

Transformación genética por electroporación de *Arthrobacter* sp. UMCV2

Genetic Transformation by electroporation of *Arthrobacter* sp. UMCV2

Martha Patricia Chávez Moctezuma¹, Gustavo Santoyo Pizano¹ y Eduardo Valencia Cantero¹

¹ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

martha.chavez@umich.mx

Resumen

El género *Arthrobacter* comprende un grupo de bacterias Gram-positivas que es conocido por su capacidad para biodegradar compuestos orgánicos naturales y artificiales en el ambiente, y producir enzimas importantes para la industria. La cepa *Arthrobacter* sp. UMCV2, es una rizobacteria, promotora del crecimiento vegetal a través de la emisión del compuesto orgánico volátil *N, N*-dimetilhexadecilamina (DMHDA), cuyo genoma muestra la presencia de genes con secuencias homólogas a genes *luxR* solos, que podrían codificar para probables moduladores de la respuesta de la bacteria a moléculas de percepción de quorum para su adaptación al medio ambiente. Estos genes se han designado como auto-inducer-related Regulator (*airR*), e inducen motilidad *swarming* y la expresión de dichos genes, cuando la cepa es expuesta al compuesto DMHDA, producido por la propia bacteria. Sin embargo, debido a la escasez de herramientas para la manipulación genética de *Arthrobacter*, solo pocas especies se han investigado a nivel molecular. En este estudio, se establecieron las condiciones para la transformación genética por electroporación de *Arthrobacter* sp. UMCV2, haciendo modificaciones al procedimiento, como la adición de penicilina a las células durante la fase temprana de crecimiento, además de adicionar sorbitol 0.5 M en la solución de glicerol al 10% para la preparación de las células competentes, y en el medio de recuperación de las células, incubando durante 8 h. La tasa de transformación varió dependiendo de los parámetros eléctricos y de la concentración de DNA. Este constituye el primer reporte sobre la transformación genética por electroporación de la cepa *Arthrobacter* sp. UMCV2.

Palabras Clave: *Arthrobacter*, transformación genética, genes *luxR*

Abstract

The *Arthrobacter* genus encompasses a group of Gram-positive bacteria known for their ability to biodegrade natural and artificial organic compounds in the environment and to produce important enzymes used in industry. The *Arthrobacter* sp. UMCV2 strain is a rhizobacteria that promotes plant growth through the emission of the volatile organic compound *N, N*-dimethylhexadecylamine (DMHDA), whose genome shows the presence of genes with sequences homologous to *luxR* genes. Such genes could codify for probable modulators of the bacterium's response to *quorum sensing* molecules, fostering its environmental adaptation. These genes have been designated as auto-inducer-related Regulators (*airR*) as, when the strain is exposed to the self-produced DMHDA compound, they induce *swarming* motility and their own self-expression. However, due to the scarcity of tools for the genetic manipulation of *Arthrobacter*, only a few species have been investigated at the molecular level. This study establishes the requirements for the genetic transformation by electroporation of *Arthrobacter* sp. UMCV2. Our proposed modifications to the standard procedure include: the addition of penicillin to the cells during the early growth phase, the addition of sorbitol 0.5 M in the 10% glycerol preparation solution for the competent cells, as well as its addition to the cell recovery medium, with an 8 h incubation time. The transformation rate also varied depending on the electrical parameters and the DNA concentration. This is the first report on the genetic transformation by electroporation of the *Arthrobacter* sp. UMCV2 strain.

Introducción

Los miembros del género *Arthrobacter* son bacterias Gram-positivas que pertenecen al phylum Actinobacteria. Diferentes especies de *Arthrobacter* producen enzimas importantes para la industria y para la estimulación del crecimiento vegetal, denotando su importancia para la agricultura y la biotecnología (Singh et al., 2016). Este grupo de bacterias es conocido también por su capacidad para degradar compuestos orgánicos naturales y artificiales en el ambiente y existe ubicuamente tanto en suelos comunes como en ambientes extremos, incluyendo hielo marino antártico, áreas contaminadas con metales, sitios contaminados con productos químicos y entornos radiactivos

(Mongodin et al., 2006). La prevalencia ambiental del género *Arthrobacter* y sus potenciales aplicaciones resultan de interés para el diseño de métodos de manipulación genética en esta cepa. La transformación genética de microorganismos en el laboratorio, es una técnica rutinaria de enorme utilidad para estudios de genética básica y aplicada. La electroporación, en la cual un pulso eléctrico de alta intensidad produce poros transitorios en la membrana celular y, por lo tanto, facilita la captación de DNA exógeno, es un rápido y ampliamente utilizado método de transformación (Zhang et al., 2011). A la fecha, existen solo pocos reportes de electroporación de cepas de *Arthrobacter*. Morikawa (1994), reportó el primer ejemplo de transformación genética por electroporación de la cepa de *Arthrobacter* sp. MIS38, con una eficiencia de transformación de 3.0×10^5 transformantes/ μg de DNA de plásmido. A partir de este primer reporte, se han descrito varios métodos para introducir DNA en esta actinobacteria, estos incluyen el método de electroporación para *Arthrobacter* sp. A3, donde se optimizó la concentración de DNA, el tiempo de recuperación de las células y los parámetros eléctricos, entre otros factores, con lo que se alcanzó una eficiencia de 6.8×10^7 transformantes/ μg de DNA de plásmido, además se incluyó otras especies de *Arthrobacter* como: *A. globiformis*, *A. nicotinovorans*, *A. aurescens* y *A. crystallopojetes* (Zhang et al., 2011). También se ha reportado la transformación por electroporación para *Arthrobacter simplex* CICC 140451, con resultado de 3.76×10^4 transformantes/ μg de DNA, examinando factores que afectan la eficiencia de transformación como, la fase celular de crecimiento del microorganismo, condiciones de tratamiento con compuestos debilitadores de la pared celular, cantidad de DNA de plásmido, entre los parámetros principales de electroporación (Luo et al., 2018), pero ninguna de estas cepas en el clado al que pertenece *Arthrobacter* sp. UMCV2.

Antecedentes

Las bacterias se comunican entre sí para su adaptación y sobrevivencia en el medio ambiente (Mukherjee y Bassler, 2019). El sistema representativo de comunicación bacteriana es la percepción de quorum (QS), que se basa en la producción de moléculas que actúan como señales químicas llamadas autoinductores, para regular la expresión de genes en respuesta a cambios en la densidad de la población bacteriana. Estos sistemas constan de una sintasa (familia LuxI) y de un regulador transcripcional (familia LuxR) para la producción y percepción de las moléculas señal por los microorganismos (Fuqua et al., 1994). El sistema canónico *luxI-luxR* es típicamente el componente central de QS en bacterias Gram-negativas (Whiteley et al., 2017), pero raramente está presente en bacterias Gram-positivas, los reguladores transcripcionales *LuxR solo* (que no están asociados a un homólogo LuxI), son moléculas clave para la comunicación intercelular, que pueden permitir a estas bacterias percibir señales químicas (Rajput y Kumar, 2017). *Arthrobacter* sp. UMCV2 es una bacteria Gram-positiva, aislada de la rizósfera de plantas de maíz (Valencia-Cantero et al., 2007), cuyo genoma se ha secuenciado y muestra la presencia de genes con secuencias homólogas a genes *luxR*, que podrían codificar para probables moduladores de la respuesta de la bacteria a moléculas de QS para su adaptación al medio ambiente. Esta cepa de *Arthrobacter* promueve el crecimiento vegetal a través de la emisión de compuestos orgánicos volátiles (COVs), principalmente *N*, *N*-dimetilhexadecilamina (DMHDA) (Velázquez-Becerra et al., 2011). El presente estudio tiene como objetivo la transformación genética de *Arthrobacter* sp. UMCV2 por ser un requisito previo para la manipulación de los genes relacionados a *luxR* solos, que han sido designados como auto-inducer-related Regulator (*airR*), e inducen motilidad *swarming* y la expresión de dichos genes, cuando la cepa es expuesta al compuesto DMHDA, producido por la propia bacteria, para determinar la capacidad de los reguladores transcripcionales *AirR* para modular la respuesta a quorum de la bacteria. La manipulación genética de esta ha resultado compleja, debido a que un protocolo adecuado de transformación para esta actinobacteria no se había reportado, por lo que, el objetivo de este trabajo fue, establecer las condiciones para la transformación genética por electroporación de *Arthrobacter* sp. UMCV2.

Materiales y Métodos

Cepas empleadas

En el presente trabajo se utilizó *Arthrobacter* sp. UMCV2 (Valencia-Cantero et al., 2007), que fue cultivada rutinariamente en agar nutritivo (AN) o caldo nutritivo (CN) a 22 °C.

La cepa utilizada como control positivo de transformación y para la preparación de plásmidos fue *Escherichia coli* JM101 (Yanisch-Perron et al., 1985). Fue cultivada en agar Luria (AL) o caldo Luria (CL) a 37 °C.

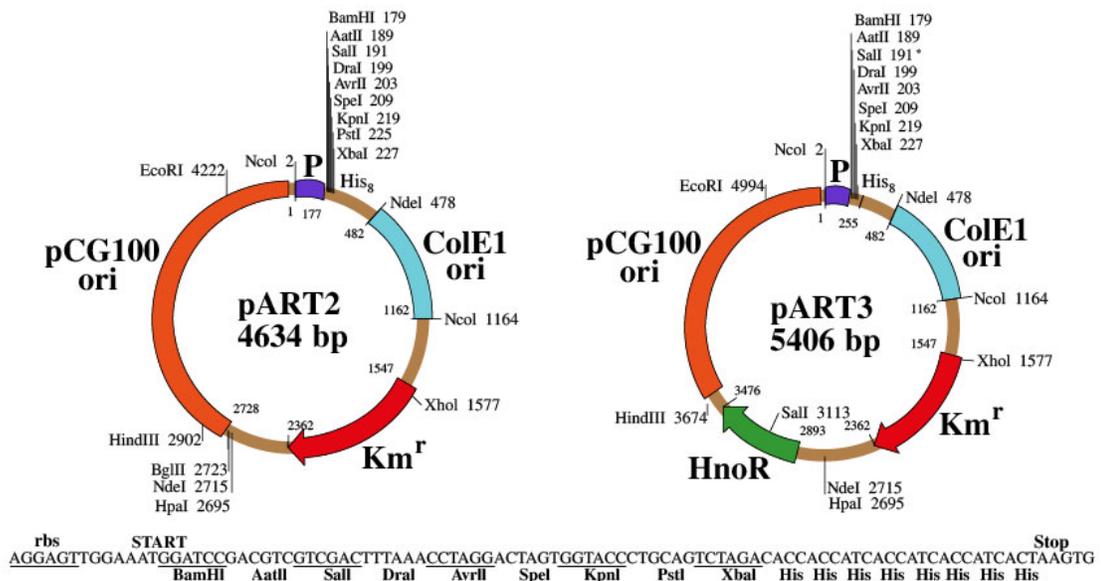


Medios de cultivo

Se preparó caldo nutritivo (CN), utilizando 5.0 g de peptona de caseína y 3.0 g de extracto de carne. Agar nutritivo (AN), la misma preparación del caldo y se le agregaron 15 g/L de agar bacteriológico. Caldo Luria Bertani (CL), se preparó utilizando 1% de NaCl, 1% de peptona de caseína y 0.5% de extracto de levadura. Agar Luria Bertani (AL), al caldo Luria se le agregó 1.5% de agar bacteriológico. A los medios de cultivo se agregó el antibiótico Kanamicina (Km) para la selección de bacterias que portaran los plásmidos recombinantes, a concentración final de 140 µg/mL en el caso de *Arthrobacter* sp. UMCV2 y 20 µg/mL para *E. coli* JM101.

Vectores

Los vectores pART2 y pART3, utilizados en este estudio, fueron amablemente proporcionados por el D.C. Marius Mihasan (Universidad Alexandru Ioan Cuza, Iași, Rumania). Estos tienen un tamaño de 4.6 y 5.4 Kb, respectivamente, y



contienen un gen de resistencia a kanamicina y orígenes de replicación para *Corynebacterium glutamicum* (para la actinobacteria) (pCG100) y *E. coli* (ColE1) (Figura 1) (Sandu et al., 2005).

Figura 1. Mapas de DNA de los plásmidos pART2 y pART3. Las características de los plásmidos son las siguientes: pCG100 y ColE1, orígenes de replicación; Kan^r, gen de resistencia a kanamicina; P, promotor/operador; MCS, sitio de clonación múltiple; His₈, secuencia que codifica una etiqueta de ocho histidinas; y tamaño del plásmido en pares de bases (pb). Se presentan los sitios de restricción importantes, incluidos los sitios de restricción únicos y su localización. pART3, además contiene el gen represor hdnO de (hnoR). La secuencia inferior muestra las características siguientes: rbs, sitio de unión al ribosoma; ATG, codón de inicio de la traducción; MCS con nueve sitios de restricción única; secuencia codificante para la etiqueta His₈; y TAA, codón de paro de la traducción (Modificada de Sandu et al., 2005).

Metodología

Preparación de células electrocompetentes

Las células electrocompetentes se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Zhang et al., (2011) con algunas modificaciones: un inóculo del 1% de un pre-cultivo en fase estacionaria de *Arthrobacter* sp. UMCV2 en CN, fue inoculado en medio fresco y cultivado a 22 °C, con agitación constante. Cuando la densidad óptica (D.O.) alcanzó entre 0.3-0.5 a 600 nm, se añadió penicilina G a una concentración final de 30 µg/mL y se continuó el cultivo durante una hora adicional. Después, el cultivo fue rápidamente colocado en baño de hielo-agua por al menos 10 min y las células fueron

cosechadas por centrifugación a 5,000 rpm, por 15 min a 4 °C. Seguido de tres lavados en buffer de electroporación (glicerol al 10% adicionado con 0.5 M de sorbitol) frío, y concentrando las células 100 veces en el último lavado. Finalmente, la suspensión celular se distribuyó en alícuotas de 50 µL y fueron almacenadas a -80 °C.

Electroporación

El protocolo de electroporación que se utilizó fue el siguiente: después de descongelar las células electrocompetentes en hielo, se mezclaron 50 µL de las células con 100 ng de DNA de los plásmidos pART2 y pART3, respectivamente, y cada una de estas mezclas se transfirió a una celda de electroporación (0.1 cm, Bio-Rad CA, USA) fría, a la que se dio un solo pulso de 4-5 milisegundos utilizando un electroporador (MicroPulser Electroporator Bio-Rad), ajustado a 15 kV/cm. Inmediatamente después del pulso eléctrico, cada suspensión de células fue transferida a un microtubo con 800 µL de medio de recuperación (CL conteniendo 0.5 M de sorbitol) y se incubó a 22 °C por 8 h con agitación constante a 120 rpm. Para la selección de las células transformantes, se tomaron 100 µL de cada una de las mezclas previamente concentradas por centrifugación a 12,000 rpm, y se distribuyeron en cajas de AL con Kanamicina. Con cada experimento, se realizó el control negativo omitiendo la adición de DNA de plásmido. La eficiencia de transformación se definió como el número de transformantes obtenidas por microgramo de DNA utilizado (Zhang et al., 2011).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en colonia

Se amplificó por PCR el gen de resistencia a kanamicina de los plásmidos pART2 y pART3, utilizando los oligonucleótidos directo 5'-ATGAGCCATATTCAACGGGAAACG-3' y reverso 5'-TTAGAAAACTCATCGAGCATC-3', respectivamente, para originar un producto de amplificación de 816 pb (Zhang et al., 2011). Se tomó una sola colonia crecida sobre una placa de AL con Km, se resuspendió en 50 µL de agua desionizada estéril y se hirvió por 15 min. Un microlitro de esta muestra se utilizó como DNA molde para una reacción de PCR. Alícuotas de 5 µL de los productos de PCR se sometieron a corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% (peso/volumen). El DNA de los plásmidos pART2 y pART3 y el de *Arthrobacter* sp. UMCV2, se emplearon como los controles positivo y negativo, respectivamente.

Resultados y Discusión

Transformación de *Escherichia coli* JM101 con los vectores pART2 y pART3

Con el propósito de establecer las condiciones de electroporación utilizando los vectores pART2 y pART3, se realizó primero la transformación en *E. coli* JM101, que se empleó como control positivo del procedimiento, utilizando las condiciones estándar del método ya reportado (Green y Sambrook, 2020). Además, estos plásmidos poseen un gen que codifica resistencia al antibiótico Kanamicina, que permitió seleccionar las colonias transformantes, ya que la replicación de genes y la expresión de la resistencia a antibióticos son requerimientos para una transformación exitosa. En la transformación genética, el DNA en forma de plásmido se introduce en una célula bacteriana para que éstas puedan luego multiplicar la secuencia de interés en cantidades adecuadas para su posterior análisis y/o manipulación y solo aquellas bacterias que hayan sido transformadas con un plásmido que contenga el gen de resistencia al antibiótico sobrevivirán. En muchos casos también, los sistemas de modificación-restricción pueden representar barreras para la transformación, debido a que estos son usados por las bacterias para protegerse de moléculas de DNA exógenas que ingresen a la bacteria, eliminando las secuencias ajenas al genoma de estas (Miller, 1994). Para *E. coli* se obtuvo una eficiencia de transformación de 3.8×10^6 transformantes/µg de DNA utilizando el plásmido pART2 y de 3.0×10^6 transformantes/µg de DNA con el plásmido pART3. La transformación de *E. coli* por electroporación es un método confiable para obtener eficiencias de transformación alrededor de 10^9 ufc/µg de DNA (Dower et al., 1988) y aunque la eficiencia obtenida con estos plásmidos no fue tan alta como la reportada, esta fue suficiente y rápida para obtener las transformantes necesarias para verificar que los plásmidos estaban funcionando correctamente en esta cepa bacteriana. En la Figura 2 se observa el crecimiento de la cepa transformada de *E. coli* con los vectores, A) pART2 y B) pART3, en placas de AL. Con la obtención de las cepas transformantes de *E. coli* se guardó la información genética de los vectores en una célula bacteriana, la cual puede almacenarse por un periodo largo de tiempo.

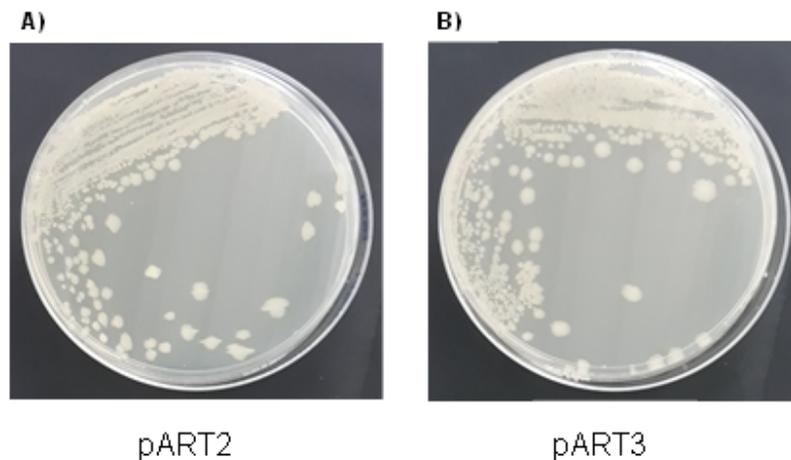


Figura 2. Cepa transformada de *E. coli* JM101 con los vectores, A) pART2 y B) pART3. En placas de AL con 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Km, con incubación a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 20 h (Fuente: Elaboración propia).

Transformación de *Arthrobacter* sp. UMCV2 con los vectores pART2 y pART3

pART2 es un vector para expresión constitutiva de genes, mientras que, pART3 además contiene el gen *hnoR* y es un vector para expresión inducible de genes (Figura 1). Para el presente estudio, el desarrollo de un método de transformación genética para *Arthrobacter* sp. UMCV2, utilizando estos vectores, permitirá el estudio de los genes relacionados a *luxR* (*air*) para entender su función ecológica. Por ser *Arthrobacter* sp. UMCV2 una bacteria Gram-positiva, su pared celular intacta se considera una fuerte barrera para la entrada de DNA a la célula, por lo que el tratamiento de la célula con agentes debilitadores de la pared celular, como lisozima o penicilina, es uno de los métodos más efectivos para mejorar la eficiencia de electroporación (Sunairi et al., 1996). Para establecer las condiciones de transformación de esta actinobacteria, se agregó penicilina G a una concentración final de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como agente debilitador de la pared celular bacteriana, además de la adición de sorbitol 0.5 M en la solución de glicerol al 10%, para la preparación de las células competentes. Igualmente, se utilizó CL adicionado con 0.5 M de sorbitol para la recuperación de las células después de la electroporación. Previamente se ha reportado (Ito y Nagane, 2001), que la adición de agentes osmóticos estabilizadores, tal como el sorbitol, en cada uno de los procesos de crecimiento, electroporación y recuperación de las células, mejora considerablemente la tasa de transformación de *Bacillus subtilis*. Además, también se ha reportado, que la adición de sorbitol no solo mejoró la eficiencia de transformación sino también promovió la reproducibilidad del método (Zhang et al., 2011). Así mismo, se utilizó un periodo de recuperación de las células más largo de lo habitual, incubando por 8 h. Por otro lado, se ha reportado también por Zhang et al., (2011), que la concentración de DNA es otro factor clave para incrementar la eficiencia de transformación, obteniendo un aumento en el número de transformantes, al incrementar la cantidad de DNA usado, sin embargo, concentraciones por arriba de 1000 ng, condujeron a una significativa disminución de la eficiencia de transformación. Por lo que, con base a lo reportado, se utilizaron 100 ng de DNA para la transformación de *Arthrobacter* sp. UMCV2, concentración que fue suficiente para la obtención de la transformación. Para las células sin tratamiento (control negativo), no se obtuvieron colonias transformantes, sin embargo, se obtuvo una eficiencia de transformación de 2.8×10^4 transformantes/ μg de DNA con el plásmido pART2, y de 1.5×10^4 transformantes/ μg de DNA con el plásmido pART3, utilizando las modificaciones mencionadas al método de transformación. Zhang et al., (2011), reportó alta eficiencia de transformación para *Arthrobacter* sp. A3, del orden de 10^7 transformantes/ μg de DNA de plásmido. Sin embargo, para el caso de *Arthrobacter* sp. UMCV2 la eficiencia de transformación no fue tan alta, por lo que podrían examinarse más a fondo factores como la fase celular de crecimiento del microorganismo para la preparación de las células competentes o los parámetros eléctricos de electroporación, entre algunos de los parámetros a probar, para aumentar la eficiencia de transformación en esta actinobacteria. En la Figura 3 se observa el crecimiento de la actinobacteria transformada con los vectores, A) pART2 y B) pART3, sobre placas de AN. Con estos resultados, se determinó que estos vectores son funcionales en *Arthrobacter* sp. UMCV2 y se establecieron las condiciones iniciales para la manipulación genética de este microorganismo.

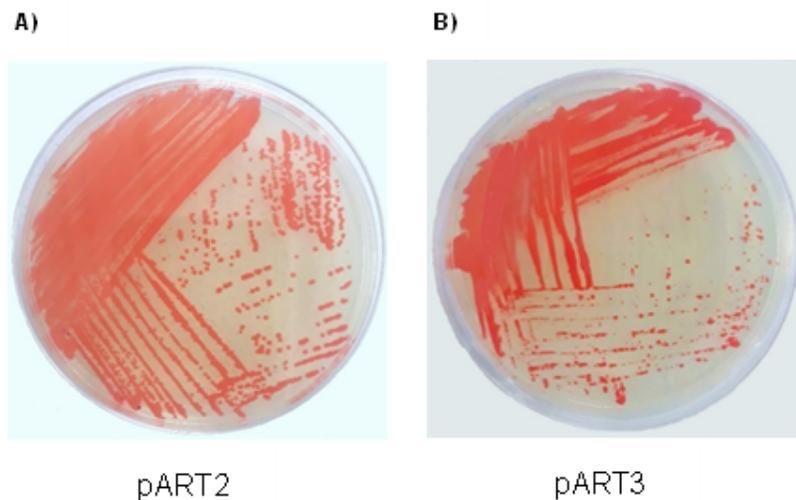


Figura 3. Cepa transformada de *Arthrobacter* sp. UMCV2 con los vectores, A) pART2 y B) pART3. En placas de AN con 140 µg/mL de Km, con incubación a 22 °C por 72 h (Fuente: Elaboración propia).

Confirmación de la transformación por PCR en colonia

Para validar la autenticidad de la transformación se realizó PCR en colonia, debido a que este es un método simple y rápido para distinguir a través de un número potencialmente grande de colonias transformantes, cuales contienen realmente el plásmido de nuestro interés. Esta técnica aprovecha la alta sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que se requiere una muy pequeña cantidad de DNA molde obtenida de células crudas, para visualizar una banda en un gel de agarosa después de la amplificación (Bergkessel y Guthrie, 2013). En algunos casos, esta es una alternativa a la estrategia de crecer pequeños cultivos de varias colonias para obtener microgramos de DNA de cada uno para realizar análisis de restricción de los plásmidos, sin embargo, puede también complementar esta técnica, ya que el DNA aislado de diferentes colonias puede ser utilizado para transformaciones o clonaciones posteriores. Para validar la autenticidad de la transformación de *Arthrobacter* sp. UMCV2, se seleccionaron al azar colonias obtenidas de la transformación por electroporación, para realizar de estas, amplificación por PCR en colonia, como se describió en la Metodología. Como se muestra en la Figuras 4A y 4B, en todas las colonias transformantes examinadas se obtuvo la amplificación del fragmento de 816 pb correspondiente al gen de kanamicina de los plásmidos pART2 y pART3. Sin embargo, en la Figura 4B se observa poco DNA en la amplificación por PCR en colonia para la transformante con el plásmido pART3, esto puede ser debido a un defecto en el origen de replicación de este vector para la actinobacteria, que pudo haberse producido durante la manipulación genética para su construcción. Estos resultados permitieron verificar definitivamente la transformación por electroporación de *Arthrobacter* sp. UMCV2.

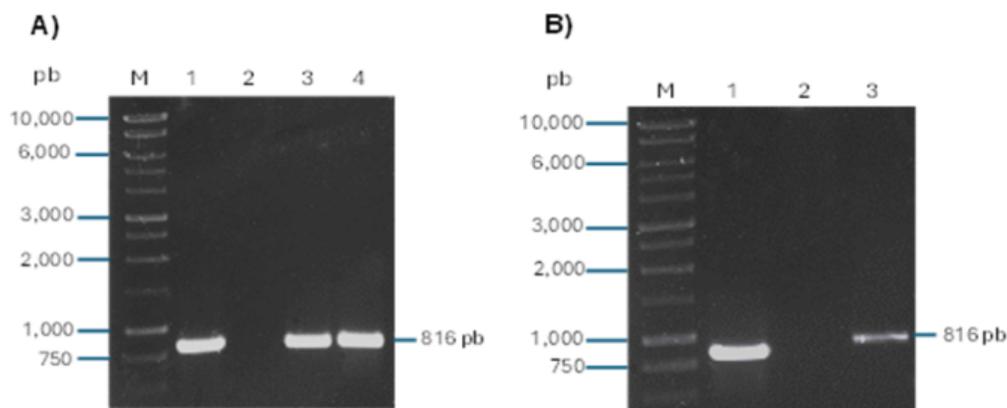


Figura 4. PCR en colonia de las transformantes de *Arthrobacter* sp. UMCV2. A) Fotografía del gel de agarosa que muestra la amplificación del gen de kanamicina de pART2. Carril 1, amplificación del gen de Km del plásmido, control (+); carril 2, amplificación del gen de Km en *Arthrobacter* sp. UMCV2, control (-); carriles 3 y 4, amplificación del gen de Km de pART2 en *Arthrobacter* sp. UMCV2. B) Fotografía del gel de agarosa de la amplificación del gen de kanamicina de pART3. Carril 1, amplificación del gen de Km del plásmido, control (+); carril 2, amplificación del gen de Km de *Arthrobacter* sp. UMCV2, control (-); carril 3, amplificación del gen de Km de pART3 en *Arthrobacter* sp. UMCV2. En ambos casos, a la izquierda M, marcador de tamaño molecular (1 kb), se indica los tamaños de las bandas utilizadas como referencia y a la derecha, se indica el tamaño de la amplificación (Fuente: Elaboración propia).

Conclusión

Con este trabajo, se establecieron las condiciones iniciales óptimas para la transformación por electroporación de *Arthrobacter* sp. UMCV2, constituyendo el primer reporte sobre la manipulación genética de esta actinobacteria.

Por otro lado, se sentaron las bases experimentales para realizar estudios sobre la capacidad de los reguladores AirR para modular la respuesta a quorum de esta bacteria, teniendo como perspectiva, el estudio en los genes relacionados a *luxR* (*airR*) que permitirán dilucidar su función ecológica.

Referencias

- Bergkessel, M., and Guthrie, C. (2013). Colony PCR. *Methods in Enzymology*. 529, 299-309. doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2
- Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-45. doi: 10.1093/nar/16.136127
- Fuqua, W. C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269-275. doi: 10.1128/jb.176.2.269-275.1994
- Green, M. R., and Sambrook, J. (2020). Transformation of *Escherichia coli* by electroporation. *Cold Spring Harb. Protoc.* 6, 101220. doi: 10.1101/pdb.prot101220
- Ito, M., and Nagane, M. (2001). Improvement of the electro-transformation efficiency of facultatively alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 by high osmolarity and glycine treatment. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2773-2775. doi: 10.1271/bbb.65.2773
- Luo, J., Xue, H., Zhao, S., Liu, X., Chen, X., Liu, J., Shen, Y., and Wang, M. (2018). Optimization of electroporation conditions for *Arthrobacter simplex*. *Adv. Appl. Biotechnol.* 393-402. doi: 10.1007/978-981-10-4801-2_40
- Miller, J. F. (1994). Bacterial transformation by electroporation. *Methods Enzymol.* 235, 375-385. doi: 10.1016/0076-6879(94)35156-2
- Mongodin, E. F., Shapir, N., Daugherty, S. C., DeBoy, R. T., Emerson, J. B., Shvartzbeyn, A., Radune, D., Vamathevan, J., Riggs, F., Grinberg, V., Khouri, H., Wackett, L. P., Nelson, K. E., Sadowsky, M. J. (2006). Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. *PLoS Genet.* 2(12): e214. doi: 10.1371/journal.pgen.0020214

- Morikawa, M., Daido, H., Pongpobpibool, S., and Imanaka, T. (1994). Construction of a new host-vector system in *Arthrobacter* sp. and cloning of the lipase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 300–303. doi: 10.1007/BF00902732
- Mukherjee, S., and Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 371-382. doi: 10.1038/s41579-019-0186-5
- Sandu, C., Bogdan-Calin, C., Sachelaru, P., and Brandsch, R. (2005). Plasmids for nicotine-dependent and-independent gene expression in *Arthrobacter nicotinovorans* and other *Arthrobacter* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8920-8924. doi: 10.1128/AEM.71.8920-8924.2005
- Singh, R. M., Gaba, S. Yadav, A. N., Gaur, P., Gulati, S., Kaushik, R., Saxena, A. K., (2016). First high quality draft genome sequence of a plant growth promoting and cold active enzyme producing psychrotrophic *Arthrobacter agilis* strain L77. *Stand Genomic Sci.* 11, 54. doi: 10.1186/s40793-016-0176-4
- Valencia-Cantero, E., Hernández-Calderón, E., Velázquez-Becerra, C., López-Meza, J. E., Alfaro-Cuevas, R., and López-Bucio, J. (2007). Role of dissimilatory fermentative iron-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant Soil.* 291, 263–273. doi: 10.1007/s11104-007-9191-y
- Velázquez-Becerra, C., Macias-Rodriguez, L. I., Lopez-Bucio, J., Altamirano-Hernandez, J., Flores-Cortez, I., and Valencia-Cantero, E. (2011). A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino-containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis in vitro. *Plant Soil.* 339, 329–340. doi: 10.1007/s11104-010-0583-z
- Whiteley, M., Diggle, S. P., and Greenberg, E. P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* 551, 313–320. doi: 10.1038/nature24624
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33, 103-119. doi: 10.1016/0378-1119(85)90120-9
- Zhang, H., Li, Y., Chen, X., Sheng, H., and An, L. (2011). Optimization of electroporation conditions for *Arthrobacter* with plasmid pART2. *J. Microbiol. Methods.* 84, 114-120. doi: 10.1016/j.mimet.2010.11.002

