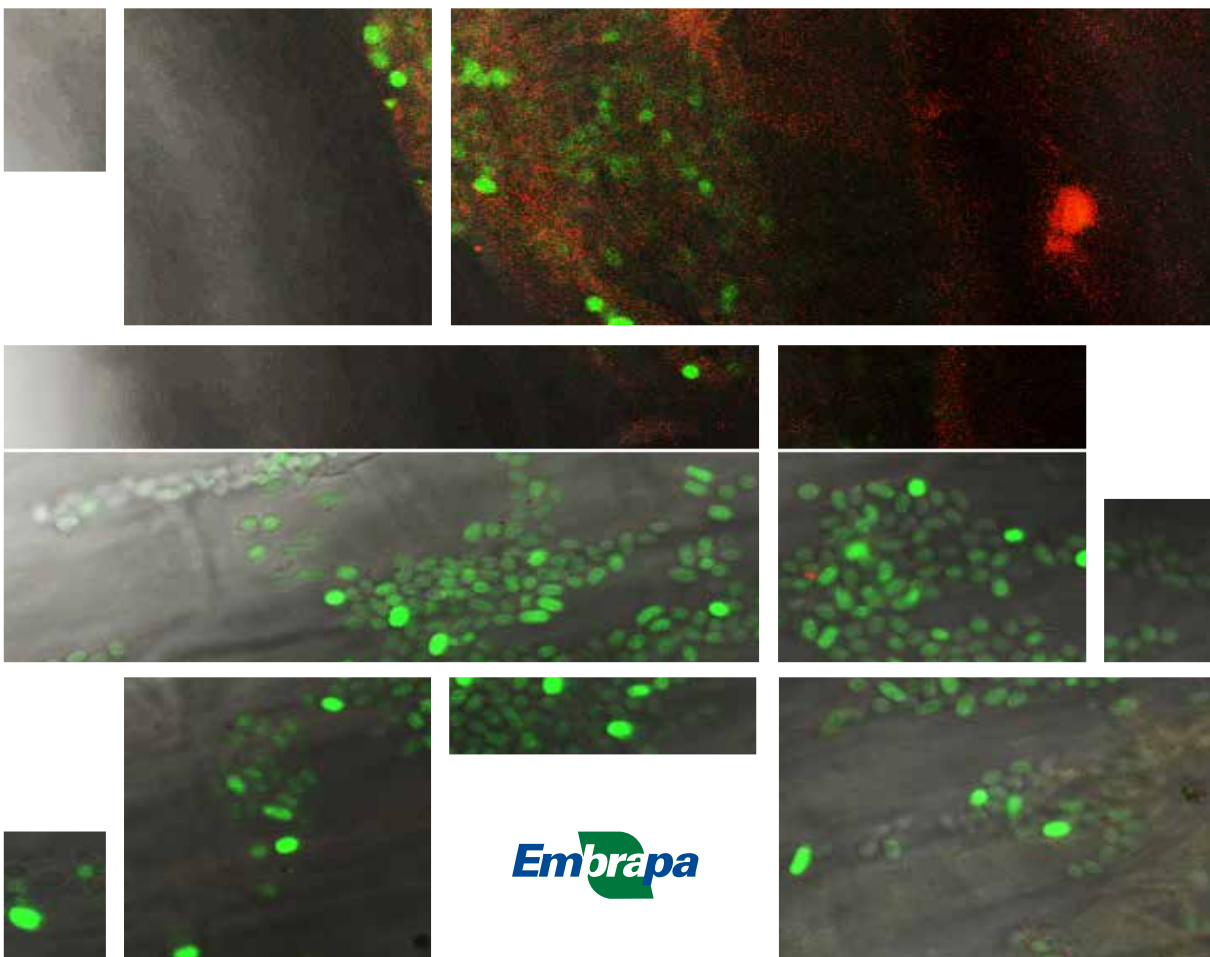


Marcação fluorescente de bactérias simbióticas e associativas de plantas de interesse agrícola na Embrapa Agrobiologia: transformação genética e plasmídeos



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

DOCUMENTOS 313

Marcação fluorescente de bactérias simbióticas e associativas de plantas de interesse agrícola na Embrapa Agrobiologia: transformação genética e plasmídeos

*Stefan Schwab
Marcia Soares Vidal
Luc Felicianus Marie Rouws*

Embrapa Agrobiologia
Rio de Janeiro, RJ
2020

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia
Rodovia BR 465, km 7
CEP 23891-000, Seropédica, RJ
Caixa Postal 74.505
Fone: (21) 3441-1500
Fax: (21) 2682-1230
www.embrapa.br/agrobiologia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agrobiologia

Presidente
Bruno José Rodrigues Alves

Secretária-Executiva
Carmelita do Espírito Santo

Membros
*Ednaldo Silva de Araújo, Janaina Ribeiro Costa
Rouws, Luc Felicianus Marie Rouws, Luis
Cláudio Marques de Oliveira, Luiz Fernando
Duarte de Moraes, Marcia Reed Rodrigues
Coelho, Maria Elizabeth Fernandes Correia,
Nátia Élen Auras*

Supervisão editorial
Maria Elizabeth Fernandes Correia

Normalização bibliográfica
Carmelita do Espírito Santo

Tratamento das ilustrações
Maria Christine Saraiva Barbosa

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Maria Christine Saraiva Barbosa

Foto da capa
Stefan Schwab

1ª edição
2020: Edição eletrônica

Todos os direitos reservados.

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agrobiologia

A S398m SCHWAB, STEFAN

Marcação fluorescente de bactérias simbióticas e associativas de plantas de interesse agrícola na Embrapa Agrobiologia: transformação genética e plasmídeos / Stefan Schwab, Marcia Soares Vidal, Luc Felicianus Marie Rouws. _ Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2020. 22 p.: (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 313).
ISSN: 1676-6709.

1.1. Transformação genética. 2. Eletroporação. 3. Protocolo. I. Vidal, Márcia Soares. II. Rouws, Luc Felicianus Marie. III. Título. IV. Embrapa Agrobiologia. V. Série.

579.13 - CDD 23. Ed.
CGPE: 16015

Autores

Stefan Schwab

Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, CEP 23891-000, Seropédica, RJ. E-mail: stefan.schwab@embrapa.br.

Marcia Soares Vidal

Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, CEP 23891-000, Seropédica, RJ. E-mail: marcia.vidal@embrapa.br.

Luc Felicianus Marie Rouws

Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, CEP 23891-000, Seropédica, RJ. E-mail: luc.rouws@embrapa.br.

Apresentação

O Programa Nacional de Bioinsumos recentemente lançado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), tem como principal objetivo incentivar o desenvolvimento de insumos para a agropecuária fundamentados na biodiversidade brasileira, reduzindo a dependência de insumos importados. Como consequência, se espera que em breve vários bioinsumos com diferentes propósitos estejam disponíveis para os produtores, sendo desejável alguma avaliação da sua efetividade.

No caso dos inoculantes microbianos que promovem o crescimento vegetal é muito importante verificar se a estirpe bacteriana que compõe o inoculante de fato coloniza as culturas alvo e produz os efeitos benéficos esperados. A metodologia apresentada nesta publicação apresenta um meio de verificar a eficácia da prática de inoculação, sendo esta avaliação uma etapa importante do processo de desenvolvimento de bioinsumos.

A publicação da Série Documentos 3602- "*Marcação fluorescente de bactérias simbióticas e associativas de plantas de interesse agrícola na Embrapa Agrobiologia: transformação genética e plasmídeos*" abre caminho também para posteriores aperfeiçoamentos do método, permitindo que outros grupos bacterianos sejam passíveis de marcação e detecção em diferentes tecidos vegetais.

Boa leitura!

Maria Elizabeth Fernandes Correia
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

Sumário

Introdução	11
Transferência de gene marcador por meio de conjugação	14
Transferência de gene marcador por meio do método de eletroporação ..	16
Resultados	18
Considerações finais	18
Referências	20

Introdução

As plantas estão colonizadas em seus diversos órgãos e tecidos por uma ampla gama de microrganismos, principalmente bactérias e fungos, de modo similar aos animais (incluindo o homem) e, por isso, hoje o conceito de microbioma também é aplicado ao reino vegetal (LUNDBERG et al., 2012; BERG et al., 2014; REINHOLD-HUREK et al., 2015). As bactérias que se associam às plantas podem lhes trazer inúmeros benefícios, que incluem disponibilização de nutrientes (como nitrogênio, fósforo e ferro), antagonismo contra patógenos ou pragas vegetais, participação no balanço hormonal da planta, biorremediação, entre outros, com implicações que vão de práticas agrícolas sustentáveis a serviços ambientais e biotecnológicos. Para a aplicação de bactérias benéficas em sistemas agrícolas, é muito importante uma caracterização prévia das mesmas, sendo o modo e o local de colonização na planta hospedeira um dos aspectos-chaves a serem elucidados.

A aplicação combinada de métodos genéticos e imunológicos moleculares com técnicas de microscopia tem sido uma das estratégias adotadas para estudos *in situ* de bactérias que se associam às plantas (HARTMANN et al., 2015). Dentre os métodos genéticos, aqueles que utilizam oligonucleotídeos complementares à sequência de DNA ou RNA da bactéria, que envolvem hibridização (e.g., hibridização *in situ* fluorescente – FISH) ou amplificação (reação em cadeia por polimerase – PCR – e suas variações), são limitantes por não serem específicos para identificar estirpe, e assim são geralmente incapazes de discernir entre a estirpe da bactéria aplicada/inoculada e bactérias filogeneticamente próximas que estão naturalmente associadas à planta. Em contraste, a estratégia de transformar geneticamente a bactéria utilizando genes marcadores como o gene *gfp* (*green fluorescent protein* ou proteína fluorescente verde) e outros que codificam para proteínas fluorescentes, em associação com o uso da técnica de microscopia confocal de varredura a *laser*, pode ser uma alternativa preferível. Este tipo de microscopia permite detectar fluorescência específica contra um fundo de autofluorescência, o que não é raro em amostras de tecidos vegetais. A transformação genética das bactérias normalmente é realizada utilizando-se um plasmídeo que carrega em sua sequência o gene marcador (RAMOS et al., 2011).

O objetivo deste documento é apresentar metodologias que já foram adotadas na Embrapa Agrobiologia, bem como algumas opções de plasmídeos, para a marcação de bactérias simbióticas e associativas de plantas com o gene *gfp*, e seus derivados e análogos. Basicamente, a transformação genética pode ser realizada por eletroporação ou conjugação, metodologias estas consideradas as mais eficientes, e que serão descritas neste documento. A escolha da metodologia a ser utilizada depende da espécie bacteriana que receberá o plasmídeo, assim como ocorre com a modificação genética da mesma, o que frequentemente pode ser encontrado na literatura. A finalidade deste documento é apresentar de forma generalizada o protocolo ajustado para as bactérias estudadas, relacionadas adiante, ressaltando que cada estirpe bacteriana pode apresentar determinadas peculiaridades que levem à necessidade de adaptações aos procedimentos aqui apresentados. Como etapa preliminar, é primordial conhecer o perfil bacteriano de resistência aos antibióticos que são marcas de seleção dos plasmídeos, conforme procedimento descrito previamente (OLIVEIRA et al., 2009). Os plasmídeos utilizados por nosso grupo de pesquisa para marcação de bactérias (Tabela 1) codificam as proteínas fluorescentes GFP (que emite fluorescência na região verde do espectro visível), mCherry (vermelha), eCFP (ciana), eYFP (amarela) e DsRed (vermelha). A escolha do plasmídeo dependerá de cada microrganismo alvo, como também das características da planta, inclusive o tipo de tecido a ser estudado. Por exemplo, folhas apresentam altos níveis de fluorescência vermelha, devido à presença de clorofila, não sendo recomendável o uso de proteínas vermelhas fluorescentes como a mCherry e a DsRed para a marcação de bactérias quando se busca visualizar sua interação com tecidos contendo clorofila. No que concerne ao microrganismo alvo, existem plasmídeos que podem ser usados em ampla faixa hospedeira, enquanto outros são mais restritos a determinados grupos de bactérias (vide revisão de RAMOS et al., 2011).

Tabela 1. Plasmídeos usados na Embrapa Agrobiologia para a marcação de bactérias por proteínas fluorescentes e outros marcadores.

Plasmídeo*	Principais características	Referência
pLMB426	Gm ^R ; <i>ptac::mCherry, gfpmut3.1</i> sem promotor; <i>mob</i> (conjugável)	PHILIP POOLE, não publicado
pLMB449	Gm ^R ; <i>ptac::gfpmut3.1, mCherry</i> sem promotor; <i>mob</i> (conjugável)	PHILIP POOLE, não publicado
pHC60	Tc ^R ; <i>gfp</i>	(CHENG; WALKER, 1998)
pHRE1-Km	Amp ^R , Km ^R ; <i>gfp</i> e <i>gusA</i> sem promotor; <i>mob</i> (conjugável)	(RAMOS et al., 2002)
pHRGFPGUS	Amp ^R , Km ^R ; <i>gfp, gusA; mob</i> (conjugável)	(RAMOS et al., 2002)
pHRGFPTC	Amp ^R , Tc ^R , Cm ^R ; <i>gfp; mob</i> (conjugável)	(RAMOS et al., 2002)
pPROBE-NT	Km ^R ; <i>gfp</i> sem promotor; <i>mob</i> (conjugável)	(MILLER; LEVEAU; LINDOW, 2000)
pPROBE-NT-pnifH	<i>PnifH::gfp</i> em pPROBE-NT	STEFAN SCHWAB et al., não publicado
pPpDCGFP	PpDC:: <i>gfp</i> em pHRGFPTC	MARCIA VIDAL et al., não publicado
pPpDCmCherry	PpDC::mCherry em pLMB426	MARCIA VIDAL et al., não publicado
pLMB426-pnifH	<i>pnifH::gfp</i> em pLMB426	STEFAN SCHWAB et al., não publicado
pLMB449-pnifH	<i>pnifH::mCherry</i> em pLMB449	STEFAN SCHWAB et al., não publicado
pTnMod-OGm	Gm ^R ; transposon contendo <i>oriR; mob</i> (conjugável)	(DENNIS; ZYLSTRA, 1998)
pTnMod-OGmKmLacZ	Gm ^R , Km ^R ; transposon contendo <i>oriR</i> e <i>lacZ</i> sem promotor; <i>mob</i> (conjugável)	(SCHWAB et al., 2007)
pMP4641	Tc ^R ; <i>ecfp; mob</i> (conjugável)	(BLOEMBERG et al., 2000)
pMP4658	Tc ^R ; <i>eyfp; mob</i> (conjugável)	(BLOEMBERG et al., 2000)
pMP4662	Tc ^R ; <i>DsRed; mob</i> (conjugável)	(BLOEMBERG et al., 2000)

*A disponibilidade para utilização dos plasmídeos descritos acima deve ser consultada diretamente com os autores.

Tabela 1. Plasmídeos usados na Embrapa Agrobiologia para a marcação de bactérias por proteínas fluorescentes e outros marcadores (*continuação*).

Plasmídeo*	Principais características	Referência
pMP220	Tc ^R ; <i>lacZ</i> sem promotor	(SPAINK et al., 1987)
pMP7604	Tc ^R ; <i>Ptac::mCherry</i>	(LAGENDIJK et al., 2010)
pIJ9280	Tc ^R ; <i>rail::lacZ</i> em pMP220 (responde a homo-seril-lactonas)	(WISNIEWSKI-DYE et al., 2002)
pJBA132	Tc ^R ; <i>luxR-PluxR-Plux1-gfp</i> (ASV)-T0-T1	(ANDERSEN et al., 2001)
pAS-C8	Gm ^R ; <i>PcepI-gfp</i> (ASV)- <i>Plac-cepR</i> (responde a homo-seril-lactonas)	(RIEDEL et al., 2001)
pRJPaph-bjGFP	Tc ^R ; pRJPaph-gfp_a1 Paph- <i>bjGFP</i> para integração a jusante do gene <i>scol</i> de <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110.	(LEDERMANN et al., 2015)
pRJPaph-gusA	Tc ^R ; pRJPaph-gfp_a1 Paph- <i>gusA</i> para integração a jusante do gene <i>scol</i> de <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110.	(LEDERMANN et al., 2015)
pRJPaph-mChe	Tc ^R ; pRJPaph-gfp_a1 Paph- <i>mCherry</i> para integração a jusante do gene <i>scol</i> de <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110.	(LEDERMANN et al., 2015)
pMG103- <i>nptII</i> -gfp	Km ^R ; <i>gfp</i>	(BONALDI et al., 2010)
pUTmini-Tn5gfp	Tc ^R ; mini Tn5 <i>gfp</i> sem promotor	(MATTHYSSE et al., 1996)

*A disponibilidade para utilização dos plasmídeos descritos acima deve ser consultada diretamente com os autores.

Transferência de gene marcador por meio de conjugação

Muitos dos plasmídeos disponíveis para marcação de bactérias têm uma origem de transferência, *oriT* ou “*mob*” e, por isso, podem ser mobilizados para bactérias Gram-negativas diversas, utilizando-se proteínas envolvidas

nesse processo codificadas pelos genes *trb* (codificando estruturas e enzimas necessárias à conjugação, como *pilus*, relaxases, etc.) a partir de um plasmídeo auxiliar, como pRK2013. Ou ainda utilizando uma estirpe de *Escherichia coli* carregando essa função em seu cromossomo, tal como a S17-1. No primeiro caso, tem-se uma conjugação triparental (envolvendo uma estirpe de *E. coli* com o plasmídeo auxiliar, uma segunda estirpe de *E. coli* com o plasmídeo a ser transferido, e a estirpe receptora), enquanto o segundo caso refere-se à conjugação biparental (entre a estirpe de *E. coli* doadora e a estirpe receptora). Como rotina em nosso laboratório, opta-se geralmente pelo segundo método, utilizando-se a estirpe S17-1 de *E. coli* como doadora direta do plasmídeo.

A(s) bactéria(s) doadora(s), estirpe(s) de *E. coli*, é(são) cultivada(s) em meio LB (Luria Bertani), enquanto a bactéria receptora é cultivada no meio de sua preferência, ou em um meio rico como DYGS modificado (glicose 2,0 g·L⁻¹, ácido málico 2,0 g·L⁻¹, peptona 1,5 g·L⁻¹, extrato de levedura 2,0 g·L⁻¹, K₂HPO₄ 0,5 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0,5 g·L⁻¹, ácido glutâmico 1,5 g·L⁻¹, pH 6,0) (RÓDRIGUES NETO; MALAVOLTA JR; VICTOR, 1986) muito usado para algumas bactérias associativas de plantas, todas até uma D.O.₆₀₀ ≅ 0,2. As suspensões bacterianas (1 mL) são centrifugadas por 5 min a 3.000 × g, o sobrenadante é descartado, e o sedimento celular é ressuspenso em 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril como etapa de lavagem das células. As suspensões são novamente centrifugadas nas mesmas condições, o sobrenadante descartado, e as células ressuspenso em 1 mL de solução salina. Para que o processo de conjugação ocorra, são misturados em um microtubo estéril: 5 µL da estirpe doadora com 50 µL da estirpe receptora, e esta mescla é inoculada (sem espalhar) sobre uma mistura na proporção 1:3 dos meios LB e o preferencial do microrganismo (e.g., DYGS). Um procedimento semelhante deve ser realizado com controles apropriados: sem doadora, receptora ou ambas, substituindo-se por volumes correspondentes de solução salina.

Após o crescimento à temperatura mais indicada para a estirpe receptora (cerca de 1 dia a 30 °C para *Azospirillum brasilense*, por exemplo), a colônia formada é ressuspenso em 1 mL de solução salina. Para a seleção dos transconjugantes, a suspensão é inoculada sobre o meio preferencial da estirpe receptora (e.g., DYGS) na presença de antibióticos seletivos, levando

em conta que: 1) para a seleção de transconjugantes da estirpe receptora, utiliza-se o(s) antibiótico(s) seletivo(s) do plasmídeo, aplicando-se 3x–4x a concentração mínima inibitória para esta estirpe selvagem (OLIVEIRA et al., 2009); e 2) para inibição do crescimento da(s) estirpe(s) doadora(s) de *E. coli* e seleção da estirpe receptora (com perfil de resistência previamente estabelecido), utiliza-se pelo menos um dos seguintes antibióticos nas concentrações inibitórias para *E. coli*: ampicilina (Amp) 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, tetraciclina (Tc) 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, gentamicina (Gm) 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, canamicina (Km) 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, estreptomicina (Sm) 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ácido nalidíxico (Nal) 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e/ou cloranfenicol (Cm) 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A combinação dos antibióticos garante, em princípio, a seleção exclusiva de transconjugantes da estirpe receptora, o que pode ser corroborado pela ausência de crescimento nos controles, à temperatura ótima para a estirpe receptora.

Transferência de gene marcador por meio do método de eletroporação

A segunda estratégia rotineiramente utilizada para a transferência do gene marcador para a estirpe bacteriana em estudo envolve o processo de eletroporação, através do qual um campo elétrico é aplicado para aumentar a permeabilidade do envoltório celular, permitindo eventualmente a incorporação do plasmídeo, como já foi realizado na Embrapa Agrobiologia para a estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (ROUWS; HEMERLY; BALDANI, 2006) e algumas outras estirpes bacterianas. Como primeira etapa, procede-se ao preparo das células eletrocompetentes. Para tal, a bactéria pode ser cultivada em 100 mL de meio de cultura apropriado até uma D.O.₆₀₀ \cong 0,6. A suspensão é incubada em banho de gelo por 30 min, e todo o procedimento restante é conduzido em gelo ou a 4 °C, condição esta essencial para se atingir altos níveis de competência da célula para a transformação. A suspensão bacteriana é então centrifugada a 4 °C, 10 min, 3.000 \times g, o sobrenadante é descartado, e o sedimento celular é ressuspensionado em 30–100 mL de água ultrapura estéril gelada para lavagem das células. A suspensão celular é submetida a mais um ciclo idêntico de centrifugação, é feito o descarte do sobrenadante e a ressuspensão das células em água, seguido de um ciclo adicional de centrifugação e descarte do sobrenadante. Nesta etapa, o sedimento celular é ressuspensionado em 30–100 mL de uma solução estéril

gelada de glicerol a 10%. A suspensão bacteriana é centrifugada a 4 °C, 25 min, 3.000 × g, o sobrenadante é descartado, e o sedimento celular é ressuspenso em ~1 mL da solução de glicerol. São preparadas alíquotas desta suspensão, de 20–100 µL em microtubos, e estas são armazenadas a –70 °C até o procedimento de eletroporação.

Para o procedimento de eletroporação propriamente dito, de 1 a 2 µL de solução aquosa concentrada do plasmídeo, na concentração de 50 ng a 1–2 µg/µL de DNA plasmidial, são adicionados à alíquota de células eletrocompetentes em banho de gelo. À parte, o uso de um controle sem DNA plasmidial é recomendável. O eletroporador Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad) conta com nove protocolos de eletroporação pré-programados e estabelecidos para diversas espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que podem variar nos parâmetros capacitância (25 ou 50 µF), resistência do módulo PC (100, 200 ou 400 Ω), voltagem do pulso (1 a 3 kV), cavidade da cubeta (0,1 ou 0,2 cm) e volume da alíquota celular (20 a 200 µL), sendo que alguns destes protocolos foram aplicados com sucesso em algumas das espécies bacterianas transformadas na Embrapa Agrobiologia. Normalmente, o protocolo de eletroporação é escolhido baseando-se na proximidade filogenética da espécie para o qual está estabelecido; por exemplo, sendo a *Serratia* sp. M24T3 uma enterobactéria, para sua transformação foi utilizado um dos protocolos pré-programados para eletroporação de *E. coli*, também uma enterobactéria, assim como para as estirpes de *Rhizobium* spp. foi utilizado o protocolo pré-programado para *Agrobacterium tumefaciens*; no entanto, o uso também de dados da literatura para a escolha dos parâmetros de eletroporação não está descartado (VANDE BROEK; VAN GOOL; VANDERLEYDEN, 1989; SANT'ANNA et al., 2011). A mistura células-plasmídeo é transferida para uma cubeta de eletroporação Gene Pulser® Cuvette (Bio-Rad), com cavidade de 0,1 cm (cód. 165-2089) ou 0,2 cm (cód. 165-2086), também em banho de gelo. A cubeta é transferida rapidamente para o eletroporador, e o pulso elétrico é aplicado. Após o pulso elétrico, a mistura de células e plasmídeo é transferida para 1 mL do meio de cultura para a estirpe receptora, e as células são incubadas por 1–2 h, sob rotação e temperatura mais indicados para essa estirpe.

Finalmente, a suspensão bacteriana é inoculada sobre o meio mais apropriado na presença de 3x–4x a concentração mínima inibitória, para esta estirpe, do(s) antibiótico(s) (OLIVEIRA et al., 2009) marca(s) de seleção do

plasmídeo. O sistema é incubado à temperatura ótima para a estirpe receptora até o aparecimento das colônias dos transformantes, em comparação com o controle sem DNA plasmidial, que não deve resultar na formação de colônias.

Resultados

Alguns exemplos bem-sucedidos de bactérias transformadas através de ambas as estratégias apresentadas, conjugação e eletroporação, estão relacionados na Tabela 2. A marcação das bactérias relacionadas tem permitido a realização de estudos de interação com suas plantas hospedeiras após inoculação, através do emprego de técnicas de microscopia de fluorescência.

Considerações finais

A principal vantagem da aplicação de estirpes marcadas com fluorescência para estudos de colonização bacteriana é que não é necessária a fixação da amostra biológica nem outros tratamentos que consomem tempo e que podem produzir artefatos na amostra. As limitações, no entanto, são ocasionalmente provenientes da dificuldade ou mesmo da impossibilidade de introduzir o gene marcador ou de expressar o gene marcador na célula alvo a um nível minimamente detectável. Portanto, metodologias utilizando diferentes vetores, construções ou variantes dos genes marcadores devem ser testadas até a otimização do melhor protocolo de transformação para a bactéria receptora com a qual se deseja trabalhar. Ainda assim, o sucesso não é garantido: um exemplo de insucesso foi a bactéria *Microvirga vignae* estirpe BR3299, que se mostrou extremamente sensível aos antibióticos usados como marcas de seleção dos plasmídeos disponíveis (e que por esta razão inviabilizou a estratégia da conjugação como marcação), além de se mostrar recalcitrante à eletroporação com diversos plasmídeos.

Deve-se notar que as bactérias resultantes são geneticamente modificadas e, portanto, devem ser utilizadas em condições controladas pelas normas vigentes, com as devidas autorizações previstas pela lei nos ambientes controlados, como laboratórios e casas-de-vegetação. E estes devem portar o Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB), autorização oficial concedida pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio.

Tabela 2. Bactérias marcadas com proteínas autofluorescentes na Embrapa Agrobiologia para estudos de colonização em planta hospedeira.

Espécie	Estirpe	Plasmídeo (marcação)	Referência
Estratégia: eletroporação			
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	PAL5 (BR11281)	pHRGFPGUS (GFP; GusA); pHRGFPTC (GFP) pPpDCGFP (GFP); pPpDCmCherry (mCherry)	(ROUWS et al., 2010) (NEVES, 2017)
	3R2 (BR11509)	pMP4641 (eCFP); pMP4662 (DsRed)	STEFAN SCHWAB et al., não publicado
<i>Serratia</i> sp.	M24T3	pHRGFPGUS (GFP; GusA)	(PROENÇA et al., 2019)
<i>Rhizobium altiplani</i>	BR10423 ^T	pHRGFPGUS (GFP; GusA)	(BARAÚNA et al., 2016)
<i>Rhizobium</i> sp.	P5-2 (BR10268)	pLMB426 (mCherry)	(FERREIRA et al., 2020)
<i>Rhizobium tropici</i>	SEMIA4038 (= BR322 = CIAT899)	pLMB426 (mCherry)	LUC ROUWS et al., não publicado
Estratégia: conjugação			
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	CBAmC (BR11145)	pHRGFPGUS (GFP; GusA); pPROBE-NT-pnifH (GFP)	LEONARDO TERRA et al., não publicado
<i>Azospirillum brasilense</i>	Sp245 (BR11005)	pLMB449 (GFP)	JULIANA MENEZES et al., não publicado
<i>Azospirillum</i> sp.	36	pHRGFPGUS (GFP; GusA)	ISABEL ALVES et al., não publicado

Referências bibliográficas

- ANDERSEN, J.B.; HEYDORN, A.; HENTZER, M.; EBERL, L.; GEISENBERGER, O.; CHRISTENSEN, B. B.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. gfp-based N-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 575-585, 2001.
- BARAÚNA, A. C.; ROUWS, L. F. M.; ARAUJO, J. L. S. de; REIS JUNIOR, F. B. dos; IANNETTA, P. P. M.; MALUK, M.; GOI, S. R.; REIS, V. M.; JAMES, E. K.; ZILLI, J. E. *Rhizobium altiplani* sp. nov., isolated from effective nodules on *Mimosa pudica* growing in untypically alkaline soil in central Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 1-7, 2016.
- BERG, G. GRUBE, M.; SCHLOTTER, M.; SMALLA, K. Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 148, 2014.
- BLOEMBERG, G. V.; WIJFES, A. H.; LAMERS, G. E.; STUURMAN, N.; LUGTENBERG, B. J. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 11, p. 1170-1176, 2000.
- BONALDI, K.; GHERBI, H.; FRANCHE, C.; BASTIEN, G.; FARDOUX, J.; BARKER, D.; GIRAUD, E.; CARTIEAUX, F. The Nod factor-independent symbiotic signaling pathway: development of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation for the legume *Aeschynomene indica*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 23, n. 12, p. 1537-1544, 2010.
- CHENG, H.-P.; WALKER, G. C. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 19, p. 5183-5191, 1998.
- DENNIS, J. J.; ZYLSTRA, G. J. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 7, p. 2710-2715, 1998.
- FERREIRA, N. S.; MATOS, G. F.; MENESES, C. H. G. de; REIS, V. M.; ROUWS, J. R. C.; SCHWAB, S.; BALDANI, J. I.; ROUWS, L. F. M. Interaction of phytohormone-producing rhizobia with sugarcane mini-sets and their effect on plant development **Plant and Soil**, Published online, 3 January, 2020.
- HARTMANN, A.; JAMES, E. K.; BRUIJN, F. J. de; SCHWAB, S.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M. In situ localization and strain-specific quantification of *Azospirillum* and other diazotrophic plant growth promoting bacteria using antibodies and molecular probes. In: CASSÁN, F. D.; OKON, Y.; CREUS, C. M. (Ed.) **Handbook for Azospirillum**: technical issues and protocols. Heidelberg: Springer, 2015 p. 45-64.
- LAGENDIJK, E. L.; VALIDOV, S.; LAMERS, G. E. M.; WEERT, S.; BLOEMBERG, G. V. Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. **FEMS Microbiology Letters**, v. 305, n. 1, p. 81-90, 2010.

LEDERMANN, R.; BARTSCH, I.; REMUS-EMSERMANN, M. N.; VORHOLT, J. A.; FISCHER, H-M. Stable fluorescent and enzymatic tagging of *Bradyrhizobium diazoefficiens* to analyze host-plant infection and colonization. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 9, p. 959–967, 2015.

LUNDBERG, D. S.; LEBEIS, S. L.; PAREDES, Sur H.; YOURSTONE, S.; GEHRING, J.; MALFATTI, S.; TREMBLAY, J.; ENGELBREKTSON, A.; KUNIN, V. GLAVINA DEL RIO T.; EDGAR, R. C.; EICKHORST, T.; LEY, R. E.; HUGENHOLTZ, P.; TRINGE, S. G.; DANGL, L. J. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 86-90, 2012.

MATTHYSSE, A. G.; STRETTON, S.; DANDIE, C.; MCCLURE, N. C.; GOODMAN, A. E. Construction of GFP vectors for use in Gram-negative bacteria other than *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, n. 1, p. 87-94, 1996.

MILLER, W. G.; LEVEAU, J. H. J.; LINDOW, S. E. Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 11, p. 1243-1250, 2000.

NEVES, B. R. F. **Análise do efeito do exopolissacarídeo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) sobre o processo de colonização e estabelecimento de bactéria diazotrófica em cana-de-açúcar.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

OLIVEIRA, T. de F.; FERREIRA, J. S.; BOA SORTE, P. M. F.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; SCHWAB, S. **Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 17 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 49).

PROENÇA, D. N.; SCHWAB, S.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I.; XAVIER, G. R.; MORAIES, P. V. The nematicide *Serratia plymuthica* M24T3 colonizes *Arabidopsis thaliana*, stimulates plant growth, and presents plant beneficial potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 777-789, 2019.

RAMOS, H. J. O.; RONCATO-MACCARI, L.D.B.; SOUZA, E. M.; SOARES-RAMOS, J.R.L.; HUNGRIA, M.; PEDROSA, F. O. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the gfp and gusA genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. **Journal of Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 243-252, Aug. 2002.

RAMOS, H. J. O. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; FÁBIO; SOUZA, E. M. Strategies for bacterial tagging and gene expression in plant-host colonization studies. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 8, p. 1626–1638, 2011.

REINHOLD-HUREK, B. BUNGER, W.; BURBANO, C. S.; SABAILE, M.; HUREK, T. Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 403–424, 2015.

RIEDEL, K.; HENTZERM.; GEISENBERGER, O.; HUBER, B.; STEIDLE, A.; WU, H.; HOIBY, N.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S. N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. **Microbiology**, v. 147, n. 12, p. 3249-3262, 2001.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 12, n. 1-2, p. 32, 1986.

ROUWS, L. F. M.; MENESES, C. Henrique. S. Gadelha; GUEDES, H. V.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I.; SCHWAB, S. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with gfp and gusA reporter genes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 325-330, 2010.

ROUWS, L. F. M.; HEMERLY, A. S.; BALDANI, J. I. **Transformação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL 5 pela técnica de eletroporação**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. 4 p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico, 84).

SANT'ANNA, F. A. D.; ANDRADE, D. S.; TRENTINI, D. B.; WEBER, S. S.; SCHRANK, I. S. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 107, 2011.

SCHWAB, S.; RAMOS, H. J; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; MARSHALL, E.; YATES Humberto J. Ramos/ÆEmanuel M. Souza/ÆFábio O. Pedrosa; YATES, M. G.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U. Identification of NH₄⁺-regulated genes of *Herbaspirillum seropedicae* by random insertional mutagenesis. **Archives of Microbiology**, v. 187, n. 5, p. 379-386, 2007.

SPAINK, H. P.; OKKER, R. J. H.; WIJFFELMAN, C. A.; PEES, E.; LUGTENBERG, B. J. J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. **Plant Molecular Biology**, v. 9, n. 1, p. 27-39, 1987.

VANDE BROEK, A.; VAN GOOL, A.; VANDERLEYDEN, J. Electroporation of *Azospirillum brasilense* with plasmid DNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 61, n. 1-2, p. 177-181, 1989.

WISNIEWSKI-DYE, F.; JONES, J.; CHHABRA, S. R.; DOWNIE, J. A. railR genes are part of a quorum-sensing network controlled by cinI and cinR in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 6, p. 1597-1606, 2002.

Embrapa

Agrobiologia

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL