



Categoria: Iniciação Científica

Núcleo temático: ABC

Marcação de *Bradyrhizobium* spp. com proteína verde fluorescente

Mahyne Lopes da Cunha Souza¹, Stefan Schwab², José Ivo Baldan², Luc Rouws²

¹Graduanda de Agronomia, UFRRJ, mahynelopes@yahoo.com.br; ²Pesquisador Embrapa Agrobiologia.

A marcação de microrganismos com fluorescência é uma ferramenta poderosa para estudo dos mesmos em interação com plantas mediante métodos de microscopia, por exemplo. Existem ainda poucos trabalhos aplicando a transformação com genes de fluorescência a espécies de *Bradyrhizobium*, embora um trabalho recente apresentou uma série de novos plasmídeos para essa finalidade (Ledermann et al., 2015). *B. sacchari* é uma espécie atípica de *Bradyrhizobium* por ter sido isolada de raízes de cana-de-açúcar, uma gramínea, por apresentar a capacidade de nodular leguminosas e, também, de fixar nitrogênio em vida livre. O objetivo desse estudo foi adaptar os plasmídeos e procedimentos descritos por Ledermann e colaboradores para uso em *B. sacchari* BR10280^T. Inicialmente, um protocolo de conjugação para *Bradyrhizobium* foi estabelecido, onde a estirpe modelo *B. diazoefficiens* USDA 110^T, naturalmente resistente a cloranfenicol, foi empregada como receptora. Como doadora usou-se *Escherichia coli* estirpe S17-1 carregando o plasmídeo pRJPaph-bjGFP, que carrega um gene *gfp* e um gene codificando resistência ao antibiótico tetraciclina (Tc^R). Para a conjugação, a estirpe doadora foi cultivada em meio LB líquido contendo Tc (20 µg/mL) à 37°C sob agitação durante 24 h, enquanto que a estirpe receptora foi cultivada em meio líquido TY à 30°C durante 96 h. Posteriormente, as duas estirpes foram misturadas e alíquotas de 25 µL foram depositadas em placa com meio YMA e, mantidas à 30°C. Após 48 h, a massa de células obtidas foi diluída seriadamente e as diluições plaqueadas em meio (YMA) contendo tetraciclina e/ou cloranfenicol de acordo com a necessidade. Colônias com características do gênero *Bradyrhizobium* cresceram em placas contendo cloranfenicol e tetraciclina, indicando o sucesso do processo de conjugação e a absorção do plasmídeo pRJPaph-bjGFP pela receptora, como também a ausência de crescimento da doadora nas mesmas condições. Quando investigados no microscópio confocal a laser, as células observadas se mostraram verdes-fluorescentes, confirmando o sucesso da marcação. Atualmente, uma versão modificada do plasmídeo, designado pBSGFP, vem sendo testada para a transformação de *B. sacchari* BR10280^T.

Palavras chave:

GFP, conjugação, cana-de-açúcar.