

Transformação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Estirpe PAL 5 pela Técnica de Eletroporação

Luc Felicianus Marie Rouws¹
Adriana Silva Hemerly²
José Ivo Baldani³

Introdução

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria aeróbica, Gram-negativa, com capacidade de fixar N₂, originalmente isolada do interior de raízes, colmos e folhas da cana-de-açúcar (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; GILLIS et al., 1989). Esta bactéria também já foi encontrada em batata doce (*Ipomoea batatas*), capim colônio (*Pennisetum purpureum*), café (*Coffea arabica*) e abacaxi (*Ananas comosus*) (BALDANI & BALDANI, 2005, para uma revisão). A estirpe PAL 5 de *G. diazotrophicus* promove o crescimento da cana-de-açúcar, em parte, através da fixação de nitrogênio, porém, outros mecanismos, possivelmente a produção de auxinas e giberelinas estão envolvidos também (SEVILLA et al., 2001; BASTIAN et al., 1998). As características de promotora de crescimento fazem dela uma bactéria com potencial biotecnológico para a agricultura.

Atualmente, a seqüência completa do genoma da estirpe Pal 5 está sendo determinada em um projeto da rede Riogene (www.riogene.incc.br), no qual a Embrapa Agrobiologia é uma das instituições parceiras. As informações genéticas geradas por este seqüenciamento, darão um impulso no conhecimento e no entendimento sobre os processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos no efeito positivo da bactéria sobre o crescimento da cana-de-açúcar.

Na fase seguinte ao seqüenciamento, ou seja, a fase pós-genômica, os dados gerados serão usados como subsídio para estudos de laboratório com o objetivo final de otimizar os efeitos positivos nesta interação. Para os estudos de engenharia genética é importante possuir um método de transformação gênica que possibilite intervir, em nível molecular, na genética da bactéria. Estudos sobre os mecanismos de expressão e de regulação dos genes bacterianos envolvidos no processo de promoção do crescimento da cana-de-açúcar são exemplos da necessidade de transformação gênica.

O desenvolvimento de métodos para a realização de mutagênese sítio-dirigida ou aleatória, e marcação da bactéria com genes de resistência a antibióticos ou genes repórter, devem considerar as particularidades da espécie bacteriana utilizada. Uma técnica rápida e simples, que é amplamente usada para a transformação de bactérias, é a eletroporação. Para que as células possam ser transformadas por este processo elas devem ser eletrocompetentes, ou seja, com capacidade para receber fragmentos de DNA exógeno através de poros temporariamente formados na membrana celular, induzidos por um pulso elétrico de alta voltagem.

A eletrocompetência celular é conseguida pela coleta das células em fase de crescimento exponencial seguida por sucessivas lavagens que visam à remoção de íons e impurezas do meio extracelular. Para cada espécie de bactéria é necessário determinar as condições adequadas de lavagem e de eletroporação.

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um protocolo de transformação para a estirpe PAL 5 de *G. diazotrophicus* com o plasmídeo de pKT230, pela técnica de eletroporação.

Condições de cultivo das bactérias

A estirpe DH10B de *Escherichia coli*, utilizada como hospedeiro para a clonagem e a multiplicação de plasmídeos, foi cultivada a 37°C em meio Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK et al., 1989). Para o cultivo de *G. diazotrophicus* estirpe PAL 5, foram usados meio Dygs (2 g/L glicose, 1,5 g/L peptona, 2 g/L extrato de levedura, 0,5 g/L K₂HPO₄, 0,5 g/L MgSO₄.7H₂O, pH6) e meio C2 (10 g/L peptona, 15 g/L glicose, 5 g/L NaCl e 5 g/L extrato de levedura, pH6). Para os meios sólidos foi adicionado 15 g/L de agar. O uso do meio de cultura C2 e da solução de glicerol de 10% neste trabalho foi baseado em relatos anteriores sobre a eletroporação (TEIXEIRA et al., 1999).

¹ Doutorando em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro. E-mail: rouws@bioqmed.ufrj.br

² PhD em Biotechnology, Rijksuniversiteit Gent, Belgica. Professora do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico, Universidade Federal do Rio de Janeiro. E-mail: hemerly@bioqmed.ufrj.br

³ Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, Engenheiro Agrônomo, PhD em Ciência do Solo, Rodovia BR 465, km 07, CP 74.505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ. E-mail: ibaldani@cnpab.embrapa.br

Preparação de células eletrocompetentes de *G. diazotrophicus* estirpe PAL 5

As células eletrocompetentes foram preparadas da seguinte forma (Figura 1): um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura C2 foi inoculado com uma colônia da estirpe PAL 5, obtida de uma cultura fresca em meio Dygs sólido. Esta pré-cultura foi incubada a 200 rpm a 30°C até atingir a fase logarítmica de crescimento (24 horas de crescimento). Dois mL desta pré-cultura foram transferidos para um frasco do tipo Erlenmeyer com volume de dois litros contendo 200 mL de meio de cultura C2 líquido. Esta cultura foi incubada sob as mesmas condições da pré-cultura, durante aproximadamente 20 horas, até atingir uma densidade ótica de 0,6 a 0,7 no comprimento de onda de 600 nm. O frasco contendo as células foi então resfriado sobre gelo por 30 minutos. A partir deste momento, todas as etapas foram realizadas sobre gelo, inclusive as soluções usadas as quais foram autoclavadas e resfriadas antes do uso. A cultura de 200 mL foi distribuída em 4 tubos do tipo Falcon com 50 mL cada, e centrifugada durante 10 minutos a 4.000 rpm, 4°C em rotor de ângulo fixo (centrífuga Eppendorf 5810R) para precipitar as células.

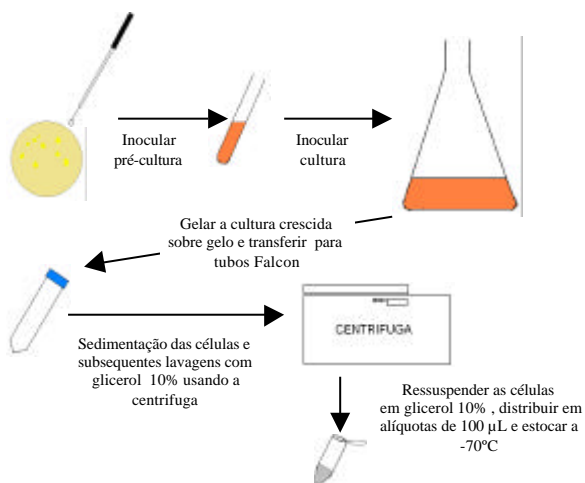


Figura 1 Representação esquemática da preparação de células eletrocompetentes da estirpe PAL 5.

O sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados em posição invertida sobre papel absorvente durante 5 segundos para possibilitar a drenagem completa do sobrenadante. Foi adicionado 50 mL de glicerol 10% a cada tubo. Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos, evitando bruscos movimentos dos tubos. Esta etapa é demorada e leva cerca de uma hora. Após a completa ressuspensão, as células foram novamente centrifugadas (4.000 rpm, 4°C, 10 min) e o sobrenadante descartado. A lavagem com glicerol 10% foi repetida sob as mesmas condições descritas acima. A segunda etapa de ressuspensão das células é mais rápida que a primeira, já que parte das impurezas extracelulares foi removida durante a primeira lavagem, diminuindo a coesão nos sedimentos. As células foram novamente centrifugadas

(4.000 rpm, 4°C, 10 min) e os sedimentos foram ressuspensos em 4 mL de glicerol 10%. Observe-se que a quantidade de glicerol nesta última etapa pode variar conforme a quantidade de células obtida. Após a completa ressuspensão, as células eletrocompetentes foram distribuídas em alíquotas de 100 µL em tubos do tipo Eppendorf, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -70°C para uso futuro.

Preparação do plasmídeo de teste pKT230

O plasmídeo pKT230 (BAGDASARIAN et al., 1981), que contém um gene de resistência ao antibiótico canamicina é do grupo de incompatibilidade IncQ e é compatível com a estirpe PAL 5 de *G. diazotrophicus*. Por este motivo o plasmídeo pKT230 foi escolhido como DNA de teste para avaliar a eficiência do método de eletroporação.

Este plasmídeo foi obtido da seguinte forma: o plasmídeo pMSKC4 (SEVILLA & KENNEDY, 2000), que é uma construção repórter baseado no plasmídeo pKT230, foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen) para remover o gene repórter *cobA*; após a digestão os fragmentos de DNA foram separados usando eletroforese de gel de agarose, e a banda correspondente ao plasmídeo pKT230 foi isolada. Este fragmento foi tratado com ligase T4 (Invitrogen) para restaurar o plasmídeo pKT230 na forma circular. O plasmídeo foi transferido para a estirpe DH10B de *E. coli* pela eletroporação usando o equipamento "electro cell manipulator 600" (BTX Inc. EUA), para a sua multiplicação. A preparação do plasmídeo para a eletroporação da estirpe PAL 5 foi realizada pela lise alcalina, conforme descrito em SAMBROOK et al. (1989).

A eletroporação da estirpe PAL 5 de *G. diazotrophicus*

Com o objetivo de determinar o funcionamento e a eficiência do método de eletroporação da estirpe PAL 5, um experimento de eletroporação com o plasmídeo pKT230 foi realizado (Figura 2). Alíquotas de 100 µL de células de PAL 5 eletrocompetentes foram descongeladas sobre gelo por aproximadamente 10 minutos. Em eletrocubetas com espaço de 2 mm (BIO-RAD) previamente geladas foi colocado até 1 µg de DNA do plasmídeo de teste pKT230, seguido de 100 µL de células eletrocompetentes. A cubeta foi incubada sobre gelo por 2 minutos, e colocada entre os eletrodos do equipamento "electro cell manipulator 600" (BTX Inc. EUA). Foi aplicado um pulso elétrico com os seguintes parâmetros: 186 O, high voltage, 2,5 kilovolts, constante de tempo ~0,8 msec. Imediatamente após o pulso, 2 mL de meio C2 (30°C) foram adicionados.

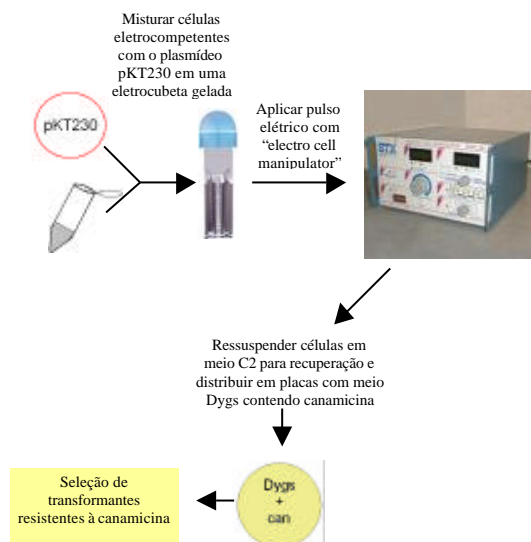


Figura 2: Representação esquemática do processo de eletroporação e seleção de transformantes.

A suspensão de células em meio C2 foi homogeneizada e transferida para um tubo do tipo Falcon de 15 mL e incubada em incubadora durante 2 horas a 30°C com rotação de 200 rpm para possibilitar a recuperação das células e a expressão dos genes introduzidos durante a transformação. Posteriormente, as células foram distribuídas em placas com meio Dygs contendo 200 µg/mL de canamicina. Estas placas foram incubadas a 30°C durante 3 dias, até que as colônias pudessem ser visualizadas (Figura 3).

O número observado de colônias de PAL 5 e a quantidade de DNA usada, foram combinados para determinar a eficiência da transformação, que foi 1×10^3 a 3×10^3 de transformantes por µg de DNA. Não houve formação de colônias resistentes nos controles negativos (células eletroporadas na ausência de DNA), demonstrando que a resistência observada para PAL 5 foi devido à presença desse plasmídeo (Figura 3).

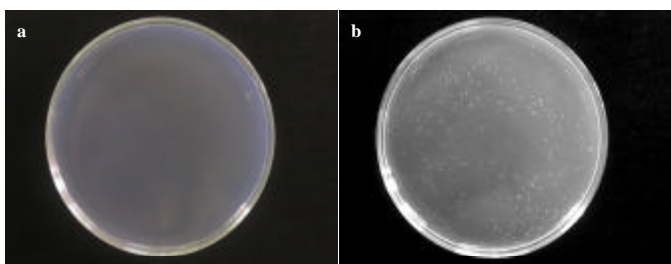


Figura 3 Recuperação da estirpe PAL 5 após a eletroporação. Células foram eletroporadas na ausência (a) ou na presença (b) de 500 ng de DNA do plasmídeo pKT230. As células foram distribuídas em placas com meio Dygs contendo 200 µg/mL canamicina e a avaliação ocorreu após 3 dias de incubação a 30°C.

Verificação da identidade dos transformantes pelo método de PCR

A confirmação da identidade dos transformantes de PAL 5 obtidos por eletroporação foi realizada pela amplificação de uma sequência espécie-específica presente no gene 23S DNAr desta bactéria. Os primers usados nas reações de PCR de colônias foram: primer AD (5'-TGC GGC AAA AGC CGG AT-3') e primer 1440 (5'-GTT GGC TTA GAA GCA GCC-3')

(KIRCHHOF et al., 1998). As reações foram realizadas usando um kit de Taq polimerase (Invitrogen) em volume total de 50 µL contendo: 1 U Taq polimerase, 5 µL tampão (10x), 4 mM MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 50 pmol de primer AD e 50 pmol de primer 1440. Junto a esta mistura foi adicionado o material de uma colônia, tirado de uma placa, usando ponteiros de pipeta de plástico. No controle positivo foi utilizado material de uma colônia de PAL 5 não transformado, e no controle negativo 1 µL de água foi adicionado. As misturas de PCR foram preparadas e levadas ao termociclador, onde foram submetidas ao seguinte programa: 3 minutos a 93°C, 30 ciclos de 45 segundos a 93°C, 45 segundos a 60°C e 60 segundos a 72°C, seguido por mais 10 minutos de extensão a 72°C.

A amplificação do fragmento espécie-específico do gene 23S DNAr por PCR a partir das colônias de PAL 5 confirmou a capacidade de transformação da estirpe PAL 5 pelo protocolo de eletroporação (Figura 4). Em alguns casos, colônias de bactérias contaminantes foram observadas. Algumas destas colônias também foram submetidas ao PCR sob as mesmas condições. Nestes casos não houve amplificação, confirmando a identidade dos transformantes como derivados de PAL 5 e a confiabilidade da reação de PCR como ferramenta auxiliar de seleção. Vale mencionar que o aparecimento de bactérias contaminantes ocorreu em um nível baixo e não prejudicou a geração de transformantes. Em subsequentes experimentos de eletroporação, o aparecimento destes contaminantes pôde ser eliminado.

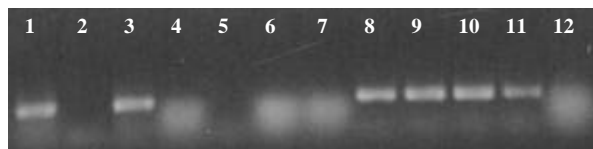


Figura 4 Reação de PCR a partir de colônias de transformantes da estirpe PAL 5 e de colônias de bactérias contaminantes, usando os primers AD e 1440, específicos para o gene 23S DNAr de *G. diazotrophicus*. Colônias derivadas de PAL 5 (linhas 8, 9, 10, 11) e colônias contaminantes (linhas 4, 5, 6, 7, 12). Linha 1: controle positivo (PCR com 40 ng de DNA de PAL 5), Linha 2: controle negativo (PCR com água), Linha 3: controle positivo (PCR com colônia de PAL 5 selvagem).

Isolação do plasmídeo pKT230 dos transformantes de PAL 5

Com o objetivo de confirmar a presença de pKT230 nos transformantes de PAL 5, o isolamento de DNA plasmideal de um transformante foi realizado pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). O DNA extraído do transformante e o plasmídeo pKT230 original foram tratados com a endonuclease *EcoRI* (Invitrogen) e separados e visualizados em gel de agarose. O plasmídeo isolado do transformante de PAL 5 foi do mesmo tamanho (11.8 kb) do plasmídeo pKT230 original, confirmando que pKT230 estava presente e pode ser multiplicado nesta bactéria (Figura 5).

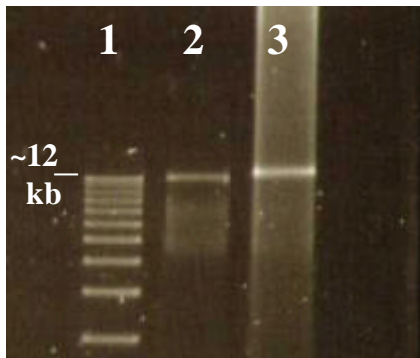


Figura 5: O plasmídeo pKT230 (Linha 2) e o plasmídeo extraído da estirpe PAL 5 transformada (Linha 3), digeridos com a enzima de restrição EcoRI. Linha 1: marcador molecular 1 kb ladder plus (Gibco).

Conclusão

O protocolo desenvolvido apresenta-se simples e rápido para a transformação gênica da estirpe PAL 5 de *G. diazotrophicus*, pela técnica de eletroporação. Este protocolo é imprescindível como ferramenta para a geração de mutantes e a engenharia genética desta bactéria.

Agradecimentos

Pronex 2003 CNPq/Faperj, CNPq

Referências Bibliográficas

BAGDASARIAN, M.; LURZ, R.; RUCKERT, B.; FRANKLIN, F. C. H.; BAGDASARIAN, M. M.; FREY, J.; TIMMIS, K. Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSP1010 derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. **Gene**, Amsterdam, v. 16, p. 237-247, 1981.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 549-579, 2005.

BASTIAN, F.; COHERN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A(1) and A(3) by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v. 24, p. 7-11, 1998.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 108, p. 23-31, 1988.

GILLIS, K.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DÖBEREINER, J.; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 39, p. 361-364, 1989.

KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 12-19, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning – A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SEVILLA, M.; BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 14, p. 358-366, 2001.

SEVILLA, M.; KENNEDY, C. Colonization of rice and other cereals by *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane. In: LADHA, J. K.; REDDY, P. M. (Ed.). **The quest for nitrogen fixation in rice**. Philippines: International Rice Research Institute, 2000. p. 151-165. Proceedings of the third working group meeting on assessing opportunities for nitrogen fixation in rice, 9-12 aug. 1999, Los Baños Laguna, Philippines.

TEIXEIRA, K. R. dos S.; WÜLLING, M.; MORGAN, T.; GALLER, R.; ZELLERMANN, E.- M.; BALDANI, J. I.; KENNEDY, C.; MELETZUS, D. Molecular analysis of the chromosomal region encoding the *nifA* and *nifB* genes of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 176, p. 301-309, 1999.

Comunicado Técnico, 84

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 7
Caixa Postal 74505
23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil
Telefone: (0xx21) 2682-1500
Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

1ª impressão (2006): 50 exemplares

Embrapa

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Comitê de publicações

Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Verônica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente

Revisor e/ou ad hoc: Kátia Regina dos Santos Teixeira e Gustavo Ribeiro Xavier
Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix.
Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia.