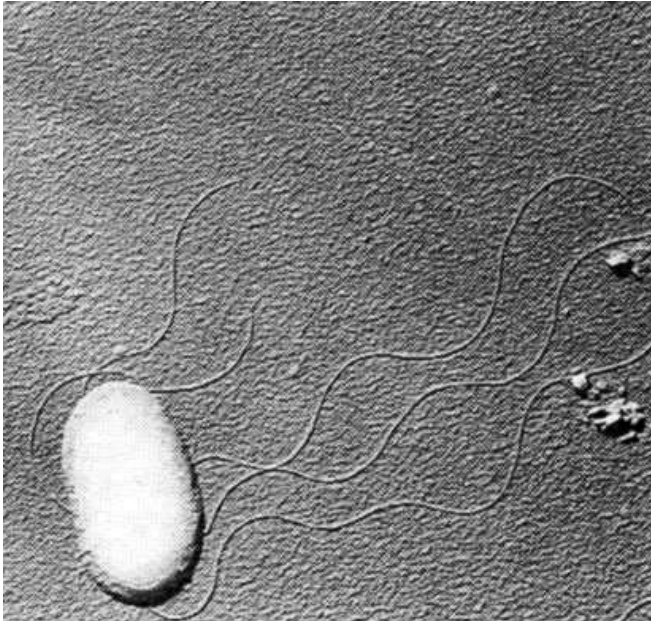


Foto: Arquivo Embrapa Agrobiologia



Mutagênese insercional da estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* por transposição *in vitro*

Luc Felicianus Marie Rouws¹
Adriana Silva Hemerly²
José Ivo Baldani³

Introdução

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria aeróbica, Gram-negativa, originalmente isolada do interior de raízes, colmos e folhas da cana-de-açúcar (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988; GILLIS et al., 1989). *G. diazotrophicus* também já foi encontrada em batata doce (*Ipomoea batatas*), capim colônio (*Pennisetum purpureum*), café (*Coffea arabica*) e abacaxi (*Ananas comosus*) (BALDANI e BALDANI, 2005). A estirpe PAL5 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 também envolvidos (SEVILLA et al., 2001; BASTIAN et al., 1998). O sequenciamento completo e a anotação funcional do genoma da estirpe PAL5 da bactéria *G. diazotrophicus* foram recentemente finalizados em um projeto da rede Riogene, no qual a Embrapa Agrobiologia é uma das instituições parceiras. A sequência está disponível no GenBank (NC_010123, NC_010124 e NC_010125). As informações genéticas

geradas pelo sequenciamento deram um impulso no entendimento sobre os processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos no efeito positivo da bactéria sobre o crescimento da cana-de-açúcar.

Atualmente, o conhecimento do genoma está sendo usado para estudos de laboratório com o objetivo de otimizar os efeitos positivos desta interação. Neste sentido, a mutagênese é uma ferramenta poderosa para esclarecer a função de genes de interesse. Um protocolo eficiente de transformação genética pela técnica de eletroporação foi estabelecido na Embrapa Agrobiologia (ROUWS et al., 2006). Também foi publicado um sistema eficiente de mutagênese aleatória de *G. diazotrophicus* por transposon (ROUWS et al., 2008). Esta metodologia já foi utilizada para a geração de mutantes com defeitos em motilidade (ROUWS et al., 2008), síntese de ácido indol acético (RODRIGUES, 2008) e fixação de nitrogênio (GUEDES et al., 2008).

¹ Bolsista de Pós-Doutorado Embrapa Agrobiologia/FAPERJ.

² Professora do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico/IBqM/UFRJ.

³ Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 7, Seropédica, RJ. E-mail: ibaldani@cnpab.embrapa.br.

Uma outra estratégia de mutagênese que é muito utilizada nos estudos genéticos de microrganismos, e que se distingue da mutagênese aleatória, é a mutagênese insercional que possibilita a interrupção de um gene de interesse previamente selecionado (MILLS, 2001). Neste caso, inicialmente o gene alvo é clonado em um plasmídeo vetor. Em seguida, o gene alvo pode ser desativado *in vitro* pela inserção de um gene marcador, como por exemplo de resistência a antibiótico. Uma ferramenta simples para realizar esta inserção consiste no uso do transposon comercial *EZ::Tn5 <kan-2> transposon insertion kit* (Epicentre). O plasmídeo contendo o gene mutante é transferido para o organismo alvo, onde poderá ocorrer recombinação homóloga dupla, inserindo o marcador no locus de interesse e desativando o gene alvo.

O presente trabalho mostra a utilidade da técnica de mutagênese insercional para a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*, usando o transposon comercial *EZ::Tn5 <kan-2> transposon insertion kit* (Epicentre, número de catálogo EZI982K). Para avaliar a utilidade desta estratégia, a técnica foi aplicada ao gene *Gd luxI* (GenBank YP_001603070), envolvido em monitoramento populacional ou *quorum sensing*, e que foi identificado no genoma da estirpe PAL5 (ROUWS, 2008). Esta técnica de mutagênese insercional não se restringe a este gene e pode ser aplicada a outros genes da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*.

Construção e seleção do plasmídeo mutagênico pB1TN17

Bibliotecas de DNA do tipo *shotgun*, formadas por clones de *Escherichia coli* contendo plasmídios derivados do vetor pUC18 (que codifica resistência ao antibiótico amapicilina) com insertos provenientes do DNA genômico da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*, foram usadas para identificar clones contendo plasmídios carregando o gene *Gd luxI*. Selecionou-se um clone contendo um plasmídeo que neste trabalho foi designado de pB1. O plasmídeo pB1 foi mutado *in vitro* usando o kit comercial *EZ::Tn5 <kan-2> transposon insertion kit* (Epicentre) (Fig. 1).

Este kit contém separadamente o transposon artificial *EZ::Tn5 <kan-2> transposon* que codifica o gene *kan-2*, fornecendo resistência ao antibiótico canamicina, e a enzima *EZ::Tn5 transposase* que é necessária para a reação de transposição. A reação foi

realizada em um volume de 10 µl contendo os seguintes componentes: 280 ng DNA pB1; 0,7 pmol *EZ::Tn5 <kan-2> transposon*; 1 U *EZ::Tn5 transposase*; H₂O q.s.p 10 µl. Esta mistura foi incubada durante 2 horas a 37°C. Em seguida a reação foi terminada pela adição de 1 µl de *EZ::Tn5 10x stop solution* e a incubação por 10 min a 70°C.

Células da estirpe DH10B de *E. coli* foram transformadas com 1 µl do produto de reação de transposição pela técnica de eletroporação e selecionadas em placas com meio de cultura LB contendo os antibiótico canamicina (50 µg/ml) e ampicilina (100 µg/ml). Desta forma, 32 transformantes com dupla resistência devido à presença do plasmídeo pB2 (resistência à ampicilina) contendo uma inserção do *EZ::Tn5 <kan-2> transposon* (resistência à canamicina) foram obtidos.

O DNA plasmídial de *E. coli* foi preparado por lise alcalina como descrito (SAMBROOK et al., 1989). O DNA plasmídial foi submetido a uma digestão com enzima *EcoRV* (Invitrogen), conforme recomendado pelo fabricante. Para 7 plasmídeos foi observado o padrão de restrição esperado para uma inserção do transposon no fragmento *EcoRV* englobando a região de *Gd luxI* (Fig. 1 e 2a).

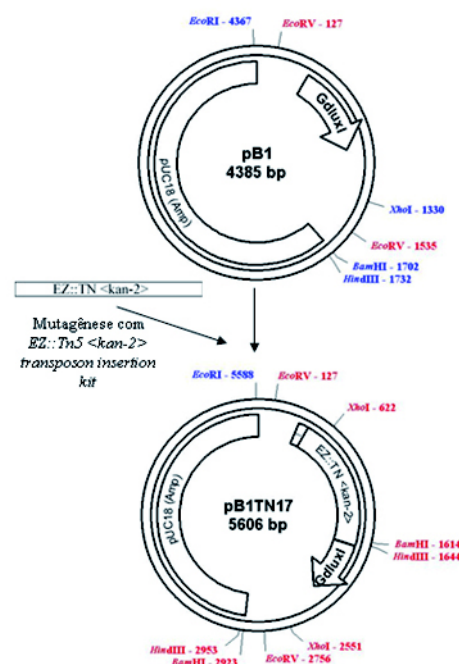


Fig. 1. Representação esquemática da mutagênese do plasmídeo pB1 usando o *EZ::Tn5 <kan-2> transposon insertion kit*.

O sequenciamento do DNA destes 7 plasmídeos foi realizado com os primers FP-1 (ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC) e RP-1 (GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG), que são fornecidos com o *EZ::Tn5 <kan-2> Transposon Insertion Kit* e que se anelam nas pontas do transposon, possibilitando o sequenciamento do DNA que flanqueia o mesmo, desta forma revelando o sítio exato de inserção do transposon. Reações de sequenciamento foram realizados usando um termociclador e o *DYEnamic ET dye terminator kit* (GE healthcare, número de catálogo US81090) em volume total de 10 µl com a seguinte composição: 100-300 ng de DNA plasmidial; 0,5 µM primer (RP-1 ou FP-1); 4 µl de pré-mix de sequenciamento; H₂O q.s.p. 10 µl. A sequência de base foi determinada em um sequenciador MegaBace 1000 (GE Healthcare). Em 6 plasmídeos, o transposon se inseriu fora do gene *Gd luxI*, mas foi identificado um plasmídeo com a inserção dentro do gene *Gd luxI*, próximo ao término 5' (Fig. 2b). Este plasmídeo foi designado de pB1TN17 e em seguida usado para a mutagênese insercional do gene *Gd luxI* da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* (Fig. 1 e 3).

Mutagênese do gene *Gd luxI* na estirpe PAL5 pela eletroporação com o plasmídeo mutante pB1TN17

A estratégia de mutagênese utilizada neste estudo visou a substituição do gene *Gd luxI* selvagem pelo gene mutante, contendo a inserção do transposon, presente no plasmídeo pB1TN17 (Fig. 3). A falta de sucesso de transferir plasmídeos derivados de pUC18 (família pMB1) para *G. diazotrophicus* PAL5 sugere que a origem de replicação não é compatível com *G. diazotrophicus* (não mostrado). Por isso, o DNA fornecido em plasmídeos derivados de pUC18 só pode ser mantido se o mesmo se integrar em uma unidade de replicação, como o cromossomo por exemplo. Por causa desta característica, o plasmídeo pB1TN17 pôde ser usado como plasmídeo "suicida" em *G. diazotrophicus*.

Células de *G. diazotrophicus* PAL5 foram transformadas com aproximadamente 100 ng de DNA do plasmídeo pB1TN17 conforme descrito (ROUWS et al., 2006). Após 3 dias de incubação em placas contendo 200 µg/ml do antibiótico canamicina, 32 colônias foram observadas, sugerindo a ocorrência da integração do transposon do plasmídeo pB1TN17 no genoma. As colônias foram transferidas para placas

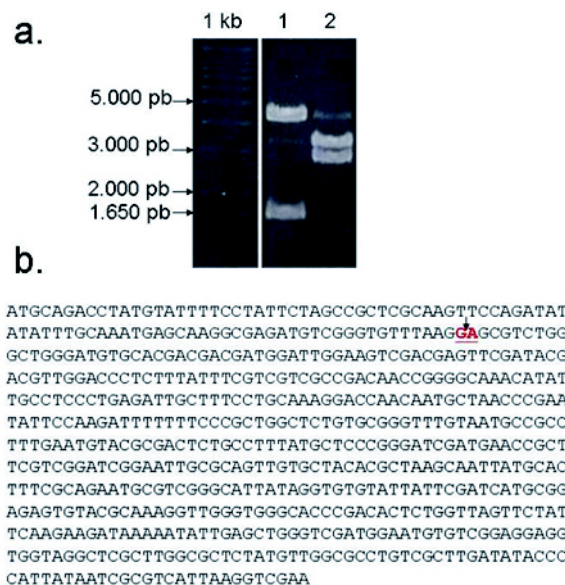


Fig. 2. Seleção do plasmídeo pB1TN17 com uma inserção do elemento *EZ::Tn5* dentro do gene *Gd luxI*. a) Padrão de restrição com enzima *EcoRV* desejado (linha 2) e não desejado (linha 1). b.) Sequência da ORF de *Gd luxI*, mostrando o sítio de inserção (entre as bases em vermelho) do *EZ::Tn5 <kan-2> transposon* em um dos 7 plasmídeos analisados.

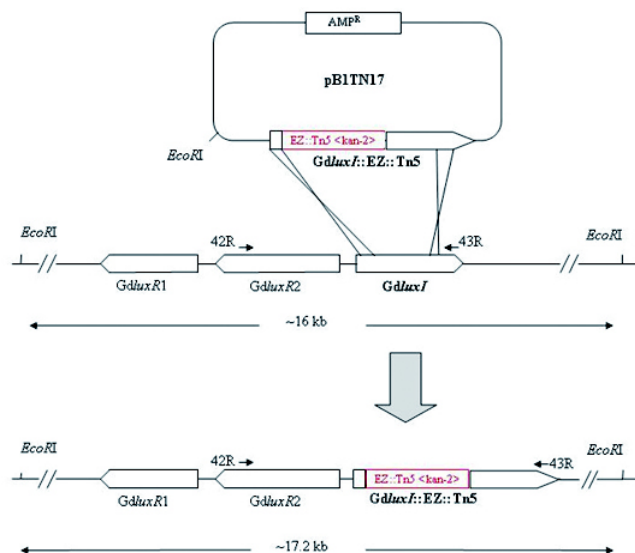


Fig. 3. Representação esquemática da recombinação dupla desejada para a mutagênese de *Gd luxI* usando o plasmídeo mutagênico pB1TN17. A Fig. mostra como a recombinação dupla entre o DNA genômico e o plasmídeo pB1TN17 provoca a troca do locus original (*Gd luxI*) pelo locus mutante (*Gd luxI::EZ::Tn5*). Os sítios da enzima de restrição *EcoRI*, usada no experimento de *Southern blot*, como também os sítios de anelamento dos primers 42R e 43R usados no experimentos de PCR estão indicados.

contendo 200 µg/ml de canamicina e 400 µg/ml de ampicilina para distinguir os mutantes com inserções ocorridas através de recombinação simples ou dupla (Fig. 3). Vinte e nove mutantes cresceram na presença tanto de canamicina como de ampicilina, sugerindo que ocorreu recombinação simples, sendo que este tipo de evento causa a integração completa do plasmídeo, inclusive o gene de resistência a ampicilina. Os três mutantes restantes, no entanto, apresentaram sensibilidade à ampicilina, sugerindo que ocorreu a substituição do gene *Gd luxI* selvagem pelo gene interrompido por meio de recombinação dupla, proporcionando a eliminação do plasmídeo vetor inclusive o gene de resistência à ampicilina (Fig. 3). Estes mutantes, designados de mut17-1, mut17-4 e mut17-5, junto com outros três provavelmente gerados por recombinação simples, e designados mut17-2, mut17-3 e mut17-6, foram submetidos a análises moleculares.

Análise molecular dos mutantes por *Southern blot*

Para verificar a ocorrência de recombinação dupla e a inserção do transposon no local desejado, experimentos de *Southern blot* foram realizados com DNA dos mutantes mut17-1 a mut17-6. A sonda consistiu em um fragmento do gene *Gd luxI* que foi obtido do plasmídeo pB1 pela digestão com a enzima de restrição *EcoRV* (Fig. 1). Após a separação em gel de agarose, o fragmento referente ao gene *Gd luxI* foi selecionado e purificado usando o kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega, número de catálogo A9281). Cerca de 25 ng da sonda foram marcadas radioativamente com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, durante três horas, a temperatura ambiente, usando o kit random primers DNA labelling system (Invitrogen, número de catálogo 18187013), conforme recomendações do fabricante.

Alíquotas de 500 ng de DNA genômico isolado dos mutantes foram digeridas com a enzima de restrição *EcoRI* conforme recomendado pelo fabricante e separado em gel de agarose a 0,7%. O gel foi incubado primeiramente em solução de desnaturação e, em seguida, em tampão de neutralização conforme descrito (SAMBROOK et al., 1989). Durante a noite, o DNA foi transferido para filtro de nylon Hybond-N (GE Healthcare) pelo método de transferência capilar (SAMBROOK et al., 1989) com solução de 10 x SSC.

O DNA foi fixado nos filtros por incubação em forno a 80°C por 1 hora. Os filtros foram pré-hibridizados em Modified Church Buffer (MCB) durante 1 hora a 65°C, a sonda foi desnaturada a 100°C durante 5 min e adicionada ao tampão de pré-hibridação e a hibridação foi realizada durante a noite. Os filtros foram lavados 4 vezes por 20 min com uma solução de 0,1% SDS e 1 x SSC, revelados e depois expostos em filmes MXG (Kodak) para a visualização.

Os resultados confirmaram a ocorrência da troca do locus original pelo locus mutante pela recombinação dupla nos mutantes mut17-1, mut17-4 e mut17-5

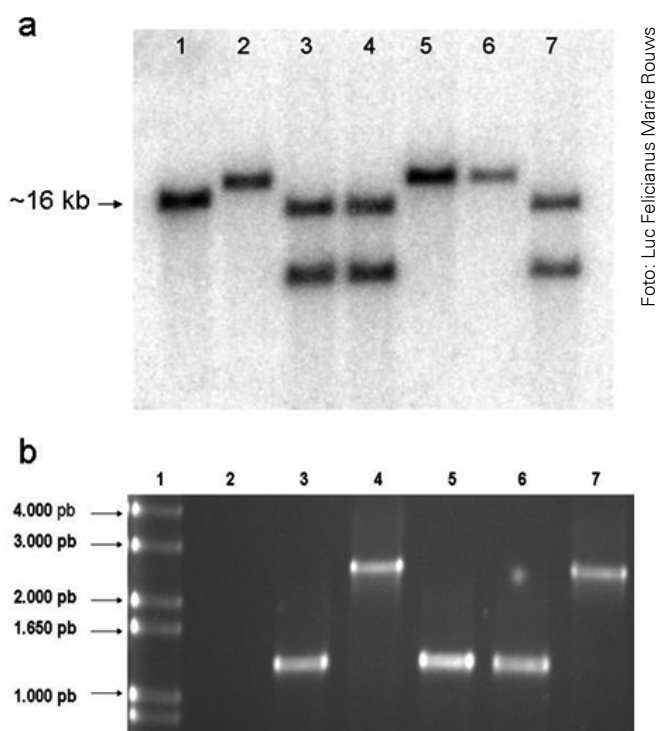


Fig. 4. Análise molecular de mutantes da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* com inserção do transposon no gene *Gd luxI*. **a)** Perfil de hibridização por *Southern blot* realizado com DNA de PAL5 selvagem (linha 1), dos três mutantes gerados pelo mecanismo de recombinação dupla, mut17-1, mut17-4 e mut17-5 (linhas 2, 5 e 6 respectivamente) e de três mutantes gerados por recombinação simples, mut17-2, mut17-3 e mut17-6 (linhas 3, 4 e 7 respectivamente). **b)** Perfil de amplificação por PCR do DNA total da estirpe selvagem PAL5 (linha 3), de dois mutantes gerados por recombinação dupla, mut17-1 e mut17-4 (linhas 4 e 7 respectivamente) e de dois mutantes gerados por recombinação simples, mut17-2 e mut17-3 (linhas 5 e 6 respectivamente) utilizando os primers 42R e 43R flanqueando o gene *Gd luxI*. O controle negativo foi uma reação de PCR sem DNA (linha 2); Linha 1: 1 Kb plus DNA ladder (Promega).

(Fig. 4a). Observa-se que, nestes mutantes, o fragmento *EcoRI* no qual o gene *Gd luxI* está localizado, se apresenta maior de que na estirpe selvagem PAL5. Da mesma forma, o padrão de bandas observado para os mutantes mut17-2, mut17-3 e mut17-6 correspondeu com a ocorrência de recombinação simples e a consequente integração do vetor pB1TN17 no genoma. Neste caso, duas bandas menores são observadas, explicadas pela presença de um sítio de restrição *EcoRI* no plasmídeo pB1TN17 que se integrou inteiramente no locus de *Gd luxI* (Fig. 4a).

Análise molecular dos mutantes por PCR

Análise por PCR foi realizada para verificar o resultado dos experimentos de *Southern blot*. PCR foi realizado com DNA total isolado da estirpe selvagem PAL5 e dos mutantes usando Taq DNA polimerase (Invitrogen, número de catálogo 10342). Usando os oligonucleotídeos 42R (CGCGTTTTGGCAAGTATCTA) e 43R (CTCTCCGCATGATCGAATAA), que flanqueiam o gene *Gd luxI* no genoma (Fig. 3), esperava-se obter um produto de PCR maior para os mutantes com inserção do transposon, do que para estirpes contendo o gene selvagem. A mistura de reação, com volume total de 50 µl, teve a seguinte composição: 50 ng de DNA; 5 µl de tampão *Taq*; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTPs; 0,2 µM primer 42R; 0,2 µM primer 43R; 1 U polimerase *Taq*; H₂O q.s.p. 50 µl. As reações foram realizadas em um termociclador com o seguinte programa de temperaturas: 93°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 93°C por 45 seg, 50°C por 45 seg e 72°C por 2 min. A extensão final ocorreu a 72°C por 10 min.

De fato, foi observado um produto de aproximadamente 1250 pb na estirpe selvagem PAL5 não transformada e em dois transformantes com recombinação simples, que mantiveram uma cópia intacta do gene *Gd luxI* nos seus genomas além da cópia mutante (Fig. 4b). A ausência de um produto de PCR referente à cópia mutante nestes transformantes deve-se provavelmente ao fato que o gene mutante é maior, privilegiando a amplificação do fragmento selvagem. Em contraste, os mutantes gerados pela recombinação dupla apresentaram bandas com tamanho maior (aproximadamente 2500 pb), o que corresponde com a inserção do transposon (Fig. 4b). Este dado confirma a ocorrência da recombinação dupla nestes mutantes. Atualmente, os mutantes no

gene *Gd luxI* estão sendo usados na investigação do papel de monitoramento populacional na estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*.

Conclusão

Este trabalho mostra a viabilidade de um método de mutagênese insercional, usando o transposon comercial *EZ::Tn5 <kan-2> transposon insertion kit*. O gene de monitoramento populacional *Gd luxI* foi inativado *in vitro* pela inserção deste transposon e então transferido para células da estirpe PAL5. O perfil de resistência a antibióticos possibilitou a seleção de mutantes gerados pelo mecanismo molecular de recombinação dupla e o sucesso da mutagênese foi confirmado por ensaios moleculares de *Southern blot* e de PCR. O presente método de mutagênese também já foi aplicado a outros genes, que foram amplificados por PCR e clonados em vetor de clonagem. Portanto, a técnica de mutagênese descrita aqui oferece uma ferramenta rápida e eficiente para a introdução de mutações em genes alvos no genoma da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*.

Referências Bibliográficas

- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An Bras Acad Ciênc**, 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 Regul**, Dordrecht, v. 24, p. 7-11, 1998.
- CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant 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. **Int. J. Syst. Bact.**, Reading, UK, v. 39, p. 361-364, 1989.

GUEDES, H. V.; ROUWS, L. F. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 strain: selection and characterization of mutants deficient in nitrogen-fixation ability. In: DAKORA, F. D. et al. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation: Towards Poverty Alleviation through Sustainable Agriculture**. Heidelberg: Springer, 2008. (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 42)

MILLS, D. A. Mutagenesis in the post genomics era: tools for generating insertional mutations in the lactic acid bacteria. **Curr Opin Biotechnol**, Oxford, UK, v. 12, p. 503-509, 2001.

RODRIGUES, E. P. **Isolamento e caracterização de mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* defectivos na produção de auxinas**. Rio de Janeiro, 2008. 142 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

ROUWS, L. F. M. **Mutagênese de transposon como ferramenta nos estudos fisiológicos e ecológicos da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus***. Rio de Janeiro, 2008. Tese. (Doutorado em Química Biológica) - Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro,

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

ROUWS, L. F. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; HEMERLY, A. S.; BALDANI, J. I. Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. **Arch Microbiol**, New york, v. 189, p. 397-405, 2008.

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 15N_2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and mutant strains. **Mol Plant Micr Interact**, Saint Paul, v. 14, p. 358-366, 2001.

Comunicado Técnico, 116

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agrobiologia
Endereço: BR465, km7 - Caixa Postal 74505
CEP 23851-970 - Seropédica/RJ, Brasil
Fone: (21) 3441-1500
Fax: (21) 2682-1230
Home page: www.cnpab.embrapa.br
E-mail: sac@cnpab.embrapa.br
1ª edição

1ª impressão (2009): 50 exemplares



Comitê de Publicações

Presidente: Norma Gouvêa Rumjanek
Secretária-Executiva: Carmelita do Espírito Santo
Membros: Bruno José Rodrigues Alves, Ednaldo da Silva Araújo, Guilherme Montandon Chaer, José Ivo Baldani, Luis Henrique de Barros Soares.

Expediente

Revisão de texto: Stefan Schwab e Jean Luiz Simões de Araújo
Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo
Tratamento das ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa
Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia