas coleções de germoplasma foram estabelecidas e, atualmente, o Sistema de Curadorias da Embrapa reúne 209 coleções, incluindo Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal (BAGs), Núcleos de Conservação Animal, Coleções Biológicas de Micro-organismos e Coleções de Referência, as quais abrangem espécies nativas e exóticas. Nas

demais Instituições do SNPA, estima-se que são mantidos pelo menos outros 243 Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal.

Como duplicata de segurança dos acessos mantidos nos BAGs, a Embrapa Cenargen abriga a Coleção de Base (COLBASE) de germoplasma vegetal, projetada para conservar sementes à temperatura de -20°C por longo período de tempo.

Como consequência desses 30 anos de atividades relacionadas ao manejo dos recursos genéticos, os curadores adquiriram uma bagagem de conhecimentos práticos na área, conhecimentos estes que foram, em parte, sistematizados e disponibilizados para a sociedade por intermédio da presente obra: "Manual de Curadores de Germoplasma".

Esperamos que esta publicação em série torne-se um guia para curadores de germoplasma no Brasil e no exterior, e que contribua efetivamente para o aprimoramento da gestão dos recursos genéticos deste país.

Mauro Carneiro

Chefe Geral

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Introdução	08
Coleta de amostras	08
Isolamento	09
Identificação e caracterização	09
Caracterização fenotípica	09
Caracterização genotípica	13
Análise do gene ribossomal 16S e outros genes <i>housekeeping</i>	13
<i>Fingerprinting</i> de bactérias	14
Preservação	16
Valoração das bactérias	16
Armazenamento dos dados da coleção	17
Transferência de material genético	18
Segurança e controle de qualidade	18
Referências	19

Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal

*Mariangela Hungria
Krisle da Silva*

Introdução

Existe uma demanda crescente por produtos agrícolas, resultante do incremento na população; entretanto, as terras disponíveis para o cultivo são cada vez mais limitadas, quadro este agravado pela degradação resultante do mau manejo do solo, acompanhada pela erosão da fertilidade, que é acentuada em vários países, como o Brasil, pelo preço elevado dos fertilizantes químicos. Nesse contexto, diversas bactérias do solo podem contribuir substancialmente, a baixo custo, não só para a nutrição de plantas, mas também para a melhoria das propriedades físicas e químicas do solo, resultando em maior produção de alimentos e melhoria na qualidade dos solos.

O objetivo deste manual é fornecer informações básicas de procedimentos a serem adotados para a criação e manutenção de coleção de bactérias capazes de realizar o processo de fixação biológica do nitrogênio (diazotróficas) e de bactérias promotoras do crescimento de planta para curadores de coleções de culturas. A preservação adequada dessas bactérias é de grande interesse para o agronegócio brasileiro e também para o meio ambiente, podendo, ainda, representar uma fonte importante de genes com grande potencial biotecnológico.

Coleta de amostras

As bactérias estão presentes em praticamente todos os ambientes. A coleta deverá ser realizada de acordo com os grupos de interesse que se deseja ter na coleção. Como exemplo, se a coleção de interesse é para bactérias que promovam o crescimento vegetal, estas devem ser coletadas em áreas onde esses grupos são abundantes e/ou estão presentes (ex.: rizosfera); caso a coleção seja de bactérias diazotróficas simbióticas, devem ser coletados nódulos de diversas leguminosas hospedeiras.

A expedição para a coleta deve ser planejada com antecedência. Questões sobre autorização para coleta em determinada área segundo a legislação vigente, equipe que realizará a coleta, material a ser levado, acondicionamento do material coletado, anotações sobre a coleta e a recepção no laboratório devem estar definidas antes de se iniciar a coleta.

As amostras coletadas para isolamento de bactérias devem ser acondicionadas em material adequado e estéril até a chegada ao laboratório. Todo o material para coleta deverá ser esterilizado. As informações mínimas referentes a cada amostra coletada

deverão incluir: data, local (com as coordenadas geográficas – latitude, longitude, elevação), tipo de amostra coletada (ex.: tecido vegetal, solo, água, etc.), responsável pela coleta e características do local onde foi realizada a coleta. A quantidade de amostra coletada deverá ser suficiente para permitir o isolamento, deve representar a área coletada e, também, ser suficiente para outras análises não microbiológicas. Como exemplo, para amostras de solo coletadas para isolamento de bactérias, também devem ser realizadas análises químicas e físicas do solo.

A coleta é um ponto crucial para o isolamento de grupos de bactérias de interesse. Uma coleta mal realizada ou a falta de informações sobre a área onde foi realizada a coleta podem comprometer todo o trabalho posterior.

Isolamento

O tempo entre a coleta da amostra e o isolamento deverá ser o menor possível, a fim de minimizar qualquer alteração nas amostras coletadas. O isolamento deverá ser realizado de acordo com o grupo que se deseja estudar. Como exemplo, para o isolamento de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio, pode-se utilizar o protocolo descrito por Hungria (1994); para bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a não leguminosas, recomenda-se o protocolo de Videira *et al.* (1997). A descrição de meios de cultura próprios para esses e outros micro-organismos, como os promotores de crescimento vegetal, também pode ser encontrada na publicação de Campo e Hungria (2006).

Cada amostra que for enviada para a coleção do laboratório deverá vir acompanhada de um formulário específico de envio, contendo informações sobre o isolado ou a estirpe depositada.

Identificação e caracterização

Caracterizar significa atribuir características, que podem ser fenotípicas ou genotípicas. As características fenotípicas podem sofrer alterações com o meio ambiente e podem diferir em cada meio de cultivo em que a bactéria for cultivada. Já as características genotípicas são estáveis e não sofrem alteração do ambiente. A caracterização é uma ferramenta importante para a identificação das bactérias.

Caracterização fenotípica

A caracterização fenotípica, realizada por meio da caracterização morfo-fisiológica cultural das colônias isoladas em meio de cultivo, é uma técnica fácil e que pode ser empregada em qualquer laboratório. Permite uma caracterização inicial das estirpes e é importante para efeito de comparação de estirpes que sejam cultivadas nas mesmas condições, isto é, mesmo meio de cultivo, temperatura e período de crescimento. A caracterização é sempre realizada a partir de colônias isoladas.

Para as bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio, coletivamente denominadas de rizóbios, a caracterização inicial é realizada em meio YMA – *Yeast Manitol Agar* (VINCENT, 1970), também conhecido como meio ELMA (extrato de levedura, manitol, ágar) ou meio 79, em que são utilizados dois corantes: vermelho Congo, para auxiliar na identificação de contaminantes, que em geral absorvem a cor vermelha; e azul de bromotimol, para

verificar a reação ácida ou básica na presença de manitol suprido como fonte de carbono (Figura 2). As bactérias são repicadas em placas de Petri contendo o meio YMA, por meio de estrias para a obtenção de colônias isoladas, que serão então caracterizadas. As características avaliadas são: manifestação do crescimento (rápido, lento, intermediário e muito lento); alteração do pH do meio (ácido, neutro ou alcalino); tamanho (diâmetro das colônias); forma da colônia (circular, irregular, puntiforme); elevação da colônia (plana, lenticular, convexa, pulvinada, umbonada, umbilicada); borda (inteira, ondulada, lobada, denteada, filamentosa); superfície (lisa, rugosa ou papilada); produção de muco (escassa, pouca, moderada ou abundante); consistência (seca, aquosa, gomosa, viscosa ou butírica); detalhes ópticos (transparente, translúcida ou opaca); e cromogênese em vermelho Congo e em azul de bromotimol. Na Figura 1, são apresentadas as características morfológicas das colônias de bactérias encontradas nos meios de cultivo. Como exemplo, no Quadro 1 é apresentado o formulário de descrição morfo-fisiológica das bactérias da coleção da Embrapa Soja.

Nessa etapa inicial, vários testes bioquímicos podem ser utilizados para a caracterização de propriedades específicas das bactérias. Para as bactérias promotoras do crescimento vegetal, podem ser empregados testes para detecção de sideróforos por meio de cromo azurol S (CAS), produção de ácido indol acético, detecção de quitinase, beta-1,3-glucanase, 1-aminociclopropano-1-carboxylato (ACC) deaminase e capacidade de solubilizar fosfatos. As metodologias para essas avaliações podem ser consultadas na publicação de Campo e Hungria (2006).

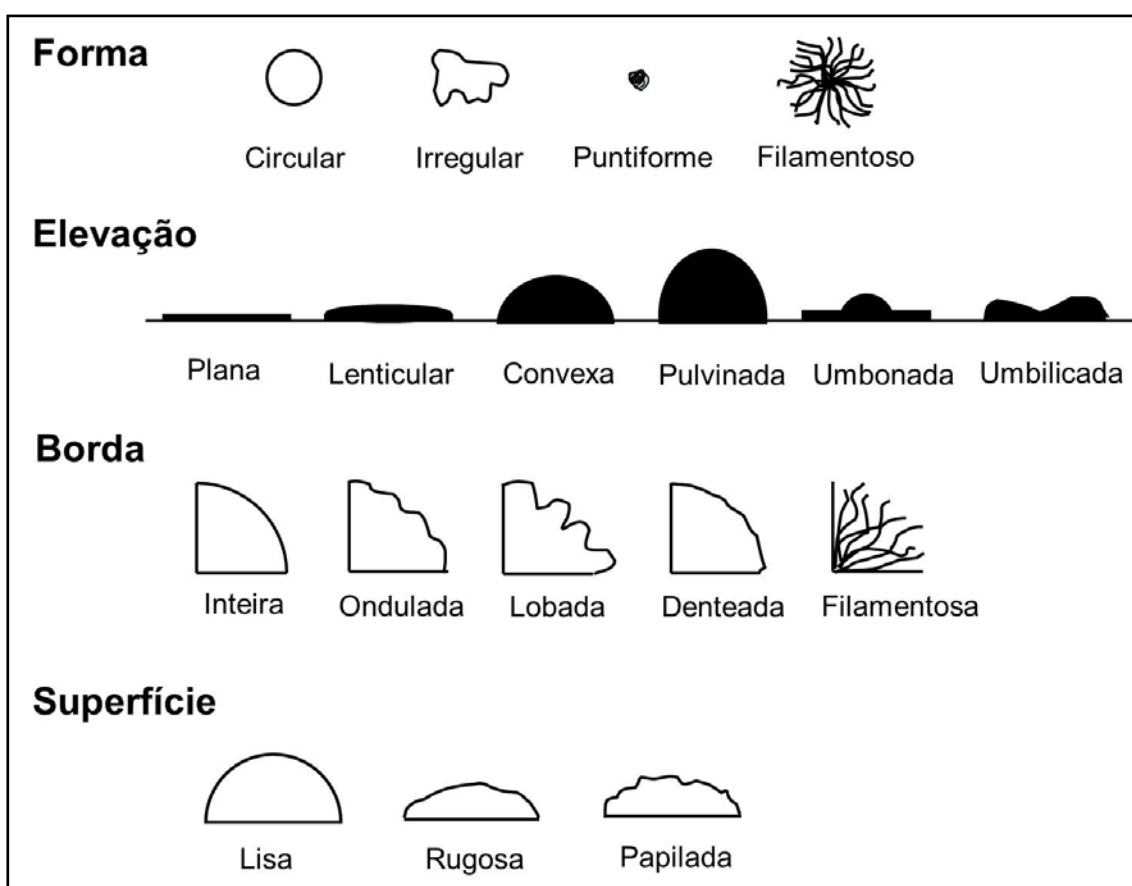


Figura 1. Morfologia de colônias de bactérias utilizadas para caracterização cultural em meio de cultivo.

Fotos: Krisle da Silva

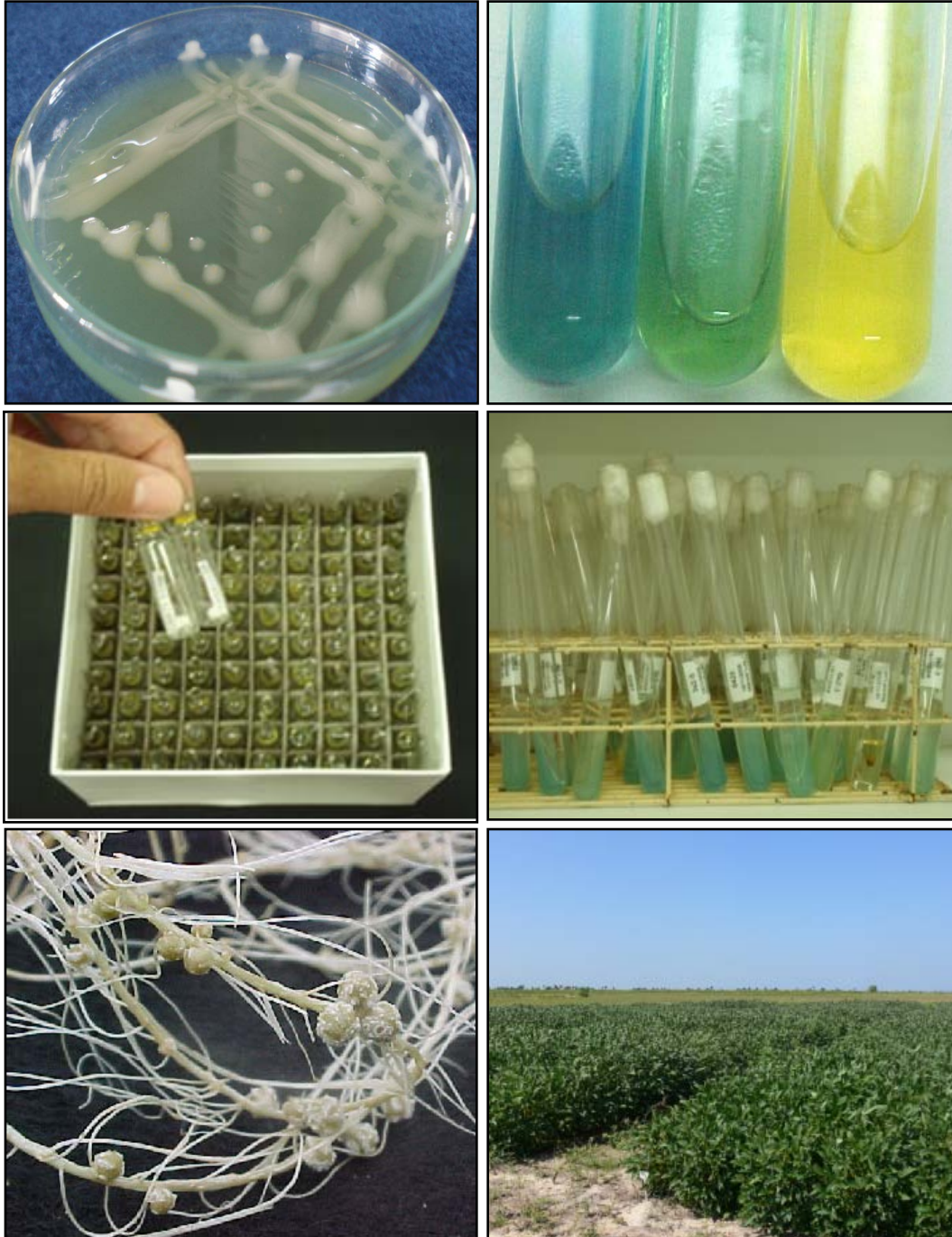


Figura 2. Iniciando pela esquerda: placa de rizóbios mostrando o esgotamento até a obtenção de colônias puras; crescimento de rizóbios em meio YMA contendo azul de bromotimol como indicador; preservação em ampolas liofilizadas; preservação em tubos com meio de cultura sólido; nodulação de raiz de leguminosa por rizóbios; e avaliação no campo da eficiência agrônômica de rizóbios.

Quadro 1. Formulário de avaliação morfo-fisiológica das bactérias da coleção de culturas de micro-organismos multifuncionais da Embrapa Soja.

Ensaio: () recebimento () periódico () outro							
Estirpe:							
Soluções/Reagentes utilizados				Equipamentos/Vidrarias utilizados			

As características dos itens 3 a 14 devem ser observadas na fase final de avaliação, a partir da anotação do diâmetro das colônias.

1. Manifestação do Crescimento (colônias isoladas):

- () rápida (até 3 dias) () intermediária (4 a 5 dias)
 () lenta (6 a 9 dias) () muito lenta (acima de 10 dias)

2. Tamanho (diâmetro das colônias):

____ mm aos ____ dias (na manifestação das colônias isoladas) rápido – 5 dias intermediário – 8 dias
 ____ mm aos ____ dias (no final da avaliação) lento – 12 dias muito lento – 15 dias

3. Alteração do pH no meio YMA com o indicador Azul de Bromotimol:

- () ácido (amarelo) () neutro (sem alteração de cor) () alcalino (azul)

4. Forma da colônia:

- () puntiforme (até 1 mm) () circular () irregular

5. Elevação da colônia:

- () plana () lenticular () convexa () pulvinada (drop-like)

6. Borda da colônia:

- () inteira () ondulada () lobada () denteada () filamentosa

7. Superfície da colônia:

- () lisa () rugosa () papilada

8. Produção de muco:

- () escassa () pouca () moderada () abundante

9. Consistência da massa de crescimento:

- () seca () aquosa () gomosa (creme) () viscosa (elástica) () butírica (manteiga)

10. Detalhes ópticos:

- () transparente () translúcido () opaco

11. Cromogênese da colônia em meio YMA com indicador Azul de Bromotimol:

- () incolor (lupa) () branco (olho nu) () creme () amarelo () rosa

12. Cromogênese da colônia em meio YMA com corante Vermelho Congo:

- () incolor (lupa) () branco () rosado (levemente) () rosa (bebê)
 () avermelhado (centro) () vermelho

13. Coloração de Gram:

- () Gram-positiva cor violeta () Gram-negativa cor vermelha

14. Outras informações (registrar no verso)

Data: __/__/__

Responsável: _____

Caracterização genotípica

Análise do gene ribossomal 16S e outros genes *housekeeping*

A caracterização genotípica, ao contrário da caracterização fenotípica, não sofre alterações devido ao ambiente. Pela definição atual de taxonomia, a sequência completa do gene 16S RNA ribossomal (RNAr) consegue definir a classificação das bactérias ao nível de gênero e, em alguns casos, de espécie. Desse modo, os genes 16S RNAr devem ser preferencialmente utilizados em estudos de taxonomia e filogenia, havendo um esforço em depositar um grande número dessas sequências, por exemplo, no *Ribosomal Database Project* (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Além disso, tem aumentado o depósito de sequências referentes a outros genes ribossomais, como o 23S DNAr e o espaço intergênico 16S-23S RNAr (IGS, região intergênica), que apresentam maior divergência entre as espécies, diferem quanto à taxa de evolução e – no caso do 23S RNAr – apresentam maior número de bases. Para a obtenção do gene 16S RNAr completo, podem ser necessárias várias reações de amplificação, como exemplificado no estudo conduzido por Menna *et al.* (2009) e visualizado no Quadro 2, com a utilização de cinco *primers*.

Outra metodologia mais recente que vem sendo cada vez mais empregada, o *Multilocus Sequence Typing* – MLST (caracterização por sequenciamento de lócus múltiplos) consiste no sequenciamento, em geral de cinco genes, e na análise conjunta, como uma única sequência concatenada, de genes conservados, também denominados de *housekeeping*. Os genes utilizados como marcadores filogenéticos alternativos, além de serem conservados para o grupo em estudo, precisam obedecer a alguns critérios: i) distribuição no genoma com uma distância mínima entre os genes de 100 kb; ii) presença no genoma em uma única cópia; iii) extensão nucleotídica suficiente que permita o sequenciamento; iv) conter informações suficientes para as análises; e v) que os dados obtidos com o uso desses genes sejam correlacionados com os dados obtidos com o gene ribossomal 16S e com os percentuais de similaridade obtidos por hibridização DNA-DNA. Aplicando-se o mesmo princípio do MLST à taxonomia e filogenia, desenvolveu-se a metodologia de *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA), com propósitos específicos que permitem sua utilização para a definição de espécies e a elucidação de relações taxonômicas e filogenéticas entre espécies bacterianas.

Atualmente, vários laboratórios dispõem de sequenciadores, e a identificação de bactérias por meio do emprego de genes ribossomais e outros genes *housekeeping* é rotina no Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja, com a utilização dos *primers* especificados no Quadro 2, que foram utilizados nos trabalhos de Menna *et al.* (2009) e Ribeiro *et al.* (2009).

Quadro 2. *Primers* e condições de amplificação utilizadas em análises de MLSA com rizóbios por Menna *et al.* (2009), Ribeiro *et al.* (2009) e neste volume.

Gene (≈ bp)	Primer	Sequência (5' - 3')	Fragmento (pb)	Ciclos de amplificação
16S RNAr (1,500)	fD1*	ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCT CAG	~ 1,500 pb (para fD1-rD1)	Para amplificação 2 min 95°C, 30 X (10s 95°C, 4s 50°C, 4 min 60°C), ciclo final de extensão de 5 min 72°C, manutenção a 4°C
	Y2(r) 362f 786f	CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG		
	1203f rD1*	GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC		Para sequenciamento 2 min 95°C, 30 X (10s 95°C, 4s 50°C, 4 min 60°C), manutenção a 4°C
<i>dnaK</i> (1,900)	dnaK1466F	AAGGARCANCAGATCCGCATCCA	~ 310	1 min 94°C, 35 X (1 min 94°C, 1 min 64°C, 40s 72°C), ciclo final de extensão de 5 min 72°C
	dnaK1777R	TASATSGCCTSRCCRAGCTTCAT		
<i>recA</i> (1,090)	recA6F	CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA	~ 550	2 min 95°C, 35 X (45s 95°C, 30s 58°C, 1,5 min 72°C), ciclo final de extensão de 7 min 72°C
	recA555R	CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT		
<i>gltA</i> (1,290)	gltA428F	CSGCCTTCTAYCAYGACTC	~ 680	5 min 95°C, 3 X (2 min 94°C, 2 min 53°C, 1 min 72°C), 30 X (30s 94°C, 1 min 53°C, 1 min 72°C), ciclo final de extensão de 5 min 72°C
	gltA1111R	GGGAAGCCSAKCGCCTTCAG		
<i>glnII</i> (1,040)	TSglnII f TSglnII r	AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGACGG SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCG	~ 670	2 min 95°C, 35 X (45s 95°C, 30s 58°C, 1,5 min 72°C), ciclo final de extensão de 7 min 72°C
<i>rpoA</i> (1,010)	RRpoAf	GGAAATCGCCATCAAGATGG	~ 730	2 min 95°C, 35 X (45s 94°C, 45s 55°C, 2 min 72°C), ciclo final de extensão de 5 min 72°C
	RRpoAr	ACGCTTGCGGAGATCTTC		
<i>atpD</i> (1,460)	TSatpDf	TCTGGTCCGYGGCCAGGAAG	~ 615	2 min 95°C, 35 X (45s 95°C, 30s 58°C, 1,5 min 72°C), ciclo final de extensão de 7 min 72°C.
	TSatpDr	CGACACTTCCGARCCSGCCTG		

*Letras minúsculas indicam grampos que são utilizados para clonagem, mas que também conferem maior estabilidade à amplificação.

Fingerprinting de bactérias

A análise de genes ribossomais e outros genes *housekeeping*, porém, não consegue diferenciar estirpes. Desse modo, outros métodos genéticos de *fingerprinting* devem ser utilizados para o controle de qualidade das bactérias, tanto na rotina de manutenção das coleções de culturas quanto na etapa de distribuição das estirpes. Em geral, essas técnicas permitem verificar a diversidade intraespecífica, ou seja, a subdivisão de espécies em um número distinto de tipos, fornecendo um suporte para bactérias similares.

O *fingerprinting* de DNA pode basear-se na restrição do genoma total ou em amplificações específicas do genoma bacteriano por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), ou seja, reação em cadeia da polimerase. Entre as diversas técnicas de *fingerprinting*, podem ser citadas: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), ou polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição; *Amplified Fragment Length Polymorphism*

(AFLP), ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (VOS *et al.*, 1995); *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), ou DNA polimórfico amplificado ao acaso (WELSH; MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990); e amplificação com *primers* relacionados a regiões repetidas e conservadas do DNA bacteriano, conhecida por rep-PCR (*repetitive-sequence-based-PCR*) (VERSALOVIC *et al.*, 1994; de BRUIJN, 1992).

Para bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas recomenda-se a obtenção de perfis de rep-PCR (Quadro 3), com ênfase no BOX-PCR para a utilização no controle de qualidade para checagem da autenticidade para a distribuição das estirpes para outros laboratórios e para as indústrias de inoculantes. A metodologia detalhada para a obtenção desses perfis foi descrita por Hungria *et al.* (2008). Em 2010, essa técnica passou a ser reconhecida como a metodologia oficial do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para a identificação de rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal visando à produção de inoculantes comercializados no Brasil.

A coleção de culturas da Embrapa Soja utiliza regularmente esta técnica para checar a autenticidade de suas estirpes. Na Figura 3, são apresentados os perfis de BOX, REP e ERIC para a estirpe CPAC 15 (= SEMIA 5079) de *Bradyrhizobium japonicum*.

Quadro 3. *Primers* e condições de amplificação utilizadas em análises de rep-PCR, segundo Hungria *et al.* (2008).

Primer	Sequência (5' - 3')	Ciclos de amplificação
BOX A1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	7 min 95°C, 30 a 35 X (1min 94°C, 1min 53°C, 8min 65°C), ciclo final de extensão de 16min 65°C
REP 1R	IIICGICGICATCIGGC	7min 95°C, 30 a 35 X (1min 94°C, 1min 45°C, 8 min 65°C por 8 min.), ciclo final de extensão de 16 min 65°C
REP 2I	ICGICTTATCIGGCCTAC	
ERIC 1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	7 min 95°C, 30 a 35 X (1min 94°C, 1min 52°C, 8min 65°C por 8 min), ciclo final de extensão de 16 min 65°C
ERIC 2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	

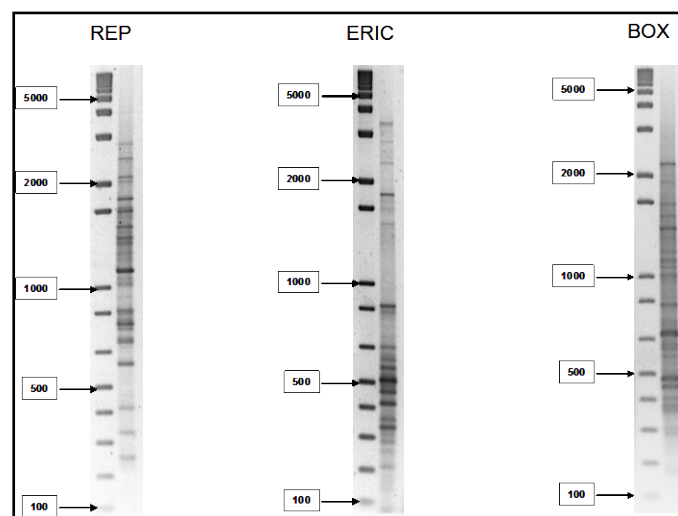


Figura 3. Perfis de REP-, ERIC- e BOX-PCR obtidos para a estirpe CPAC 15 de *Bradyrhizobium japonicum*.

Preservação

A preservação assegura a manutenção de formas viáveis das bactérias sem a manipulação frequente. Quando estirpes são isoladas, identificadas ou armazenadas em uma coleção, deve-se manter suas características culturais, morfológicas e genéticas. Para bactérias é comum a preservação por longos períodos. Diversos métodos de preservação por longo período são empregados, com ênfase na criopreservação e na liofilização. A preservação deve assegurar a viabilidade das células, ausência de contaminantes e ausência de alterações nas características fenotípicas e genotípicas (autenticidade). Assim, deverão ser realizadas checagens periódicas do material preservado.

Os métodos de preservação são divididos em métodos envolvendo o congelamento e métodos de secagem a vácuo (DAY; STACEY, 2007). A criopreservação é a manutenção biológica de organismos vivos sob baixa temperatura, de forma que eles possam sobreviver após descongelamento. Em geral, a criopreservação se refere à manutenção à temperatura de -80°C , mas novos *ultrafreezers* com temperaturas inferiores a -140°C já são encontrados no mercado. As bactérias também podem ser acondicionadas em nitrogênio líquido.

A liofilização é um processo em que a amostra é congelada e, posteriormente, seca por meio de sublimação (estado sólido para gasoso). O principal objetivo desses processos é preservar organismos sem alterações morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas. Diversos crioprotetores têm sido empregados para micro-organismos, como dimetilsulfóxido, glicerol, albumina, leite desnatado e peptona, entre outros (HUBÁLEK, 2003).

Em coleções de cultura, devem ser mantidas amostras de estirpes criopreservadas e liofilizadas com repetições (Figura 2). Após a criopreservação e a liofilização de um lote, deve-se checar a viabilidade das células, para garantir que não houve morte celular durante o processo de preservação. Deve-se também checar a viabilidade das estirpes bacterianas ao longo do tempo, o que deve ser realizado por amostragem de cada lote criopreservado e liofilizado, para checagem da viabilidade e autenticidade (características morfológicas e genotípicas), além de possíveis contaminantes.

Além de um número adequado de cópias de estirpes mantidas por pelo menos dois métodos, prioritariamente criopreservação e liofilização, também é necessário providenciar uma cópia (*backup*) das estirpes, de preferência armazenadas em outro edifício.

Valoração das bactérias

O potencial de uso de uma determinada estirpe deverá ser verificado em condições de laboratório, casa de vegetação e, nas etapas finais, no campo. Devem ser incluídos tratamentos controle que permitam a confirmação desse potencial. Como exemplo, para a verificação da capacidade de fixação de nitrogênio em leguminosas de grãos (Figura 2), os tratamentos mínimos devem ser: 1) tratamento sem inoculação; 2) tratamento sem inoculação, com nitrogênio químico fornecido na concentração recomendada para a cultura; 3) tratamentos com inoculação das estirpes já recomendadas para a cultura, quando existentes, testadas separadamente ou em conjunto, quando essa for a tecnologia recomendada; e 4) tratamentos com inoculação das estirpes a serem testadas, separadamente ou em conjunto, quando essa for a tecnologia testada. Como exemplo de quantidades de N a serem adicionadas por vaso, tem-se: para a soja (*Glycine max*) 700

mg; para o feijão (*Phaseolus vulgaris*) e para o caupi (*Vigna unguiculata*) 350 mg, sempre parcelados semanalmente.

Em casa de vegetação, os ensaios podem ser conduzidos em substrato estéril e, em uma etapa seguinte, em vasos com solo, para verificar a capacidade competitiva das estirpes. Se uma estirpe elite for identificada, ela deve então ser levada a um ensaio de campo.

Os parâmetros mínimos a serem avaliados no caso de bactérias fixadoras de nitrogênio são nodulação – número e massa de nódulos (Figura 2) –, massa da parte aérea seca, concentração e nitrogênio total nos tecidos, aos 25-30 dias após a emergência, se for desejável verificar o efeito do inoculante em solo com população elevada de bactérias semelhantes, ou no florescimento pleno, se o interesse for verificar o desempenho no desenvolvimento das plantas. No caso de ensaios de campo, verificar o rendimento de grãos e o teor e N total acumulado nos grãos no final do ciclo.

No caso de bactérias promotoras do crescimento de plantas, os parâmetros avaliados devem ser considerados conforme as propriedades desejadas. Como exemplo, no caso de promoção no crescimento das raízes, parâmetros de avaliação de massa, área e volume de raízes podem ser avaliados; para aumento na absorção de nutrientes, os teores de macro e micronutrientes nos tecidos devem ser avaliados, preferencialmente no florescimento, e assim para cada caso específico.

O número mínimo de repetições em ensaios de campo deve ser de quatro, mas resultados melhores são obtidos com seis repetições, por causa da variabilidade elevada de parâmetros microbiológicos. No caso de avaliação da fixação biológica do nitrogênio com a cultura da soja, Souza *et al.* (2008) determinaram os coeficientes de variação aceitáveis para diversos parâmetros, os quais não devem diferir substancialmente em estudos com outras leguminosas.

Armazenamento dos dados da coleção

Dados de cada estirpe da coleção deverão ser armazenados, incluindo informações sobre: local de isolamento, substrato ou hospedeiro de isolamento, nome da pessoa responsável pelo isolamento, nome do responsável pelo depósito, nome do responsável pela identificação, procedimento para preservação, número de cópias preservadas, meio de cultivo apropriado, características de crescimento, propriedades morfo-fisiológicas das colônias e caracterizações genotípicas disponíveis, grupo de risco, disponibilidade para distribuição. As informações deverão estar computadorizadas, com cópias de segurança e, quando possível, disponibilizadas via *homepage* institucional. Informações sobre a manutenção de cada estirpe também deverão ser digitalizadas, como checagem da viabilidade e autenticidade.

Mais uma vez, cabe salientar a importância das informações que devem estar disponíveis sobre cada estirpe, conforme estabelecidos pela OECD (2007) para bactérias e que podem ser visualizadas no Quadro 4.

Quadro 4. Conjunto mínimo e recomendado de dados sobre as estirpes de bactérias de uma coleção de culturas, segundo a OECD (2007).

Conjunto mínimo de dados (<i>Minimum Data Set, MDS</i>)	Conjunto recomendado de dados (<i>Recommended Data Set, RDS</i>)
Número de acesso	Serovar
Números em outras coleções	Outros nomes
Nome	Forma isolada
Nome infra-subespecífico	Mutante
Tipo de organismo	Genótipo
Restrições na distribuição	Literatura
Situação	
Histórico	
Origem geográfica	
Condições de crescimento	
Forma de suprimento	

Transferência de material genético

Todo o material transferido deve apresentar os respectivos “Termo de Transferência de Material”, ou *Material Transfer Agreement*, obedecendo à legislação vigente.

Segurança e controle de qualidade

Todas as operações realizadas em laboratórios de coleções bacterianas devem ser conduzidas com normas de segurança e seguindo metodologias padrões que assegurem a qualidade do serviço realizado. As operações devem seguir normas de boas práticas de laboratório e respeitar a legislação ambiental quanto ao descarte de qualquer material.

Referências

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agrônômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas. In: **Reunião da rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologias de inoculantes de interesse agrícola**, 13, Londrina, PR, 2006. Anais... Londrina, Embrapa Soja, 2007. p. 89-123. (Embrapa Soja. Documentos, 290).

DAY, J. G; STACEY, G. (Ed.). **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. 2th ed. New Jersey: Humana, 2007. 347 p. (Methods in Molecular Series, 368).

DE BRUIJN, F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 58, p. 2180-2187, 1992.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, [S. l.], v. 46, p. 205-229, 2003.

HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. EMBRAPA-SPI, Brasília, DF, 1994. p. 45-61.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. 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, PR: Embrapa Soja, 2008. 12 p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 79).

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

OECD. **OECD best practice guidelines for biological resource centers**. Paris, France: OECD, 2007. 115 p.

RIBEIRO, R. A.; BARCELLOS, F. G.; THOMPSON, F. L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* strains microsymbionts of common beans (*Phaseolus vulgaris*) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, [S. l.], v. 160, n. 4, p. 297-306, 2009.

SOUZA, R. A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CHUEIRE, L. M. O.; BARCELLOS, F. G.; CAMPO, R. J. Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 71-82, 2008.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cell Biology**, [S. l.], v. 5, p. 25-40, 1994.

VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D. **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas**. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 2007. 74 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 234).

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford, UK: Blackwell Scientific, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15).

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PALEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 19, p. 303-306, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 18, p. 6531-6535, 1990.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***