

APLICAÇÃO DE GENES MARCADORES EM ESTUDOS DE ECOLOGIA MICROBIANA COM ÊNFASE NO SISTEMA GUS

APPLICATIONS OF MARKERS GENES ON ECOLOGIC MICROBIAL STUDIES WITH ENPHASIS ON GUS SYSTEM

Fábio Martins Mercante¹ Norma Gouvêa Rumjanek² Avílio Antonio Franco³

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

Muitos aspectos ecológicos envolvidos nas interações entre espécies leguminosas e estirpes de rizóbio têm sido facilmente entendidos com o emprego de técnicas que utilizam genes marcadores. A introdução de um gene marcador específico tem se mostrado altamente viável para análises dessas interações. Os genes marcadores são capazes de codificar para produtos que podem ser facilmente identificados ou medidos, especialmente, enzimas que podem atuar em diferentes substratos, fornecendo produtos coloridos ou fluorescentes facilmente detectáveis. De uma maneira geral, os genes marcadores têm sido utilizados em diferentes aspectos da ecologia microbiana, como nos estudos de competição entre estirpes de rizóbio, expressão de genes simbióticos, colonização da rizosfera e raízes, entre outros. Em todos esses estudos, os genes repórteres precisam ser introduzidos no genoma alvo através de um plasmídeo ou por inserção cromossomal. Nesta revisão, são enfatizados, principalmente, os diversos usos e aplicações de genes marcadores nos estudos de ecologia microbiana, com ênfase no sistema GUS (β -glucuronidase).

Palavras-chave: gene marcador, ecologia microbiana, gene *gus*, sistema GUS, β -glucuronidase, *Rhizobium*, simbiose.

SUMMARY

Many of the ecological aspects involved with the interactions between legume species and rhizobia strains have been made easily to understood with the use of reporter gene techniques. The introduction of a specific reporter gene in an organism has shown to be highly efficient to analyze such interactions. These reporter genes generally code for products that can be easily identified or measured, mainly enzymes that can act on a variety of substrates, supplying colored or

fluorescent detectable products. In general, the marker genes have been used in different aspects of microbial ecology, as in the competition studies among rhizobia strains, symbiotic gene expression, rhizosphere and root colonization, among others. In all studies, the marker genes need to be introduced into the genome by a plasmid or through a chromosomal insert. The present review focus, mainly, on the diverse use and applications of marker genes on ecological microbial studies with emphasis on the GUS gene system (β -glucuronidase).

Key words: reporter gene, microbial ecology, marker gene, *gus* gene, GUS system, β -glucuronidase, rhizobia, symbiosis.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As principais barreiras encontradas nos estudos de ecologia microbiana envolvem a detecção e/ou identificação de organismos específicos. Muitas vezes, algumas metodologias como sorologia e testes de resistência a antibióticos, que são marcas fenotípicas, são descritas como marcadores moleculares para enfatizar que as novas metodologias, baseadas na biologia molecular, podem ser vistas como uma extensão dos procedimentos já existentes. Esses métodos mais tradicionais usados na identificação dos organismos utilizam moléculas endógenas como marcadores, tais como enzimas metabólicas características (WILSON, 1995).

Entretanto, esses métodos tradicionais não permitem uma avaliação satisfatória da comunidade

¹Engenheiro Agrônomo, PhD, Pesquisador da Embrapa/CPAO, Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste, Rodovia BR 163, Km 253, CP 661, 79804-970, Dourados, MS. Fax: ++55-67-421-0811. E-mail: mercante@cpao.embrapa.br. Autor para correspondência.

²Farmacêutica, PhD., Pesquisadora da Embrapa /CNPAB-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Seropédica, RJ.

³Engenheiro Agrônomo, PhD., Pesquisador da Embrapa /CNPAB-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Seropédica, RJ.

microbiana, devido a problemas básicos de análise, como por exemplo, a falta de um meio de cultura dito universal para contagem da população total de microrganismos presentes num determinado “habitat” (REIS, 1996). Além disso, sofrem outras limitações, apresentando-se trabalhosas ou imprecisas (WILSON, 1995; WILSON *et al.*, 1996; SESSITSCH *et al.*, 1998).

Existe, portanto, a necessidade de utilização de métodos mais sensíveis e seguros de detecção e quantificação de organismos em determinada comunidade microbiana. Nesse sentido, técnicas desenvolvidas mais recentemente, baseadas na biologia molecular, oferecem muitas vantagens, como o aumento da precisão e/ou facilidade no processo de detecção (SESSITSCH *et al.*, 1998; WILSON *et al.*, 1994).

Entre os principais métodos desenvolvidos mais recentemente, estão aqueles envolvidos na detecção de padrões característicos e seqüências de ácidos nucléicos (DNA e RNA) e, entre outros, o método que possibilita a identificação da atividade de um gene específico através da introdução dos chamados “genes marcadores introduzidos”.

As diferentes técnicas de detecção de ácidos nucléicos disponíveis se baseiam na detecção de seqüências de DNA específicas, determinadas por hibridização (SAYLER *et al.*, 1992), ou na amplificação de seqüências características, seguidas, quando necessário, por detecção através de hibridização (STEFFAN & ATLAS, 1991). As técnicas baseadas nos ácidos nucléicos são, em muitos casos, complementares às técnicas que empregam um gene marcador (WILSON, 1995). As desvantagens dessas técnicas, quando comparadas com a utilização dos “genes marcadores introduzidos”, estão no fato de serem mais complexas tecnicamente, especialmente quando se pretende alcançar um maior nível de sensibilidade (SAYLER *et al.*, 1992; STEFFAN & ATLAS, 1991).

Diversos marcadores moleculares em nível de DNA têm sido empregados na identificação de bactérias e em estudos sobre filogenia de rizóbio, competitividade e ecologia microbiana, em geral. Entre esses principais marcadores, destaca-se o PCR (“polymerase chain reaction”), que permite a replicação de seqüências definidas de DNA, de modo a amplificar seqüências de genes (SAIKI *et al.*, 1988). Outros métodos que ganharam impulso nos últimos anos foram o RFLP (polimorfismo pelo tamanho dos fragmentos de restrição) (LAGUERRE *et al.*, 1992), o RAPD (polimorfismo do DNA amplificado aleatoriamente) (CAETANO-ANOLLÉS *et al.*, 1992) e o seqüenciamento do DNA ribossomal 16 S (YOUNG *et al.*, 1991). Contudo, nesta revisão, será enfocada

apenas a utilização dos genes marcadores, com ênfase no sistema do gene repórter GUS.

DIFERENTES GENES MARCADORES UTILIZADOS NA ECOLOGIA DE RIZÓBIO

O estudo de muitos aspectos ecológicos envolvidos na interação entre espécies leguminosas e estirpes de rizóbio tem sido amplamente facilitado com o emprego de técnicas que utilizam genes marcadores. O uso de um “gene marcador específico”, que pode ser introduzido no organismo sob estudo, tem se mostrado altamente viável para análises dessas interações de rizóbio com leguminosas, sem as desvantagens mencionadas anteriormente, nos métodos de detecção de ácidos nucléicos.

Os genes marcadores codificam produtos que podem ser facilmente identificados ou medidos, especialmente enzimas que podem atuar em diferentes substratos, fornecendo produtos coloridos ou fluorescentes, facilmente detectáveis (JEFFERSON, 1989; WILSON, 1995). De uma maneira geral, a introdução de tais genes marcadores facilita o monitoramento de estirpes bacterianas específicas.

Diversas aplicações de uso dos genes marcadores têm sido mencionadas nos estudos de ecologia de bactéria e outros microrganismos que interagem com plantas. Entre essas aplicações estão os estudos de competição de rizóbio. Dessa forma, esta metodologia que utiliza os genes marcadores permite a avaliação de competição com sistemas radiculares intactos, nos quais se identificam os nódulos formados pela estirpe inoculada, por meio de uma coloração distinta (STREIT *et al.*, 1992).

Os genes marcadores podem, ainda, ser usados como “repórteres” (“reporter genes”), ligados aos promotores do gene, que respondem a uma variedade de sinais ambientais (WILSON *et al.*, 1994).

Os genes repórteres são instrumentos da biologia molecular de grande importância, com uma ampla diversidade de aplicações. Eles podem ser usados para substituir um gene estrutural de interesse e, portanto, atuar como repórter da expressão do gene, através da criação de uma “fusão de gene”. Em estudos da ecologia microbiana, os genes repórteres são utilizados para facilitar a detecção de estirpes de bactérias marcadas (WILSON, 1995).

Estudos atuais de biologia molecular têm procurado cada vez mais o entendimento da regulação da expressão dos genes. Os fatores que atuam em tal regulação vêm sendo melhor estudados com o uso de “fusões de gene”. As fusões de gene podem ser definidas como construções de DNA, formadas *in vitro* ou *in vivo*, que resultam em seqüências codificadoras de um gene repórter, sendo transcrito e/ou

traduzido na direção de seqüências controladoras de outro gene, denominado “controlador” (JEFFERSON, 1987).

As fusões genéticas podem ser de dois tipos gerais, que compreendem as “fusões transcricionais” e “fusões translacionais”, com variações dentro de cada tipo. As fusões transcricionais são definidas como aquelas em que todas as seqüências codificadoras da proteína são derivadas do gene repórter, sem participação do controlador. Assim, embora o mRNA produzido possa consistir de seqüências, tanto do gene controlador quanto do gene repórter, a proteína sintetizada será codificada somente pelo gene repórter. Por outro lado, as fusões translacionais são definidas como sendo aquelas em que o polipeptídeo produzido é o resultado de uma informação codificadora, proporcionada tanto pelo gene repórter quanto pelo gene controlador (JEFFERSON, 1987).

O controle da atividade do gene pode ser manifestado em diversos níveis, incluindo o início da transcrição ou tradução, o processamento, transporte ou degradação do mRNA ou da proteína (JEFFERSON, 1987). O uso de fusões genéticas adequadas pode simplificar a análise desse processo complexo.

Estudos recentes têm mostrado o uso de genes marcadores controlados por novas seqüências promotoras de DNA, que respondem a sinais específicos do ambiente. Nesse caso, usa-se um gene marcador sem promotor e seleciona-se por padrões de expressão do gene marcador, que é controlado por seqüências promotoras adjacentes ao ponto de inserção na bactéria receptora (WILSON, 1995). Por exemplo, têm sido identificadas seqüências que regulam a expressão do gene marcador em resposta a componentes de exsudato radicular (LAM *et al.*, 1990), ou à disponibilidade de fosfato (DE WEGER *et al.*, 1994).

Introdução do gene marcador em estirpes de rizóbio

Segundo WILSON (1995), o gene marcador pode ser introduzido na bactéria receptora de duas formas diferentes: através de um plasmídeo, que é capaz de se duplicar, pelo processo de replicação, como um elemento autônomo na bactéria receptora, ou como parte do DNA que fica integrado ao cromossomo da bactéria. A inserção de tais genes marcadores no genoma alvo pode ser ao acaso ou dirigida, permitindo avaliar a regulação de determinados genes (REUBER *et al.*, 1991).

A introdução do gene marcador como uma inserção direta no genoma do receptor pode ser alcançada através do uso de elementos de transposi-

ção (“transposons”), conforme demonstrado por HERRERO *et al.* (1990) e DE LORENZO *et al.* (1990). Os elementos de transposição que se movem dentro do genoma, sem que seja necessário homologia, podem ser usados para conferir resistência a antibióticos, cujo mecanismo difere dos naturalmente existentes na maioria das bactérias. A introdução do gene marcador no cromossoma da bactéria receptora oferece uma vantagem significativa, tendo em vista que a inserção pode ser tão estável quanto os outros genes cromossomais. Uma desvantagem potencial é que qualquer inserção no DNA genômico pode, ainda que a uma freqüência muito baixa, causar uma mutação no gene de importância no processo que está sendo estudado (WILSON, 1995).

O uso de plasmídeos para clonagem do gene marcador pode apresentar algumas desvantagens, uma vez que não são completamente estáveis (WEINSTEIN *et al.*, 1992), e a sua perda significaria, também, a perda do gene marcador; além disso, poderia transferir-se a outras bactérias no solo (WILSON *et al.*, 1996). Portanto, torna-se mais seguro a incorporação de genes clonados no cromossomo.

A inserção no cromossomo pode ser obtida por recombinação, se o DNA doador e o DNA do cromossoma apresentarem seqüências homólogas (ACUNA *et al.*, 1987). Com base nos elementos transponíveis Tn5 e Tn10, foi desenvolvido um procedimento simples para clonagem e inserção de genes externos no cromossoma de bactérias gram-negativas (HERRERO *et al.*, 1990; DE LORENZO *et al.*, 1990). Uma coleção dos chamados mini-elementos de transposição (“mini-transposon”), localizados em plasmídeos suicidas, tem sido construída para simplificar o processo de marcação. O plasmídeo é mantido na estirpe de *E. coli* S17-1(λ -pir) e pode ser transferido dessa estirpe para o rizóbio, por conjugação. A conjugação é obtida pela mistura das estirpes doadora e receptora, crescendo num meio não-seletivo. As expressões dos genes *tra* no cromossoma de *E. coli*, e do gene *mob* no plasmídeo, são necessárias para o processo de conjugação. O gene marcador será transferido quando houver crescimento de células transconjugantes num meio que não pode ser usado pelas células da estirpe doadora e da receptora (SESSITSCH *et al.*, 1998).

O plasmídeo de entrega (“suicida”) não pode se manter nas células receptoras de rizóbio, porque sua replicação depende de proteínas específicas de *E. coli*. Não obstante, o mini-elemento de transposição (“mini-transposon”) pode mover-se do plasmídeo de entrega até uma nova localização no genoma do hospedeiro, inserindo-o assim no cromossoma do rizóbio (WILSON *et al.*, 1996). Uma

característica especial do mini-elemento de transposição é que o gene responsável pelo evento da transposição é deixado no plasmídeo de entrega e não é levado ao cromossoma bacteriano, o que reduz a probabilidade de transposições posteriores do gene marcador introduzido, aumentando a sua estabilidade (DE LORENZO *et al.*, 1990).

O sistema do gene repórter GUS

O sistema de fusão do gene *gus* (β -glucuronidase) está sendo amplamente utilizado como um gene repórter em estudos de biologia molecular de plantas (JEFFERSON *et al.*, 1987), uma vez que a atividade GUS não se encontra presente no tecido vegetal. Além disso, tem se mostrado altamente adequado aos estudos de interação entre plantas e microrganismos, devido à ausência de atividade endógena de GUS em muitas bactérias de importância agrícola, como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Azospirillum* e *Pseudomonas* (WILSON *et al.*, 1996).

O gene *gusA* (também designado como gene *uidA*), codificador da enzima β -glucuronidase, foi originalmente isolado de *E. coli* (JEFFERSON *et al.*, 1986). Em *E. coli*, a atividade β -glucuronidase não é expressa constitutivamente e o gene *gusA* é parte de um operon (WILSON *et al.*, 1992).

O gene *gusA* oxida o substrato "X-glucA" (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo) e pode ser facilmente monitorado, usando uma grande variedade de glucuronídeos (JEFFERSON, 1987), fornecendo como produto um composto insolúvel de cor azul. Recentemente, um novo gene repórter (*celB*), análogo ao gene *gusA*, mas que usa substratos menos custosos, tem sido usado como marcador em estudos de ecologia de rizóbio. O substrato "Magenta-glucA" (5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo) resulta em precipitados de cor magenta (WILSON, 1995).

Dessa forma, o gene marcador *gusA* torna-se bastante apropriado em diversos estudos da ecologia microbiana. Os estudos iniciais com uso de *gusA* como gene marcador em bactérias eram amplamente restritos à análise de regulação da expressão de genes (SHARMA & SIGNER, 1990; VAN DEN EEDE *et al.*, 1992). WILSON *et al.* (1991) demonstraram a possibilidade de se detectar a infecção de pêlos radiculares e ocupação nodular. Em estudos de ocupação nodular, a detecção de estirpes marcadas é extremamente fácil de se realizar: nódulos induzidos por estirpes marcadas com o gene *gusA* são alterados a uma coloração azul quando a raiz, após ser lavada, é incubada em um meio com tampão fosfato contendo o substrato GUS "X-glucA", ou a uma coloração magenta quando é

incubada com "Magenta-glucA" (WILSON *et al.*, 1995). Esse procedimento elimina a necessidade do corte de nódulos para se proceder o isolamento de bactérias, etapa geralmente requerida em todas as demais técnicas. A utilização do gene *gusA*, em estudo de competição para nodulação do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), foi apresentada por STREIT *et al.* (1992). Neste estudo, foi comparada a capacidade de dezessete estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e três estirpes de *R. tropici* na competição para nodulação, usando a co-inoculação com um derivado marcado com o gene *gusA* da estirpe KIM5s de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Os experimentos de competição foram realizados em níveis de pH 5,2 e 6,4. A habilidade competitiva observada foi variável, desde 4% para a estirpe menos competitiva até 96% para a mais competitiva. As estirpes de *R. tropici* mostraram baixa ocupação nodular a pH 6,4; porém, sua habilidade competitiva aumentou, consideravelmente, em pH mais baixo.

Contudo, para utilizar o gene marcador *gusA* torna-se necessário, primeiramente, a sua introdução na estirpe de rizóbio que se pretende estudar, conforme mencionado anteriormente. Isso pode ser obtido mediante um "sistema de introdução de um elemento de transposição" ("transposon delivery system"), que insere o gene marcador no cromossomo da estirpe de rizóbio receptora. O elemento de transposição ("transposon") é fornecido por uma estirpe doadora de *E. coli*, que é acoplada à bactéria receptora. Uma vez que esta fusão de genes tenha ocorrido na bactéria, a expressão do gene repórter *gus* sinaliza a atividade do outro gene (WILSON *et al.*, 1992).

Cada elemento de transposição contém um gene cassete ("cassette gene") que consiste do mesmo gene marcador com seqüências adjacentes de "promotores", que regulam a expressão do gene em resposta a sinais ambientais. Portanto, o gene cassete consiste de dois elementos: o gene estrutural em si; neste caso, o gene *gusA* codificador da GUS- e as seqüências de DNA que regulam quando e onde o gene estrutural é expresso, usualmente referido como o promotor (WILSON, 1995).

A escolha de promotores que respondem a diferentes sinais ambientais fornecerá informação sobre a bactéria num determinado ambiente, ou, inversamente, sobre o ambiente em si (WILSON, 1995). Para fins de atender a questões específicas da ecologia de rizóbio, diferentes genes cassetes têm sido desenvolvidos, consistindo do gene *gusA* como marcador e diferentes seqüências regulatórias-promotores (Tabela 1).

Nos estudos de competição de estirpes de rizóbio, por exemplo, esses elementos de transposi-

Tabela 1 - Alguns elementos de transposição disponíveis e suas aplicações (Adaptado de Wilson, 1995).

Elemento de transposição GUS	Tipo de promotor	Descrição	Uso
mTn5SSgusA10	Repressor	O gene <i>gusA</i> é reprimido normalmente pelo produto do gene <i>lacI</i> , mas pode ser induzido usando IPTG (isopropil- β -D tiogalactosida)	Estudos de ecologia de rizóbio em solo e rizosfera, e também em estudos de ocupação nodular
mTn5SSgusA11 ou mTn5SSgusA20	Constitutivo	O gene <i>gusA</i> é expresso constitutivamente em bactéria de vida livre	Estudos de ecologia de rizóbio em solo e rizosfera
mTn5SSgusA30 ou mTn5SSgusA31	Simbiótico	O gene <i>gusA</i> é expresso somente em nódulos fixadores de N ₂ ativos	Estudos de ocupação nodular
mTn5SSgusA40	Sem promotor	A expressão do gene <i>gusA</i> é dependente do controle genético do hospedeiro	Criação de estirpes que produzem GUS em resposta a sinais ambientais específicos, como, p. ex., em resposta a exsudatos radiculares

ção permitem a avaliação em, pelo menos, três fases diferentes: na sobrevivência saprofítica como organismos de vida livre no solo, na competição para colonizar a rizosfera e, por fim, no resultado final em termos de porcentagem de ocupação dos nódulos (WILSON *et al.*, 1996). Além dessas avaliações, elementos de transposição foram desenvolvidos também para estudos de colonização da rizosfera de outras bactérias associadas com plantas, como, por exemplo, *Azospirillum*. Dessa forma, o sistema GUS tem sido usado para observar as locações físicas de bactérias associadas com plantas (CHRISTIANSEN-WENIGER & VANDERLEYDEN, 1993; HUREK *et al.*, 1994).

Muitas vezes, as infecções misturadas, que proporcionam dupla ocupação nodular, não são consideradas em estudos de competição, pelo fato das metodologias apresentarem-se muito laboriosas quando se emprega os métodos sorológicos ou de resistência a antibiótico. Num estudo com *Rhizobium tropici* marcado com *gusA*, foi possível determinar a dupla ocupação pelo exame direto do padrão de coloração dos nódulos (WILSON *et al.*, 1996).

Nos estudos de interação simbiótica entre o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e estirpes de *Rhizobium tropici*, *R. etli* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, foram realizadas diversas avaliações da expressão dos genes da nodulação de diferentes estirpes bacterianas, contendo a fusão *nodA::gusA*. Em relação ao efeito inibitório do nitrogênio combinado na nodulação do feijoeiro, o emprego de genes marcadores tem contribuído para o

entendimento do controle da nodulação. Nesse contexto, resultados experimentais obtidos por MERCANTE *et al.* (1995) e STRALIOTTO *et al.* (1995) demonstraram que a presença de nitrogênio mineral não inibiu a expressão dos genes *nodABC* de estirpes de *Rhizobium tropici*, *R. etli* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, apesar da nodulação de duas cultivares de feijoeiro terem sido inibidas, mesmo em níveis baixos de nitrogênio adicionados.

Em outros estudos, quando exsudatos de sementes de feijoeiro e *Mimosa flocculosa* foram combinados e utilizados como indutores dos genes da nodulação, observaram-se aumentos sinérgicos significativos na expressão dos genes *nod* tanto de estirpes de *R. tropici* quanto de *R. etli* (MERCANTE, 1997; MERCANTE & FRANCO, 1999). Esses resultados evidenciam a importância dos genes marcadores em estudos de ecologia microbiana através da regulação da expressão do gene marcador em resposta a sinais ambientais específicos.

Contudo, o sistema de transposição do gene *gusA* pode ser utilizado para marcar e, dessa maneira, estudar praticamente todas as estirpes de rizóbio e outras bactérias associadas a plantas.

Outros sistemas de genes marcadores

Vários outros sistemas marcadores, além do gene repórter *gus*, têm sido desenvolvidos para estudos da ecologia do rizóbio. O gene *lacZ*, codificador da enzima β -galactosidase, por exemplo, tem sido usado para estudar o processo de infecção nodular por *Rhizobium* (BOIVIN *et al.*, 1990) e para

estudos de colonização radicular por *Azospirillum* (KATUPITIYA *et al.*, 1995). Esse gene pode ser detectado através da obtenção de um produto insolúvel de cor azul, na presença de "X-gal" (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosida), que é o substrato da enzima (DRAHOS *et al.*, 1986). Porém, tanto o rizóbio quanto as plantas possuem a atividade β -galactosidase endógena, necessitando, assim, da aplicação de técnicas que diferenciem esta atividade endógena da atividade β -galactosidase adquirida, como, por exemplo, a utilização de variações de temperatura na amostra para inativar a enzima endógena (WILSON *et al.*, 1996; REIS, 1996). LAM *et al.* (1990) utilizaram fusões *lacZ* para isolar promotores que respondem a exsudatos da rizosfera, e tais marcadores poderiam, então, ser usados para analisar a resposta dos exsudatos na colonização radicular.

Outros sistemas de marcadores disponíveis incluem o gene *xyIE*, que codifica para a atividade da enzima catecol-2-3 dioxigenase e o gene *luxA*, codificador para o catabolismo do naftaleno, produzindo uma bioluminescência (WILSON, 1995).

CONSIDERAÇÕES FINAIS - Perspectivas

Estudos atuais de biologia molecular têm procurado, cada vez mais, o entendimento da regulação da expressão dos genes. Neste contexto, o uso de genes marcadores controlados por novas seqüências promotoras de DNA tem sido ainda mais intensificado, facilitando a detecção de estirpes de bactéria em estudos ecológicos. O gene repórter *gus* tem sido altamente eficiente nos estudos envolvendo interações planta-microrganismos, considerando que uma estirpe marcada pode ser detectada através de métodos colorimétricos simples. Devido à simplicidade de sua metodologia, o Laboratório de Biotecnologia e Agricultura da FAO/IAEA desenvolveu um "kit do gene marcador *gus*", visando facilitar a sua utilização por pesquisadores que não estejam familiarizados com tal metodologia.

A principal vantagem do GUS, sobre os outros sistemas de gene marcador, é a sua ausência em plantas e bactérias, o que permite sua eficiente utilização em estudos envolvendo a bactéria na rizosfera e em associações simbióticas com plantas.

Contudo, deve-se considerar que o uso de genes marcados no campo está restrito pela legislação brasileira referente à liberação de organismos geneticamente modificados. A Lei de Biossegurança Nº 8.974, de 05 de janeiro de 1995, em vigor, estabelece normas para o uso das técnicas de engenharia genética e liberação, no ambiente, de organismos

geneticamente modificados. Assim, o uso desse método de detecção no Brasil, atualmente, é recomendado apenas em estudos de laboratório e casa de vegetação, recomendando-se que todos os materiais contaminados (vidros, meios de cultura, solo, etc.) sejam autoclavados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUNA, G., ALVAREZ-MORALES, A., HAHN, M., *et al.* A vector for site-directed, genomic integration of foreign DNA into soybean root-nodule bacteria. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.9, p.41-50, 1987.
- BOIVIN, C., CAMUT, S., MALPICA, C.A., *et al.* *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. **Plant Cell**, Rockville, v.2, p.1157-1170, 1990.
- CAETANO-ANOLLÉS, G., BASSAM, B.J., GRESSHOFF, P.M. Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.235, p.157-165, 1992.
- CHRISTIANSEN-WENIGER, C., VANDERLEYDEN, J. Ammonium-excreting *Azospirillum* sp. become intracellularly established in maize (*Zea mays*) para-nodules. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.17, p.1-8, 1993.
- DE LORENZO, V., HERRERO, M., JAKUBZIK, U., *et al.* Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative Eubacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.172, p.6568-6572, 1990.
- DE WEGER, L.A., DEKKERS, L.C., VAN DER BIJ, A.J., *et al.* Use of phosphate-reporter bacteria to study phosphate limitation in the rhizosphere and in bulk soil. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.7, p.32-38, 1994.
- DRAHOS, D.J., HEMMING, B.C., MCPHERSON, S. Traking recombinant organism in the environment. β -galactosidase as a selective marker for fluorescent pseudomonas. **Biotechnology**, New York, v.4, p.439-444, 1986.
- HERRERO, M., DE LORENZO, V., TIMMIS, K.T. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosome insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.172, p.6557-6567, 1990.
- HUREK, T., REINHOLD-HUREK, B., VAN MONTAGU, M., *et al.* Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p.1913-1923, 1994.
- JEFFERSON, R.A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v.5, n.4, p.387-405, 1987.
- JEFFERSON, R.A. The GUS reporter gene system. **Nature**, London, v.342, p.837-838, 1989.
- JEFFERSON, R.A., BURGESS, S.M., HIRSH, D. β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene fusion marker. **Proceedings of the Soil Science Society of America**, Madison, v.86, p.8447-8451, 1986.

- JEFFERSON, R.A., KAVANAGH, T.A., BEVAN, M.W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **EMBO Journal**, Oxford, v.6, p.3901-3907, 1987.
- KATUPITIYA, S., NEW, P.B., ELMERICH, C., *et al.* Improved N₂ fixation in 2,4-D-treated wheat roots associated with *A. lipoferum*: studies of colonization using reporter genes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.27, p.447-452, 1995.
- LAGUERRE, G., MAZURIER, S.I., AMARGER, N. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.101, p.17-26, 1992.
- LAM, S.T., ELLIS, D.M., LIGON, J.M. Genetic approaches for studying rhizosphere colonization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.129, p.11-18, 1990.
- MERCANTE, F.M., FRANCO, A.A. Expressão dos genes *nod* de *Rhizobium tropici*, *R. etli* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e estabelecimento da nodulação do feijoeiro na presença de exsudatos de sementes de *Mimosa flocculosa* e *Leucaena leucocephala*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, 1999 (No prelo).
- MERCANTE, F.M. **Diversidade genética de rizóbio que nodula o feijoeiro e troca de sinais moleculares na simbiose com plantas hospedeiras**. Seropédica-RJ, 1997. 199p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997.
- MERCANTE, F.M., CUNHA, C.O., STRALIOTTO, R., *et al.* Efeito do nitrogênio mineral na troca de sinais moleculares durante o processo de infecção das raízes do feijoeiro por *Rhizobium*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25, 1995, Viçosa, MG. **Resumos...** Viçosa : Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1995. v.1. 549p. p.495-497.
- REIS, V.M. **Métodos bio-moleculares aplicados na caracterização e detecção de bactérias**. Seropédica : EMBRAPA-CNPAB, 1996. 26p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 28).
- REUBER, T.L., LONG, S.L., WALKER, G.C. Regulation of *Rhizobium meliloti* *exo* genes in free-living cells and in plant examined using TnpH_{oA} fusions. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.426-434, 1991.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v.239, p.487-491, 1988.
- SAYLER, G.S., NIKBAKHT, K., FLEMING, J.T., *et al.* Applications of molecular techniques to soil biochemistry. In: STOTZKY, G., BOLLAG, J. M. (eds). **Soil biochemistry**. New York : Marcel Dekker, 1992. v.7. p.131-172.
- SESSITSCH, A., HARDARSON, G., DE VOS, W.M., *et al.* Use of marker genes in competition studies of *Rhizobium*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.204, p.35-45, 1998.
- SHARMA, S.B., SIGNER, E.R. Temporal and spatial regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium meliloti* in plant revealed by transposon Tn5-*gusA*. **Genes and Development**, New York, v.4, p.344-356, 1990.
- STEFFAN, R.J., ATLAS, R.M. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.45, p.137-161, 1991.
- STRALIOTTO, R., CUNHA, C.O., MERCANTE, F.M., *et al.* Effect of combined nitrogen on rhizobia-bean (*Phaseolus vulgaris*) symbiosis evaluated by the β -glucuronidase activity of a *nodABC::gusA* fusion. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7, 1995. **Resumos...** Santos : Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1995. 216p. p.141.
- STREIT, W., KOSCH, K., WERNER, D. Nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and *Rhizobium tropici* strains measured by glucuronidase (GUS) gene fusions. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.14, p.140-144, 1992.
- VAN DEN EEDE, G., DEBLAERE, R., GOETHALS, K., *et al.* Broad host range and promoter selection vectors for bacteria that interact with plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.5, n.3, p.228-234, 1992.
- WEINSTEIN, M., ROBERTS, R.C., HELINSKI, D.R. A region of the broad-host-range plasmid RK2 causes stable in plant inheritance of plasmids in *Rhizobium meliloti* cells isolated from alfalfa root nodules. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, p.7486-7489, 1992.
- WILSON, K.J. Molecular techniques for the study of rhizobial ecology in the field. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.27, n.4/5, p.501-514, 1995.
- WILSON, K.J., GILLER, K.E., JEFFERSON, R.A. β -Glucuronidase (GUS) operon fusions as a tools for studying plant-microbe interactions. In: HENNECKE, H.; VERMA, D. P. S., (eds). **Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions**. Dordrecht : Kluwer, 1991. p.226-229.
- WILSON, K.J., HUGHES, S.G., JEFFERSON, R. The *Escherichia coli* *gus* operon: introduction and expression of the *gus* operon in *E. coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria. In: GALLAGHER, S. R., (ed). **Gus protocols, using the *gus* gene as a reporter of gene expression**. Oxford : Academic, 1992. p.7-22.
- WILSON, K.J., SESSITSCH, A., AKKERMANS, A.D.L. Molecular markers as tools to study the ecology of microorganisms. In: K. RITZ, DIGHTON, J., GILLER, K. E., (eds). **Beyond the biomass: composition and function analysis of soil microbial communities**. Chichester : John Wiley, 1994. p.149-156.
- WILSON, K.J., SESSITSCH, A., CORBO, J.C., *et al.* β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. **Microbiology**, New York, v.141, p.1691-1705, 1995.
- WILSON, K. J., SESSITSCH, A., PARRA, A., BECK, D. Biología molecular en el campo: genes marcadores para a visualización rápida y precisa de la competición entre cepas rizobianas y la colonización por bacterias de raíces de plantas. In: J. PIJNENBORG, RUÍZ, D., SILES, W., (eds). REUNIÓN LATINOAMERICANA DE RHIZOBIOLOGÍA, 18, 1996, Santa Cruz de la Sierra. **Anais...** Santa Cruz de la Sierra, 1996. 547p. p.147-162.
- YOUNG, J.P.W., DOWNER, H.L., EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototropic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.2271-2277, 1991.