

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ESTHER DERING ESTEVES

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *ior* (INDOLPIRUVATO FERRODOXINA  
OXIRREDUTASE) DE *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE***

CURITIBA

2013

ESTHER DERING ESTEVES

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *ior* (INDOLPIRUVATO FERRODOXINA  
OXIRREDUTASE) DE *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE***

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção de grau de Mestre no Programa de  
Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica),  
Setor de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leda S. Chubatsu

Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Michelle Z. T. Sfeir

CURITIBA

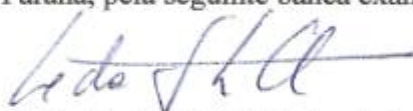
2013

## TERMO DE APROVAÇÃO

ESTHER DERING ESTEVES

### REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *ior* (INDOLPIRUVATO FERRODOXINA OXIRREDUTASE) DE *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE*

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora



Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Leda Satie Chubatsu (orientadora)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR



Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Fabiane Gomes de Moraes Rego

Departamento de Patologia Médica - UFPR



Dr. Marco Aurelio Schüller Oliveira

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Orientadoras: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leda S. Chubatsu

Dr.<sup>a</sup> Michelle Z. T. Sfeir

À minha família pelo seu apoio,  
incentivo e amor.

Ao meu noivo Marcelo por todo  
apoio, paciência e amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Dr.<sup>a</sup> Leda S. Chubatsu pela sua orientação, discussões e ensinamentos fundamentais para a minha formação.

À Dr.<sup>a</sup> Michelle Z. T. Sfeir pelo apoio, discussões e sua coorientação. Suas ideias e sua praticidade foram fundamentais para a realização deste trabalho de dissertação.

Gostaria de agradecer as minhas duas orientadoras, Leda e Michelle, por toda paciência e auxílio em todas as reuniões e em todas as conversas paralelas pelos corredores, que foram essenciais não somente para esta dissertação, mas também para a formação científica.

Ao professor Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio e aos demais professores do grupo pelas discussões e contribuições durante as reuniões. Principalmente ao professor Dr. Emanuel M. de Souza por suas ideias e seu senso crítico, os quais foram fundamentais para a realização deste trabalho de dissertação.

Agradeço aos técnicos Roseli Prado e Valter pela amizade, atenção, auxílio e carinho em todos os momentos.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica que permitiram a realização deste trabalho.

A todas as Instituições Financiadoras, particularmente a CAPES e ao INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio pelo apoio financeiro e ao CNPq pela bolsa de estudos.

Agradeço a todos os colegas do núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, não vou citar nomes porque todos foram importantes, principalmente aqueles que auxiliaram com protocolos e ideias.

Um agradecimento especial à Deus por me conceder esta oportunidade e me fortalecer, além de colocar pessoas especiais ao meu lado para me apoiarem e ajudarem.

Agradeço todo o incentivo da minha família, ao meu pai Leci e minha mãe Regina que sempre me incentivaram nos estudos, ao meu irmãozinho Felipe e ao meu irmão Vitor por todas as caronas durante finais de semanas e feriados até a UFPR. Ao meu noivo Marcelo por todo apoio, incentivo e paciência durante toda a ansiedade e preocupação que tive durante o mestrado, e claro por todo seu amor e momentos ao meu lado que foram um bálsamo.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	xvi
<b>RESUMO</b> .....	xviii
<b>ABSTRACT</b> .....	xix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	03
2.1. AUXINA .....	03
2.2. FATORES QUE INFLUENCIAM A BIOSÍNTESE DE AIA EM BACTÉRIAS.....	07
2.3. INDOL PIRUVATO FERRODOXINA OXIRREDUTASE.....	08
2.4. <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	10
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	12
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	13
4.1. OBJETIVO GERAL .....	13
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	14
5.1. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS .....	14
5.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	16
5.3. ANTIBIÓTICOS.....	17
5.4. ARMAZENAMENTO DAS ESTIRPES BACTERIANAS.....	17
5.5. AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR .....	18
5.6. PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>H. seropedicae</i> .....	18
5.7. PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS .....	19
5.8. DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO .....	20
5.9. LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA E VETORES .....	20
5.10. ELETROFORESE DE DNA .....	21
5.11. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA .....	21
5.11.1. Preparo de células competentes .....	21
5.11.2. Transformação bacteriana por choque térmico .....	22

5.12. SUBCLONAGEM DA REGIÃO PROMOTORA ÍNTEGRA E DELETADA.....	22
5.13. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA .....	22
5.14. CONJUGAÇÃO BACTERIANA .....	23
5.15. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE IOR .....	24
5.15.1. Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase .....	24
5.16. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA .....	25
5.16.1. Determinação da concentração de proteína em placas de 96 poços.....	25
5.17. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE IOR.....	26
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>27</b>
6.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>IOR</i> NO MUTANTE T1A8.....	27
6.2. DESENHO DOS PARES DE “PRIMERS” PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA COMPLETA DO GENE <i>IOR</i> .....	40
6.3. CONSTRUÇÃO DE “PRIMERS” PARA A AMPLIFICAÇÃO DE SEGMENTOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>IOR</i> .....	43
6.4. CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE DNA CONTENDO A REGIÃO PROMOTORA COMPLETA E COM DELEÇÕES NO VETOR DE CLONAGEM TA PTZ57 R/T OU PGEM-T EASY .....	47
6.5. SUBCLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE DNA CONTENDO SEGMENTOS DA REGIÃO PROMOTORA DE INTERESSE NO VETOR DE FUSÃO PMP220 .....	52
6.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>IOR</i> NAS FUSÕES pMP <i>promotor::lacZ</i> , pMP $\Delta$ <i>ntrC::lacZ</i> e pMP $\Delta$ <i>ntrC</i> $\Delta$ <i>s54::lacZ</i> .....	56
6.7. TRANSFORMAÇÃO DAS FUSÕES <i>lor::LacZ</i> NA <i>E.coli</i> ET8000.....	59
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>71</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>72</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-</b> BIOSÍNTESE BACTERIANA DE AIA.....	5
<b>FIGURA 2-</b> ATIVIDADE ESPECÍFICA DE B-GALACTOSIDASE DA ESTIRPE MUTANTE T1A8 DURANTE 24 HORAS DE CULTIVO.....	28
<b>FIGURA 03-</b> CURVA DE CRESCIMENTO DURANTE 24 HORAS DAS ESTIRPES SMRI E T1A8.....	29
<b>FIGURA 4-</b> ATIVIDADE ESPECÍFICA DE B-GALACTOSIDASE EM FASE ESTACIONÁRIA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE MUTANTE T1A8 NA PRESENÇA DE NARINGENINA.....	31
<b>FIGURA 5-</b> ATIVIDADE ESPECÍFICA DE B-GALACTOSIDASE EM FASE ESTACIONÁRIA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE MUTANTE T1A8 NA PRESENÇA DE AIA.....	32
<b>FIGURA 6-</b> ATIVIDADE ESPECÍFICA DE B-GALACTOSIDASE EM FASE ESTACIONÁRIA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE MUTANTE T1A8 NA PRESENÇA DE TRIPTOFANO.....	33
<b>FIGURA 7-</b> ATIVIDADE ESPECÍFICA DE B-GALACTOSIDASE EM FASE ESTACIONÁRIA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE MUTANTE T1A8 NA PRESENÇA DE INDOL.....	34
<b>FIGURA 8-</b> ATIVIDADE ESPECÍFICA DE B-GALACTOSIDASE EM FASE ESTACIONÁRIA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE MUTANTE T1A8 NA PRESENÇA DE CRISINA.....	35
<b>FIGURA 9-</b> ATIVIDADE ESPECÍFICA DE B-GALACTOSIDASE EM FASE ESTACIONÁRIA DE CRESCIMENTO DA ESTIRPE MUTANTE T1A8 NA PRESENÇA DE QUERCETINA.....	36
<b>FIGURA 10-</b> ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDES.....	37
<b>FIGURA 11-</b> ESTRUTURA DOS FLAVONÓIDES UTILIZADOS NESTE TRABALHO.....	38

<b>FIGURA 12-</b> SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA PROVÁVEL REGIÃO PROMOTORA DO GENE HSERO_4278.....	41
<b>FIGURA 13-</b> ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% E TAMPÃO TAE 1X DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>IOR</i> DE <i>H. seropedicae</i> .....	42
<b>FIGURA 14-</b> ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% E TAMPÃO TAE 1X DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE 905PB DO GENE <i>IOR</i> DE <i>H. seropedicae</i> .....	43
<b>FIGURA 15-</b> ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EM TAMPÃO TAE 1X DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO SEGMENTO DA REGIÃO PROMOTORA DE 465PB DO GENE <i>IOR</i> DE <i>H. seropedicae</i> .....	45
<b>FIGURA 16-</b> ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EM TAMPÃO TAE 1X DOS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DO SEGMENTO DA REGIÃO PROMOTORA DE 285PB DO GENE <i>IOR</i> DE <i>H. seropedicae</i> .....	47
<b>FIGURA 17-</b> MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO PGEM-T EASY.....	48
<b>FIGURA 18-</b> ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EM TAMPÃO TAE 1X DE PLASMÍDEOS PGEM-T CONTENDO A REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>IOR</i> DE <i>H. seropedicae</i> .....	49
<b>FIGURA 19-</b> MAPA FÍSICO DO VETOR PTZ57R/T.....	50
<b>FIGURA 20-</b> ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EM TAMPÃO TAE 1X DE PLASMÍDEOS PTZ57R/T CONTENDO A REGIÃO PROMOTORA COM DELEÇÃO DE 440 PB DO GENE <i>IOR</i> DE <i>H. seropedicae</i> .....	51
<b>FIGURA 21-</b> ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EM TAMPÃO TAE 1X DE PLASMÍDEOS ISOLADOS DURANTE A CLONAGEM DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>IOR</i> DE <i>H. seropedicae</i> CONTENDO UMA DELEÇÃO DE 620 PB.....	52
<b>FIGURA 22-</b> MAPA FÍSICO DO VETOR PMP220.....	53

<b>FIGURA 23-</b> ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EM TAMPÃO TAE 1X DE PLASMÍDEOS PMP <i>PROMOTOR</i> ::LACZ ISOLADOS DURANTE A SUBCLONAGEM DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>IOR</i> DE <i>H. seropedicae</i> .....	54
<b>FIGURA 24-</b> ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EM TAMPÃO TAE 1X DE PLASMÍDEOS PMP $\Delta$ <i>NTRC</i> ::LACZ ISOLADOS DURANTE A SUBCLONAGEM DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>IOR</i> DE <i>H. seropedicae</i> COM UMA DELEÇÃO DE 440PB.....	55
<b>FIGURA 25-</b> ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% E TAMPÃO TAE 1X DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>IOR</i> DE <i>H. seropedicae</i> COM UMA DELEÇÃO DE 620PB.....	56
<b>FIGURA 26-</b> ATIVIDADE ESPECÍFICA DE B-GALACTOSIDASE DE <i>H. seropedicae</i> ESTIRPE SMR1 (SELVAGEM) E TRANSFORMADA COM OS PLASMÍDEOS INDICADOS E DA ESTIRPE T1A8 DURANTE O PERÍODO DE 12 A 24 HORAS DE CULTIVO.....	57
<b>FIGURA 27-</b> ATIVIDADE ESPECÍFICA DE B-GALACTOSIDASE DA ESTIRPE SMR1 CONTENDO PMP <i>PROMOTOR</i> , PMP $\Delta$ <i>NTRC</i> , PMP $\Delta$ <i>NTRC</i> $\Delta$ S54.....	59
<b>FIGURA 28-</b> ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% EM TAMPÃO TAE 1X DE PLASMÍDEOS ISOLADOS DURANTE A TRANSFORMAÇÃO DA FUSÃO PMP <i>PROMOTOR</i> ::LACZ EM ET8000.....	60
<b>FIGURA 29-</b> ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% E TAMPÃO TAE 1X DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DE SEGMENTOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>IOR</i> DE <i>H. seropedicae</i> .....	61
<b>FIGURA 30-</b> ATIVIDADE ESPECÍFICA DE B-GALACTOSIDASE DA FUSÃO PLASMIDIAL PMP <i>PROMOTOR</i> ::LACZ EM ET8000 DURANTE O PERÍODO DE 9 HORAS DE CULTIVO.....	62
<b>FIGURA 31-</b> ATIVIDADE ESPECÍFICA DE B-GALACTOSIDASE EM ET8000 DURANTE O PERÍODO DE 2, 5, 7 E 9 HORAS DE CULTIVO.....	63

<b>FIGURA 32-</b> VÁRIOS NÍVEIS DE REGULAÇÃO $\sigma^S$ SÃO DIFERENTEMENTE AFETADOS POR VÁRIAS CONDIÇÕES DE ESTRESSE.....	65
<b>FIGURA 33-</b> REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SEGMENTOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>IOR</i> .....	66
<b>FIGURA 34-</b> REGIÃO DO GENOMA DE <i>H. seropedicae</i> ONDE SE ENCONTRA O GENE HSERO_4278.....	68
<b>FIGURA 35-</b> REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS EMPILHAMENTOS DA REGIÃO INTERGÊNICA DO GENE <i>IOR</i> .....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 01</b> – <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	14
<b>TABELA 02</b> – <i>Escherichia coli</i> .....	14
<b>TABELA 03</b> – PLASMÍDEOS.....	15
<b>TABELA 04</b> – ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS.....	17
<b>TABELA 05</b> – ALGUNS REPRESENTANTES DAS SUBCLASSES DE FLAVONÓIDES.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA – ácido indolacético

AIAlD – indol acetoaldeído

Amp – ampicilina

BSA – albumina de soro bovino

C - carbono

DNA – ácido desoxiribonucleico

dNTP –desoxinucleosídeos trifosfato

D.O.<sub>n</sub> – densidade óptica a *n* nanômetros

EDTA – ácido etilenodiamino-tetra-acético

g – grama

h – hora

IAM – indol acetamina

IAN – indol acetonitrila

IDT – Integrated DNA Technologies

IpdC – indol piruvato descarboxilase

Ior – indol piruvato ferredoxina oxirredutase

IPyA - indol piruvato

kb – quilo pares de bases

KM – kanamicina

LA – Luria-Broth Agar

LB – Luria-Broth

L – litro

M – molar

mg – miligrama

mM - milimolar

mmol – milimol

MW – marcador de massa molecular (Weight Marker)

Nal – ácido nalidíxico

NFDM – Nitrogen-Free Davis e Mignoli

ONP – *o*-nitrofenol



ONPG – o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

pb – pares de bases

PCR – reação da polimerização em cadeia: do inglês *polymerase chain reaction*

Por – piruvato ferredoxina oxirredutase

RBS – sítio de ligação do ribossoma: do inglês **Ribosome Binding Site**

RNA – ácido ribonucleico

Por – RNA polimerase *subunit*

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

SM - estreptomicina

TAN – triptamina

TC – tetraciclina

Triptofano – Trp

TRIS – tris(hidroximetil)-aminometano

TSO – oxidase da cadeia lateral do triptofano

UV- ultravioleta

Vor – 2-cetoisovalerato ferredoxina oxirredutase

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

$\sigma^{38}$  – fator sigma 38 da RNA polimerase de procariotos

$\sigma^{54}$  – fator sigma 54 da RNA polimerase de procariotos

$\sigma^{70}$  – fator sigma 70 da RNA polimerase de procariotos

$\mu$ g – micro grama

$\mu$ M – micro molar

## RESUMO

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, fixadora de nitrogênio, endofítica, que se associa com plantas de interesse comercial, como milho, cana-de-açúcar e arroz, sem causar danos à planta hospedeira. *H. seropedicae* produz a auxina ácido indol acético (AIA), através de quatro possíveis vias, sendo que a proteína indol piruvato ferredoxina oxireductase (*Ior*), codificada pelo gene *ior*, está envolvida na rota indol-3-piruvato. Estudos mostraram que a expressão do gene *ior* (Hsero\_4278) é reprimida por naringenina e AIA. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a regulação deste gene utilizando a estirpe mutante T1A8 de *H. seropedicae* que apresenta uma fusão cromossomal *ior::lacZ* e fusões plasmidiais contendo a sequência promotora de *ior* e deleções de potenciais segmentos sinalizadores nesta região promotora. A expressão do gene *ior* na estirpe T1A8 foi monitorada durante 24 horas e observou-se uma alta expressão durante a fase estacionária de crescimento celular. A expressão de *ior* mostrou ser regulada negativamente por naringenina e AIA de forma dose-dependente. Outros compostos como triptofano, indol, e os flavonóides crisina e quercetina não apresentaram efeito sobre a expressão de *ior* nas condições testadas. Resultados obtidos com as fusões plasmidiais *ior::lacZ* também indicaram a expressão tardia do gene *ior*, sugerindo a participação do fator sigma S. Análises de sequência e deleções na região promotora do gene *ior* indicaram que a região -10 foi identificada a -315 pb a montante do códon de iniciação do gene *ior*, reforçando a transcrição dependente de sigma S.

## ABSTRACT

*Herbaspirillum seropedicae* is a Gram-negative diazotrophic bacterium which associates with important agricultural crops such as maize, sugar cane and rice without causing disease. *H. seropedicae* produces indol acetic acid (IAA) through four potential pathways, one of which is the indole-3-pyruvate route. This pathway involves the indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase enzyme (Ior) coded by the *ior* gene (Hsero\_4278). Previous results indicated that *ior* expression is repressed by naringenin and IAA. In this work we analyzed the expression of the *ior* gene using both chromosomal and plasmidial *ior::lacZ* fusion. Experiments performed using the *H. seropedicae* strain T1A8 which carries a chromosomal *ior::lacZ* fusion showed that *ior* expression occurs at stationary phase of cell growth under high ammonium concentration. It was observed that *ior* expression is negatively dose-dependent controlled by naringenin and IAA. The flavonoids quercetin and crisin and the compounds triptophan and indol have no effect on *ior* expression under our assay conditions. Results using plasmidial fusion *ior::lacZ* carrying different length of the *ior* promoter region also showed that expression occurs at stationary phase, suggesting the involvement of the RNA polymerase sigma S co-factor. A conserved -10 region was identified at -315 bp upstream of the initiation codon for the *ior* gene reinforcing a sigma S dependent transcription.

## 1. INTRODUÇÃO

A auxina constitui uma classe de fitohormônios de grande importância na coordenação do crescimento e desenvolvimento da planta. O ácido indol-3-acético (AIA) é a auxina mais abundante, atuando na regulação do crescimento vegetal por alongamento de caules jovens e coleótilos. Além disso, participa na regulação de dominância apical, da iniciação das raízes laterais, da abscisão foliar, da diferenciação vascular, na formação de gemas florais, da filotaxia e no desenvolvimento do fruto (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Estudos revelaram que não somente plantas são capazes de sintetizar AIA, mas também microrganismos como bactérias e fungos. Há um elevado grau de semelhança entre as vias de biossíntese de AIA em plantas e bactérias e com a análise de diversas espécies de bactérias têm-se identificado diferentes vias para síntese de AIA bacteriano (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

Nos últimos anos, o papel de AIA bacteriano na interação planta-bactéria tem sido investigado, e o AIA mostrou estar envolvido em diversos processos. A produção de AIA em *Agrobacterium tumefaciens* está relacionado com a formação do tumor na doença coroa de galha (LIU e NESTER, 2006), enquanto em *Azospirillum brasilense* o AIA está envolvido com a promoção de crescimento da planta hospedeira (DOBBELAERE *et al*, 1999). Duas classes de fatores parecem afetar a biossíntese de AIA bacteriano: o estresse ambiental (como pH ácido, estresse osmótico e da matriz) e a presença de compostos específicos da planta (BRANDL e LINDOW, 1997; COSTACURTA *et al*, 1998; BROEK *et al*, 1999).

Embora a análise de espécies bacterianas tenha identificado genes-chave envolvidos na biossíntese de AIA bacteriano, ainda é necessária a investigação de outros genes e seus produtos, em outras espécies bacterianas para o melhor entendimento da interação planta bactéria.

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, endofítica, encontrada em associação com plantas de interesse comercial, como milho, sorgo e arroz, e também a algumas espécies tropicais como a bananeira (*Musa spp*) e o

abacaxizeiro (*Ananas comosus*) (BALDANI *et al.*, 1986; CRUZ *et al.*, 2001). A interação *H. seropedicae*-planta estimula o desenvolvimento da planta e contribui com nitrogênio fixado (RONCATO-MACCARI, 2003a; BALDANI *et al.*, 2000). No entanto, pouco se sabe a respeito da biossíntese de AIA nesta bactéria, por este motivo o estudo se torna importante para melhor compreensão da interação planta-*H. seropedicae*. Este projeto tem como objetivo estudar a regulação do gene que codifica para proteína indolpiruvato ferredoxina oxirredutase (gene Hsero\_4278, *ior*) que pode estar envolvido na produção de AIA neste microrganismo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. AUXINA

A auxina foi o primeiro hormônio descoberto em plantas, sendo o ácido indol-3-acético (AIA) de ocorrência natural mais comum. A função principal da auxina é a regulação do crescimento por alongamento de caules jovens e coleótilos. Níveis baixos de auxina são também necessários para o alongamento da raiz, embora em concentrações mais altas esse hormônio atue como um inibidor do crescimento desse órgão. Além da função no crescimento, a auxina participa na regulação de dominância apical, da iniciação das raízes laterais, da abscisão foliar, da diferenciação vascular, na formação de gemas florais, da filotaxia e no desenvolvimento do fruto (KERBAUY, 2004, TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os estudos sobre a produção de AIA em bactérias começaram com a investigação da doença coroa de galha em plantas, sendo o microrganismo *Agrobacterium tumefaciens*, originalmente chamado de *Bacterium tumefaciens*, identificado como causador da doença (SMITH e TOWNSEND, 1907). Foi demonstrado que somente era possível produzir a doença na planta hospedeira por inoculação de *A. tumefaciens* (PHILIP e BRAUN, 1941). Posteriormente foi demonstrado *A. tumefaciens* como fonte de AIA (KAPER e VELDSTRA, 1958).

A formação de tumor induzida por *Agrobacterium tumefaciens* envolve a transferência de T-DNA, um específico segmento do plasmídeo responsável pela indução do tumor. O T-DNA codifica duas enzimas, uma converte o triptofano para AIA pela rota acetamida. A outra enzima está envolvida com a síntese de citocinina. A superprodução desses hormônios resulta na formação de tumores (LIU; NESTER, 2006).

A análise de novas espécies bacterianas tem mostrado um papel diversificado do AIA bacteriano na interação planta-bactéria. Anteriormente, pensava-se que a produção de AIA estava relacionada com a patogênese, mas estudos posteriores demonstraram que bactérias promotoras de crescimento também são capazes de sintetizar AIA (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Estudos com

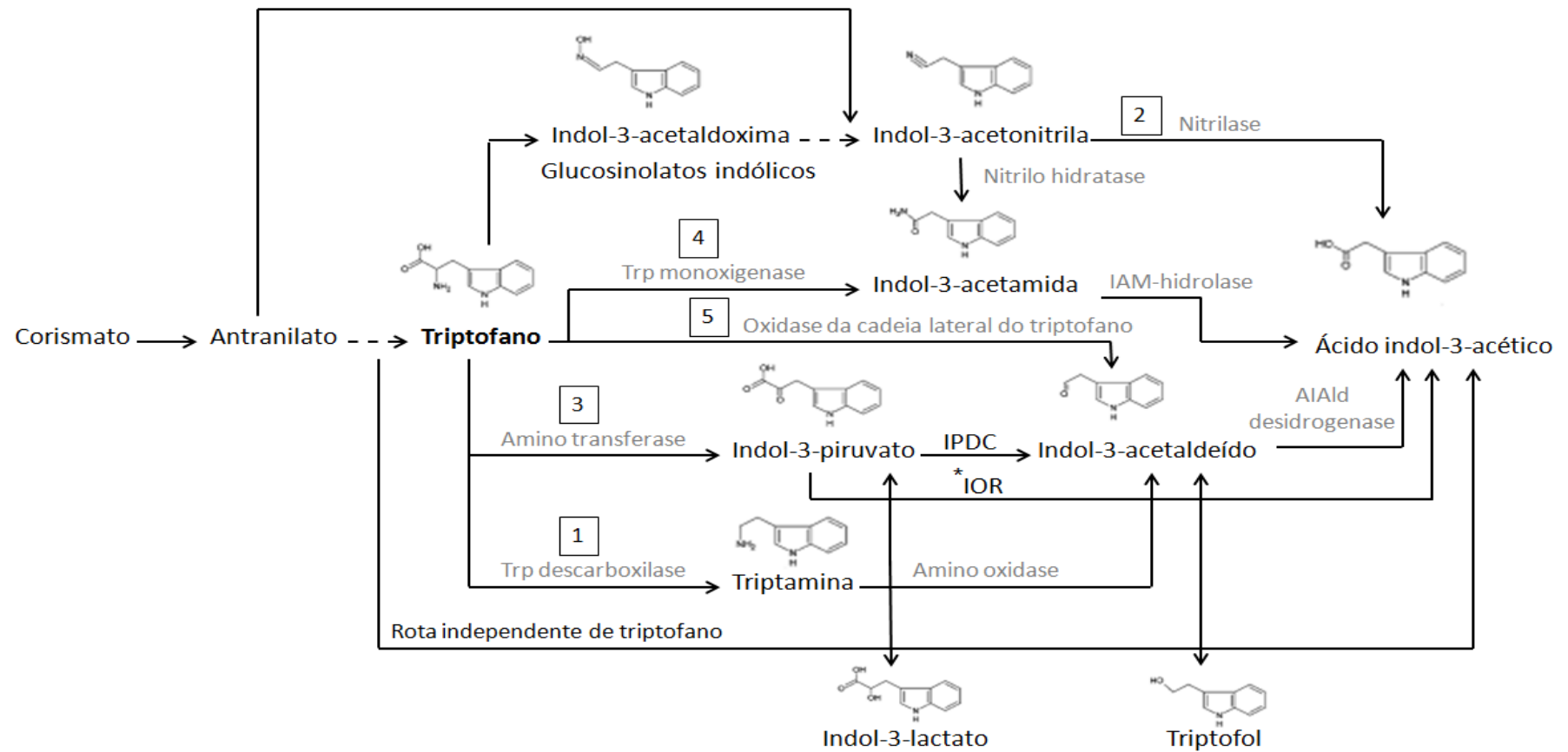
mutantes de *Azospirillum brasilense*, alterados na produção de AIA, apoiam a visão de que o aumento de enraizamento é causado pela síntese de AIA bacteriana (DOBBELAERE *et al*, 1999). O aumento do número de raízes laterais e pêlos radiculares aumentam a superfície da raiz, e isso resulta em uma maior absorção de nutrientes (LAMBRECHT *et al*, 2000; STEENHOUDT E VANDERLEYDEN, 2000).

A descoberta da auxina e seu importante papel geraram um interesse sobre as rotas de biossíntese de AIA e vias diferentes de biossíntese foram identificadas e uma similaridade para a biossíntese de AIA em plantas e bactérias foi encontrada (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Uma visão geral das rotas de biossíntese bacteriana de AIA é dada na figura 1.

Existem múltiplas rotas para a biossíntese de AIA, sendo que cinco caminhos utilizam o aminoácido triptofano (Trp) como precursor de AIA (Figura 01).

1) A rota da triptamina (TAM) ocorre tanto em plantas como em bactérias. Nas plantas inicia-se com a descarboxilação do triptofano a triptamina, a qual é convertida em indol-3-acetaldeído (IAld) que é então oxidado a AIA por uma desidrogenase (TAIZ; ZEIGER, 2009). Nas bactérias, a via TAM foi identificada em *Bacillus cereus* pela atividade de descarboxilase no triptofano (PERLEY e STOWE, 1966) e em *Azospirillum brasilense* por detecção da conversão de triptamina exógena para AIA (HARTMANN; SINGH; KLINGMÜLLER, 1983).

2) A rota indol-3-acetonitrila (IAN), onde a enzima nitrilase converte IAN a AIA. Duas rotas levam a formação de IAN a partir do triptofano: uma a via indol-3-acetaldoxima e a outra via glucosinolatos indólicos (ZHAO *et al*, 2001; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Nas plantas, esta rota parece ser importante em três famílias: Brassicaceae, Poaceae e Musaceae. Todavia, genes e atividade de nitrilase têm sido identificados nas famílias Cucurbitaceae, Solanaceae, Fabaceae e Rosaceae. Em bactérias, como *Alcaligenes faecalis* nitrilases tem sido detectada com especificidade para indol-3-acetonitrila (TAIZ; ZEIGER, 2009).



**FIGURA 1: Biossíntese bacteriana de AIA.** Visão geral das diferentes vias para síntese de AIA em bactérias. O intermediário refere-se ao nome da via ou a via em si é sublinhada com uma linha tracejada. Os números indicam as diferentes vias de síntese de AIA (veja texto). AIAld, indol-3-acetaldeído; IAM, indol-3-acetamida; IPDC, indol-3-piruvato descarboxilase; Trp, triptofano. \*Ramo na via indol-3-piruvato. Fonte: Spaepen; Vanderleyden; Remans, 2007-adaptado.



3) A rota indol-3-piruvato (IPyA) é sugerida ser a principal via em plantas, porém os principais genes e enzimas ainda não foram identificados. Em bactéria, a via IPyA tem sido descrita em vários gêneros de bactérias como *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium* e na bactéria fitopatogênica *Pantoea agglomerans* (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). O gene *ipdc*, que codifica uma enzima-chave desta via, indol-3-piruvato descarboxilase, foi isolado e caracterizado em *Azospirillum brasilense*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas putida* (BRANDL e LINDOW, 1996; BROEK *et al*, 1999; PATTEN e GLICK, 2002). O primeiro passo desta via é a conversão do triptofano em IPyA por uma aminotransferase, em seguida IPyA é descarboxilado a indol-3-acetaldeído (AIAld) por indol-3-piruvato descarboxilase. No último passo AIAld é oxidado a AIA (BRANDL e LINDOW, 1996).

4) A rota indol-3-acetamida (IAM) é a via melhor caracterizada em bactérias. Sendo que o triptofano é primeiro convertido para IAM pela enzima triptofano-2-monoxigenase. Posteriormente, IAM é convertido para AIA por uma IAM hidrolase. Na bactéria *Pseudomonas savastanoi* os genes que codificam para as duas enzimas foram clonados e caracterizados, sendo denominados *iaaM* para a triptofano-2-monoxigenase e *iaaH* e para a IAM Hidrolase (MORRIS, 1986). Estudos com outras bactérias como *Agrobacterium tumefaciens*, *Bradyrhizobium japonicum* e espécies de *Rhizobium* também encontraram genes referentes a esta via (SEKINE; WATANABE; SYONO, 1989; MORRIS, 1986; THEUNIS *et al*, 2004).

A rota IAM tem sido descrita como específica para bactérias, como nenhuma evidência para esta via foi encontrada em plantas, mas estudos têm proposto IAM como um composto endógeno de *Arabidopsis thaliana* (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

5) A rota oxidase da cadeia lateral do triptofano (TSO) só foi observado em *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Nesta via o triptofano é convertido diretamente para indol-3-acetaldeído, ignorando IPyA, e posteriormente é oxidado para AIA (OBERHANSLI *et al*, 1991). Não há indicações de que esta via ocorra em plantas (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

Entretanto, tem sido proposta uma rota independente de Triptofano, uma vez que estudos realizados com mutantes de *Arabidopsis thaliana* (defeito na triptofano

sintase alfa e beta que impede a conversão de indol para triptofano) revelaram um aumento nos níveis de AIA conjugado (LAST *et al*, 1991; NORMANLY *et al*, 1993). Estudo realizado com *Azospirillum brasilense* também indicou uma rota independente de triptofano para síntese de AIA (PRINSEN *et al*, 1993). No entanto, nenhuma enzima ligada a esta via foi caracterizada (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

## **2.2. FATORES QUE INFLUENCIAM A BIOSÍNTESE DE AIA EM BACTÉRIAS**

Existem inúmeros fatores que influenciam a biossíntese de AIA por bactérias. A primeira classe de fatores que podem alterar a produção de AIA bacteriana contém compostos específicos da planta ou a presença da superfície da mesma. Em *Xanthomonas axonopodis* a produção de AIA é aumentada na presença de extratos de folhas da planta *Citrus cinensis*, porém o composto responsável por essa indução ainda não foi identificado (COSTACURTA *et al*, 1998).

Um mecanismo de “feedback” positivo tem sido descrito para *A. brasilense* no qual o gene *ipdC* é responsivo a AIA (BROEK *et al*, 1999).

A segunda classe de fatores está relacionada ao estresse ambiental, incluindo pH ácido, estresse osmótico e da matriz e limitação de carbono. Em *Erwinia herbicola* o gene *ipdC* mostrou um aumento de 18 vezes em soluto e matriz de baixo potencial, e também o *ipdC* teve um aumento de 32 vezes nas folhas de feijão e tabaco. A regulação do *ipdC* pela baixa disponibilidade de água e, presumivelmente, a síntese de AIA está envolvida em uma resposta às condições encontradas por *E. herbicola* em seu habitat natural nas folhas (BRANDL; LINDOW, 1997).

Na bactéria *A. brasilense* a produção de AIA e a expressão do gene *ipdC* foram mostrados ser aumentada em condição de carbono limitante durante a redução na taxa de crescimento e sob condição de pH ácido. A limitação de carbono e a redução da taxa de crescimento estão associadas à entrada na fase estacionária, sendo assim uma superprodução de estresse pode estar relacionada

com o fator sigma RpoS da fase estacionária (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007).

### 2.3. INDOL PIRUVATO FERRODOXINA OXIRREDUTASE

A produção de AIA em bactérias possui diversas rotas, sendo que a proteína indol piruvato ferredoxina oxirredutase (lor) está envolvida na rota indol-3-piruvato (IPyA). Esta enzima utiliza a indol-3-piruvato como substrato convertendo diretamente em AIA (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007; PUYVELDE *et al*, 2011).

Estudos sobre a caracterização da proteína indolpiruvato ferredoxina oxirredutase foram realizados em espécies termofílicas como *Pyrococcus kodakaraensis* e *Pyrococcus furiosus* (MAI, ADAMS, 1994; SIDDIQUI *et al*, 1998). A enzima lor catalisa a descarboxilação oxidativa de arilpiruvato, que é gerado pela transaminação de aminoácidos aromáticos, em o seu correspondente aril acetil-CoA (MAI, ADAMS, 1994; SIDDIQUI *et al*, 1998). Em ambas as espécies termofílicas, a lor é um tetrâmero do tipo ( $\alpha_2\beta_2$ ) e sofre inativação por oxigênio (MAI, ADAMS, 1994; SIDDIQUI *et al*, 1998). Siddiqui e colaboradores (1998) sugerem que o ambiente de alta temperatura é importante para a formação do heteroligômero na espécie *Pyrococcus kodakaraensis*. A lor de *Pyrococcus* sp. KOD1 possui uma estrutura mosaica mostrando características de várias oxirredutases, a proteína nesta bactéria também é composta de duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo que a subunidade  $\beta$  mostra similaridade com as subunidade  $\gamma$  da piruvato ferredoxina oxirredutase (POR) e da 2-cetoisovalerato ferredoxina oxirredutase (VOR) de *P. furiosus*, e da POR em *Thermococcus litoralis*. A subunidade  $\alpha$  possui características das subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$  de POR e VOR (SIDDIQUI, FUJIWARA e IMANAKA, 1996).

Na bactéria *Pyrococcus kodakaraensis* dois genes são responsáveis pela codificação da proteína lor, os genes *iorA* e *iorB* que codificam respectivamente as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  (SIDDIQUI *et al*, 1998). Em *H. seropedicae* é provável que a lor seja codificada por um único gene (número de acesso no GenBank CP002039.1, gene Hsero\_4278, *ior*). A sequência deduzida de aminoácidos de lor em *H.*

*seropedicae* possui 1199 aminoácidos, em *P. furiosus* a subunidade  $\alpha$  possui 646 e a subunidade  $\beta$  214, e em *P. kodakaraensis* a subunidade  $\alpha$  tem 647 e a subunidade  $\beta$ , 226. A sequência de aminoácidos em *H. seropedicae* é maior quando comparada com as espécies termofílicas.

A sequência de aminoácidos deduzida de Ior de *H. seropedicae* mostra uma identidade 14,6% e similaridade de 23,6% com a subunidade  $\alpha$  de *P. furiosus* e uma identidade 13,7% e similaridade de 24,1% com a subunidade  $\alpha$  de *P. kodakaraensis*. Uma identidade de 5,2% e similaridade de 8% com a subunidade  $\beta$  de *P. furiosus* e identidade de 4,6% e similaridade de 7,6% com a subunidade  $\beta$  de *P. kodakaraensis*.

A Ior de *H. seropedicae* possui conservado o domínio de ligação para tiamina pirofosfato (TPP), localizado entre os aminoácidos nas posições 480 e 563. Outro domínio conservado é para POR localizado entre os aminoácidos 754 e 941.

Em *A. brasilense* foi verificado que a reação catalisada por esta oxirredutase constitui possivelmente um ramo nas vias de biossíntese de AIA devido à conversão direta do indol-3-piruvato. A interrupção da via de biossíntese de AIA mais importante em *A. brasilense* (através da mutação no gene *ipdC*) mostra uma diminuição de 90% na produção de AIA, a via adicional IAM pode ser a responsável pelo remanescente de 10%. Além disso, é possível que uma fração possa ser resgatada por este ramo desconhecido nas vias de biossíntese de AIA (LAMBRECHT *et al*, 2000; PUYVELDE *et al*, 2011).

Pedrosa e colaboradores (2011) sequenciaram o genoma *H. seropedicae* SmR1 e investigaram os genes potencialmente envolvidos na produção de AIA. Foram propostos quatro caminhos possíveis para a biossíntese de AIA a partir do Triptofano, sendo a rota mais provável a via indol-3-piruvato, na qual o AIA é catalisado pela triptofano transaminase e indolpiruvato ferredoxina oxirredutase. Genes para o metabolismo de outras possíveis rotas também estão presentes: 1) triptofano para indol acetato via indol-3-acetamida; 2) indol-3-acetamida para indol acetato via indol-3-acetonitrila, e 3) triptofano para indol acetato via triptamina e indol-3-acetaldeído.

Mutantes do microorganismo *H. seropedicae* foram construídos (TADRASFEIR, 2008) através da estratégia de mutagênese aleatória utilizando transposon

com gene repórter sem promotor para a identificação de genes envolvidos na interação planta-bactéria. Estas estirpes mutantes foram crescidas na presença do flavonóide naringenina, condição que pode mimetizar aquelas encontradas durante a interação da bactéria com a planta. Através desta abordagem foi possível identificar genes regulados por naringenina, dentre estes, o gene que codifica para a indolpiruvato ferredoxina oxirredutase (*ior*), o qual é regulado negativamente na presença de naringenina. Além disso, a expressão deste gene foi inibida na presença de AIA (TADRA-SFEIR, 2008). A expressão diferencial na presença de naringenina também foi confirmada através de PCR em Tempo Real e análise de transcriptoma (TADRA-SFEIR, 2011). Assim, torna-se interessante estudar a regulação do gene que codifica para *lor* em *H. seropedicae* para melhor entendimento na comunicação entre a bactéria e a planta hospedeira.

#### **2.4. *Herbaspirillum seropedicae***

O *Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria gram-negativa, geralmente vibrióide, algumas vezes helicoidal e móvel. Apresenta 0,6 a 0,7 µm de diâmetro, 1,5 a 5 µm de comprimento e possui de um a três flagelos em um ou ambos os pólos. É um microrganismo capaz de fixar nitrogênio sob condições microaeróbicas e em uma ampla faixa de pH (5,3 a 8,0) (BALDANI *et al.*, 1986). *Herbaspirillum seropedicae* foi originalmente isolado no Brasil de tecidos internos de raízes de milho, sorgo e arroz por Baldani e colaboradores (1986). Também identificaram esta bactéria, através da caracterização do gene 16sRNA de isolados de colmo, folhas, raízes e frutos de abacaxi (*Ananas comosus*) e banana (*Musa* sp.) (CRUZ *et al.*, 2001).

O início da colonização por *H. seropedicae* ocorre através da adesão da bactéria à superfície das raízes. O acesso ao interior acontece nos pontos de emergência de raízes secundárias e ferimentos da epiderme, e a disseminação ocorre através dos espaços intercelulares e feixes vasculares das partes aéreas e posteriormente, ocorre o estabelecimento do microrganismo nos vasos do xilema (JAMES *et al.*, 1997; RONCATO-MACCARI, 2003b).

A capacidade de *H. seropedicae* em formar uma associação com gramíneas de interesse econômico, sem provocar doença, tem despertado interesse para seu estudo. Vários trabalhos demonstraram que essa interação pode trazer benefícios à planta. Baldani e colaboradores (2000) e Roncato-Maccari e colaboradores (2003a) observaram que a inoculação de arroz com esta bactéria promove um aumento de conteúdo de nitrogênio em grãos e aumento de crescimento de raízes. Tem sido sugerido que organismos endofíticos expressam melhor seu potencial de fixação de nitrogênio dentro de tecidos vegetais devido à menor competição de nutrientes e proteção contra os altos níveis de oxigênio presentes na superfície da raiz (*apud* BALDANI *et al*, 2000).

*H. seropedicae* tem grande potencial como biofertilizante (PEDROSA *et al.*, 2001). Além de produzir compostos que podem estimular o desenvolvimento das plantas pela produção de fitohormônios, como auxinas e giberelinas (BASTIÁN *et al.*, 1998). Assim é importante a melhor compreensão da relação deste microrganismo com a planta hospedeira, fazendo importante o estudo da biossíntese de AIA em *H. seropedicae*.

### 3. JUSTIFICATIVA

O AIA bacteriano tem demonstrado possuir uma papel diversificado na interação planta-bactéria. Anteriormente, pensava-se que a produção de AIA estava relacionada com a patogênese, mas estudos posteriores demonstraram que bactérias promotoras de crescimento vegetal também são capazes de sintetizar AIA (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007; LIU e NESTER, 2006; ALONI *et al*, 1995; LAMBRECHT *et al* , 2000; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; DOBBELAERE *et al*, 1999).

O sequenciamento do genoma de *H. seropedicae* mostrou que esta bactéria possui genes envolvidos na produção de AIA. Sendo propostos quatro caminhos possíveis para a biossíntese de AIA a partir do Triptofano, sendo a rota mais provável a via indolpiruvato, na qual a produção de ácido indol-acético é catalisada pela triptofano transaminase e indolpiruvato ferredoxina oxirredutase. Genes para o metabolismo de outras possíveis rotas também estão presentes: 1) triptofano para indol acetato via indol-3-acetamida; 2) indol-3-acetamida para indol acetato via indol-3-acetonitrila, e 3) triptofano para indo lacetato via triptamina e indolacetaldeido (PEDROSA *et al*, 2011). No entanto, pouco se sabe a respeito da produção de AIA em *H. seropedicae*, mas um estudo sobre a regulação de genes pelo flavonóide naringenina revelou que o gene que codifica para indolpiruvato ferredoxina oxirredutase é negativamente regulado por este flavonóide (TADRA-SFEIR, 2008). Além disso, a expressão deste gene foi inibida na presença de AIA e ativada na presença de alta concentração de amônio (TADRA-SFEIR, 2008).

Assim, o objetivo geral deste trabalho é contribuir para o esclarecimento da regulação do gene *ior* (Hsero\_4278) que codifica para proteína indolpiruvato ferredoxina oxirredutase (*Ior*) em *H. seropedicae*, analisando a região promotora e verificando a expressão gênica sob diferentes condições.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

Estudar a regulação do gene Hsero\_4278 que codifica para proteína indolpiruvato ferredoxina oxirredutase (*lor*) em *Herbaspirillum seropedicae*.

### 4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Clonar segmentos da região promotora do gene *lor* em vetores com o gene repórter para construção de fusões *lor::lacZ*

4.2.2. Análisar a expressão de *lor* em condições de baixa e alta concentração de nitrogênio.

4.2.3. Análisar a expressão de *lor* em resposta a triptofano, ácido indol-3-acético, indol e dos flavonóides naringenina, crisina e quercetina.



## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As estirpes de bactérias e plasmídeos utilizados estão listadas nas tabelas 01, 02 e 03.

**TABELA 01 - *Herbaspirillum seropedicae***

<b>Estirpe</b>	<b>Referência</b>
SmR1 (selvagem)	MACHADO <i>et al.</i> , 1996
T1A8 (SmR1 contendo uma fusão cromossomal <i>ior::lacZ</i> )	TADRA-SFEIR, 2008

**TABELA 02 – *Escherichia coli***

<b>Estirpe</b>	<b>Referência</b>
ET8000	Mac Neil, 1981
S17.1	SIMON <i>et al.</i> , 1983
DH10B	GRANT <i>et al.</i> , 1990
Top 10	INVITROGEN

**TABELA 03 - Plasmídeos**

<b>Plasmídeos</b>	<b>Características</b>	<b>Referências</b>
pGEM-T Easy	Vetor de clonagem TA, lacZ, Amp <sup>R</sup> .	PROMEGA
pTZ57R/T	Vetor de clonagem TA, lacZ, Amp <sup>R</sup> .	FERMENTAS
pMP220	Tc <sup>R</sup> , vetor de fusão transcricional lacZ.	SPAINK <i>et al.</i> , 1987
pGEM <i>promotor</i>	pGEM contendo um fragmento BglII/EcoRI de 905 pb com a provável região promotora do gene <i>ior</i>	este trabalho
pTZΔ <i>ntrC</i>	pTZ contendo um fragmento BglII/EcoRI de 465 pb com a provável região promotora do gene <i>ior</i>	este trabalho
pTZΔ <i>ntrC</i> Δ <i>s54</i>	pTZ contendo um fragmento BglII/EcoRI de 285 pb com a provável região promotora do gene <i>ior</i>	este trabalho
pMP <i>promotor</i>	pMP220 contendo um fragmento BglII/EcoRI de 905 pb com a provável região promotora do gene <i>ior</i>	este trabalho
pMPΔ <i>ntrC</i>	pMP220 contendo um fragmento BglII/EcoRI de 465 pb com a provável região promotora do gene <i>ior</i>	este trabalho
pMPΔ <i>ntrC</i> Δ <i>s54</i>	pMP220 contendo um fragmento BglII/EcoRI de 285 pb com a provável região promotora do gene <i>ior</i>	este trabalho

## 5.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37°C em meio Luria-Broth (LB), meio Luria-Broth Agar (LA) (SAMBROOK *et al.*, 1989) e Nitrogen-Free Davis e Mignoli (NFDM) (CANNON, DIXON e POSTGATE, 1974). O meio LB possui a seguinte composição: 5g/L de extrato de levedura; 10g/L de NaCl; 10g/L de triptona. O meio sólido (LA) foi obtido pela adição de ágar (15g/L) ao meio líquido (LB). O meio NFDM possui a seguinte composição: 0,1 g/L de MgSO<sub>4</sub>; 0,025 g/L de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,025 g/L de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. No momento do uso, para o preparo do inóculo, o meio NFDM foi modificado pela adição de 20 g/L de glucose, 12,06 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 3,4 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, e 20 mmol/L ou 2 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl.

As estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* foram cultivadas a 30°C sob agitação constante em meio NFbHP, utilizando malato (KLASSEN *et al.*, 1997) como fonte de carbono e 20 mmol/L ou 2 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl como fonte de nitrogênio. A sigla NFbHP refere-se a composição do meio, onde HP significa alto fosfato. O meio com fosfatos e NH<sub>4</sub>Cl é denominado NFbHPN Malato.

O meio NFb malato possui a seguinte composição: 0,2 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 g/L NaCl; 0,02 g/L CaCl<sub>2</sub>; 0,056 g/L ácido nitrilo-triacético; 0,02 g/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 5 g/L ácido málico; 0,0002 g/L biotina; 0,002 g/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,00235 g/L MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,0028 g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,00008 g/L CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 0,00024 g/L ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O). O pH do meio foi acertado para 6,5 pela adição de KOH 3 mol/L. Para o meio sólido foram adicionados 15 g/L de ágar e para o meio semi-sólido, 1,5 g/L. No momento do uso foram adicionados 50 mL/L de solução de fosfatos (17,8 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 159,5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

Após o preparo, todos os meios foram autoclavados por 20 minutos a 120 °C. As soluções de fosfatos e cloreto de amônio utilizadas para cultivo de *H. seropedicae* foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio no momento do uso.

### 5.3. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados para seleção de estirpes bacterianas e suas concentrações estão listados na tabela 04:

**TABELA 04- ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS**

	Concentração utilizada na seleção de <i>H. seropedicae</i> (µg/mL).	Concentração utilizada na seleção de <i>E. coli</i> (µg/mL).
Ampicilina (Amp)	-	250
Ácido Nalidíxico (Nal)	-	5
Estreptomicina (Sm)	80	20
Canamicina (Km)	100	-
Tetraciclina (Tc)	10	10

As soluções estoques dos antibióticos ampicilina, ácido nalidíxico, estreptomicina e canamicina foram preparadas em água ultrapura e esterilizadas por filtração (Millipore 0,22 µm). As soluções estoques de tetraciclina foram preparadas em etanol 50%. As soluções de antibióticos foram armazenadas a -20°C.

### 5.4. ARMAZENAMENTO DAS ESTIRPES BACTERIANAS

A suspensão de células das estirpes de *E. coli* foi estocada em glicerol 50% a -20°C, enquanto que as estirpes de *H. seropedicae* foram armazenadas em meio

NFb-Malato semi-sólido suplementado com 20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl a temperatura ambiente.

## 5.5. AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR

A técnica da reação da polimerização em cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) permite obter um fragmento específico de DNA por meio de sua duplicação em modo exponencial, a partir de uma pequena quantidade de DNA molde (NELSON e COX, 2006). Os iniciadores foram sintetizados quimicamente pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT) e continham sítios de restrição para facilitar a subclonagem.

As reações de amplificação foram feitas em termociclador Mastercycler® (Eppendorf) e os sistemas de reação continham enzima *Taq* DNA polimerase 1-5 unidades por reação de 20-100µL, tampão de PCR 10 X *Taq* Buffer + KCl (100 mM Tris-HCl (pH8,8); 500 mM KCl; 0,8% (v/v) Nonidet P40) ou 10X *Taq* Buffer + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (750 mM Tris-HCl (pH8,8); 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,1% (v/v) Tween 20), dNTP 0,2 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mmol/L e 5-10 pmol de oligonucleotídeos iniciadores (AZEVEDO *et al*, 2003-adaptado). Em alguns sistemas foram adicionados dimetilsulfóxido (DMSO) (5%) ou betaína (1M). Os parâmetros de ciclos de amplificação variaram conforme os oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

## 5.6. PURIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *H. seropedicae*

Dez mililitros de uma cultura saturada de *H. seropedicae* crescida em NFbHPN foi centrifugada a 4000 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento de células foi lavado uma vez com 10mL de GET (50 mmol/L glucose, 25 mmol/L Tris.HCl pH 8.0, 10 mmol/L EDTA) e, em seguida, foi ressuspensionado em 1 mL da mesma solução. A suspensão de células foi incubada com lisozima (10 µg/mL) a 30°C por 5 horas. Em seguida, foram adicionados 100 µL de SDS 10% e esta solução foi

incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a lise celular, foi adicionado Proteinase K (50 µg/mL) e a mistura foi incubada a 37°C durante a noite.

Após digestão com proteinase K, a solução de DNA foi extraída com 500 µL de fenol equilibrado (pH 8,0). A fase aquosa foi recuperada após centrifugação por 15 minutos e novamente extraída com 500 µL de uma mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). A fase aquosa foi novamente recuperada após centrifugação e extraída com 500 µL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O DNA genômico foi precipitado com um volume de isopropanol, depois lavado com 1 mL etanol 70%. Depois de seco a vácuo, o DNA foi dissolvido em 30 µL de água ultrapura autoclavada.

## 5.7. PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

A purificação de plasmídeos a partir de culturas bacterianas foi realizada pelo método de lise alcalina modificado (SAMBROOK *et al.*, 1989). Um mililitro e meio de uma cultura de *E. coli* cultivada durante aproximadamente 12 horas foi centrifugado a 13.400 rpm por 1 minuto em microcentrífuga MiniSpin® (Eppendorf). O sedimento de células foi ressuspensão em 150 µL de tampão GET. A lise bacteriana foi feita utilizando 150 µL de solução de lise contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% e NaOH 180 mmol/L e homogenizados vagarosamente. Em seguida 150 µL da solução Kacf (acetato de potássio 3 mol/L e ácido fórmico 1,8 mol/L, pH 4,8) foram acrescentados e após homogeneização a mistura foi mantida 10 minutos no gelo. As amostras foram centrifugadas a 13.400 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi separado e extraído com 150 µL de fenol clorofórmio álcool-isoamílico (25:24:1) e a mistura centrifugada a 13.400 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, o DNA foi precipitado pela adição de 2 volumes de etanol 94%, seguido de centrifugação a 13.400 rpm por 5 minutos. O DNA plasmidial foi então lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado a 13.400 rpm por 5 minutos, seco e dissolvido em água ultrapura.

## **5.8. DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO**

Uma a cinco unidades de enzimas de restrição foram utilizadas para digestão de 0,2 a 1 µg de DNA em um volume final de 10 µL, durante 4 horas nas condições especificadas pelo fabricante. O DNA digerido foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (Tris base 40 mmol/L; ácido acético 40 mmol/L; EDTA 2 mmol/L; pH 8,0). As amostras foram diluídas em tampão EFSuds (azul de bromofenol 0,025%; xilenocianol 0,025%; SDS 0,1%; Ficoll® 20% em tampão T10E1) (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Para preparação de vetores para clonagem, a digestão com as enzimas de restrição adequadas foi realizada de acordo com as recomendações dos fabricantes. Após a digestão, as enzimas foram desnaturadas por tratamento térmico ou extração com clorofórmio, como indicado pelo fabricante. O DNA digerido foi precipitado com etanol absoluto, lavado com etanol 70%, seco e dissolvido em água ultrapura (SAMBROOK *et al.*, 1989).

## **5.9. LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA E VETORES**

O vetor linearizado e o inserto foram incubados numa razão molar de 1:5 numa reação de ligação. Para a reação foram adicionados, além do DNA, o tampão de ligação (fornecido pelo fabricante) e 0,5 U de T4 DNA ligase (Fermentas). O sistema foi incubado a 16°C durante a noite.

## **5.10. ELETROFORESE DE DNA**

A eletroforese de DNA foi feita em gel de agarose horizontal como descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989). O tampão utilizado foi TAE 1X. Após o tempo de corrida, o gel foi incubado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 15 minutos e o DNA visualizado sob luz ultravioleta (302 nm) em transiluminador UV. As imagens foram obtidas utilizando o EC3™ Imagem System - UVP Biolmaging Systems.

## **5.11. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA**

### **5.11.1. Preparo de células competentes**

O método para transformação bacteriana foi realizada segundo Chung, Niemela e Miller (1989). Alíquotas de 5 mL de cultura de *E. coli* foram cultivadas em meio LB na presença de antibióticos a 37°C sob agitação constante (180 rpm) por, aproximadamente, 16 horas. Cinquenta microlitros deste pré-inoculo foram transferidos para um frasco contendo 5 mL de meio LB (proporção 1:100). Esta cultura foi incubada a 37°C sob agitação até atingir uma D.O.<sub>600</sub> entre 0,2 e 0,5. A cultura foi mantida em gelo por 10 minutos, aliquotada em tubos (1 mL) e centrifugada a 13,400 rpm a 4°C por 1 minuto em microcentrífuga MiniSpin® (Eppendorf). O sedimento de células foi ressuspenso em 100µL de solução estéril de TSS (10% PEG8000, 30mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 20% DMSO e meio LB) e utilizada para a transformação. Esta preparação foi sempre realizada no mesmo dia para a transformação.



### **5.11.2. Transformação bacteriana por choque térmico**

Dez microlitros de reação de ligação de DNA-inserto, conforme item 5.9, foram misturados aos 100 µL de células competentes e incubados por 30 minutos em banho de gelo. A mistura foi submetida a um choque térmico incubando-a por 30 segundos a 42°C e posteriormente em banho de gelo por 2 minutos. Após o choque térmico, foi adicionado 1 mL de meio de LB e a suspensão de células incubada a 37°C por 1 hora para recuperação, sem agitação. Alíquotas de 100 µL da suspensão foram plaqueadas em meio LA contendo antibiótico adequado.

### **5.12. SUBCLONAGEM DA REGIÃO PROMOTORA ÍNTEGRA E DELETADA**

Os plasmídeos pGEMpromotor, pTZΔntrC e pTZΔntrCΔs54 foram digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e BglII para a liberação dos fragmentos desejados, os quais foram analisados em gel de agarose 1%. Após esta reação de restrição, as enzimas foram desnaturadas por tratamento térmico, como indicado pelo fabricante. O DNA digerido foi precipitado com etanol absoluto, lavado com etanol 70%, seco e dissolvido em água ultrapura (SAMBROOK *et al.*, 1989). Esta amostra foi utilizada para ligação com o vetor pMP220 seguindo procedimento descrito no item 5.8. A seleção de clones foi feita por antibiótico seletivo, uma vez que o vetor pMP220 confere resistência a tetraciclina. Finalmente, os clones foram confirmados por digestão com enzimas de restrição e sequenciamento.

### **5.13. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE DNA**

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia utilizando didesoxirribonucleotídeos (SANGER *et al.*, 1977). As amostras

foram sequenciadas utilizando o sequenciador automático 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystem).

Este método foi utilizado para a confirmação das sequências de DNA clonadas nos vetores pGEM ou pTZ57R/T e subclonado no vetor pMP220. Para os clones em pGEM ou pTZ57R/T o sequenciamento foi feito utilizando os *primers* *M13/pUC* forward (-20) (5'GTAAAACGACGGCCAGT3') e *M13/pUC* reverse (-26) (CAGTATCGACAAAGGAC3'), e para os clones em pMP220 foi utilizado o *primer* *lacZrev* (5'GCAAGGCGATTAAGTTGGGT3').

A reação de sequenciamento foi feita com aproximadamente 250 ng de DNA, 0,5 µL (10 pmol) de primer Universal ou Reverso ou *lacZrev*, 3µL de tampão Save Money, 1 µL de Big Dye e água ultrapura para completar a reação para 10 µL. Reação em termociclador teve os seguintes parâmetros: 1 ciclo de 1 minutos a 96°C para a abertura inicial da dupla fita de DNA; 25 ciclos de 15 segundos a 94°C para a abertura das fitas, 15 segundos nas temperaturas de cada oligonucleotídeos para o anelamento com a fita de DNA, e 4 minutos a 72°C para a extensão da fita nascente.

O produto da reação foi precipitado com adição de 12,5 µL de água ultrapura, 60 µL de isopropanol e 3 µL de acetato de amônio 7,5 M. Depois foi centrifugado por 45 minutos, o DNA foi lavado com 150 µL de etanol 70% e centrifugado por 15 minutos. Depois de seco, as amostras foram ressuspensas em solução adequada e aplicada no sequenciador automático.

#### **5.14. CONJUGAÇÃO BACTERIANA**

A estirpe de *E. coli* S17.1 (doadora) contendo o plasmídeo a ser transferido e a estirpe SmR1 de *H. seropedicae* (receptora) foram cultivadas em meio LB e NFbHPN malato, respectivamente, próprio por 16 horas, sob temperatura adequada e agitação constante. As estirpes foram re-inoculadas numa proporção 1/50 (receptora) e 1/100 (doadora) e cultivadas em meio sem antibiótico, sendo que a

receptora por 6 horas e a doadora por 3 horas, sob agitação constante e temperatura adequada.

Cinco microlitros da estirpe doadora foram misturados com 50  $\mu$ l da estirpe receptora. Esta mistura foi depositada em forma de gota em meio NFbHPN malato com LA na proporção de 3 para 1. As placas foram incubadas a 30°C, por aproximadamente 16 horas. A massa de células foi raspada e ressuspensa em 1mL de meio NFbHPN líquido e, então, 100  $\mu$ L desta suspensão foram plaqueadas em NFbHPN malato sólido na presença de antibiótico seletivo para a seleção dos transconjugantes. As placas foram incubadas a 30°C, até a visualização das colônias dos transconjugantes.

## **5.15. DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *ior***

A expressão do gene *ior* foi analisada pela determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase de clones contendo a região promotora íntegra e deletada fusionada com o gene *lacZ* crescidos em meio líquido. Para a determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase de culturas crescidas em meio líquido foi utilizado como substrato o *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG), cuja hidrólise produz galactose e *o*-nitrofenol, sendo que este último pode ser quantificado por espectrofotometria.

### **5.15.1. Determinação da atividade de $\beta$ -galactosidase**

O protocolo para determinar a atividade de  $\beta$ -galactosidase de uma cultura seguido o procedimento descrito por Miller (1972) adaptado. Os clones foram crescidos a 30°C durante 12 horas em 5 mL de meio NFbHP malato contendo 2 mmol/L ou 20 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  na presença ou ausência de naringenina, crisina, quercetina, AIA, indol e triptofano. Cem microlitros desta cultura foram misturados

com 900  $\mu\text{L}$  de tampão Z e 25  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e incubados por 10 minutos à 30°C. Foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG 4 mg/mL em tampão Z) para iniciar a reação e após visualização de coloração amarela a reação foi interrompida pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 mol/L. Os tubos de reação foram centrifugados a 13.400 rpm por 5 minutos em minicentrífuga MiniSpin® (Eppendorf) e então a leitura de absorbância foi feita a 415 e 550 nm.

A atividade específica de  $\beta$ -galactosidase é apresentada em nanomols de *o*-nitrofenol (ONP) formado por minuto por miligrama de proteína total (nmol ONP/min/mg proteína).

## **5.16. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA**

A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por BRADFORD (1976).

### **5.16.1. Determinação da concentração de proteína em placa de 96 poços**

Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de cultura de *H. seropedicae* foram transferidas para os poços de um bloco de 96 poços contendo 50  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,2 mol/L. O bloco foi vedado com adesivo, a solução homogenizada suavemente e incubada por pelo menos 30 minutos a 37°C. Após incubação, desta solução foram transferidos 30  $\mu\text{L}$  para placas de ELISA e adicionados 170  $\mu\text{L}$  de reativo de Bradford (Sigma), e então a leitura de absorbância foi feita a 595 nm em leitor de microplaca. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A curva padrão foi construída utilizando albumina de soro bovino (BSA) em concentrações de 0,6  $\mu\text{g}$  até 6  $\mu\text{g}$ .

## 5.17. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DE IOR

A comparação de sequências entre a proteína Ior de *H. seropedicae* e as espécies termofílicas *P. furiosus* e *P. kodakaraensis* foi realizada através de EMBOSS Needle, o qual lê duas sequências de entrada e escreve uma sequência ótima de alinhamento global. As sequências de aminoácidos de cada proteína foram obtidas através do GenBank, sendo o número de acesso para Ior de *H. seropedicae* YP\_003777655.1. Os números de acesso para as subunidades alfa e beta de Ior de *P. furiosus* são AAL80657.1 e AAL80658.1, respectivamente. Os números de acesso para as subunidades alfa e beta de *P. kodakaraensis* são BAA20528.1 e BAA20529.1, respectivamente.

Para realizar a busca de domínios conservados na Ior de *H. seropedicae* foi utilizado o banco de dados Pfam, o qual possui uma grande coleção de famílias de proteínas.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

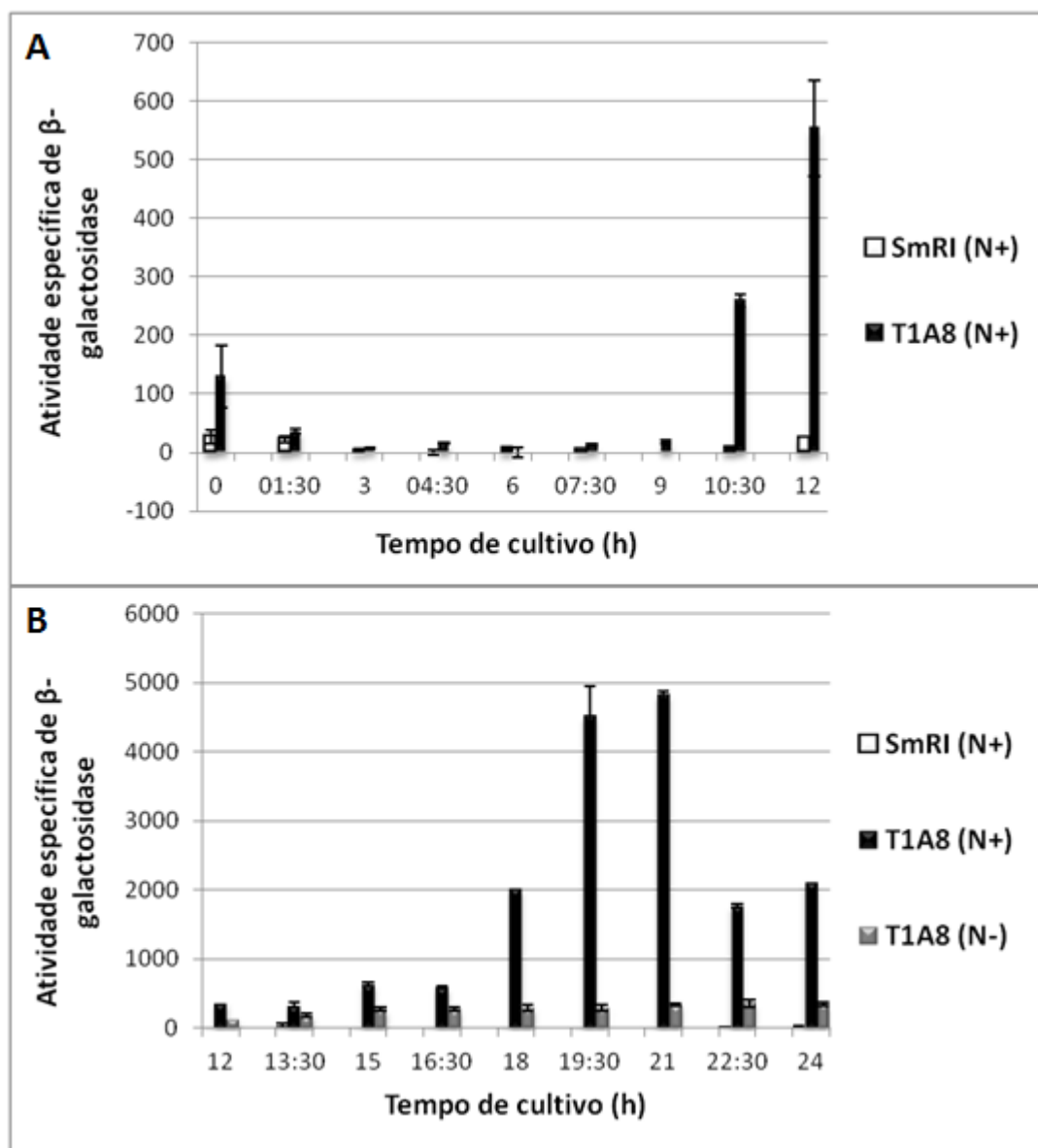
A estirpe T1A8 foi obtida através da mutação aleatória por inserção de transposon TnMod-OGmKm/*lacZ* no genoma de *H. seropedicae* SmR1 (TADRA-SFEIR, 2008) e seleção por expressão diferencial frente ao flavonóide naringenina. Esta estirpe possui a inserção do transposon TnMod-OGmKm/*lacZ* localizado no gene Hsero\_4278 que codifica para a proteína indolpiruvato ferrodoxina oxirredutase (TADRA-SFEIR, 2008), denominada neste trabalho como Ior. A proteína Ior pode estar relacionada à síntese de ácido indolacético (AIA), uma auxina que constitui uma classe de fitohormônios de grande importância na coordenação do crescimento e desenvolvimento da planta.

Utilizando o gene repórter *lacZ* presente no transposon, Tadra-Sfeir (2008) verificou que a expressão do gene *ior* ocorre em início de fase estacionária e em condições de alta concentração de nitrogênio e é regulado negativamente por naringenina. Neste trabalho analisamos a regulação da expressão do gene *ior* em *H. seropedicae*.

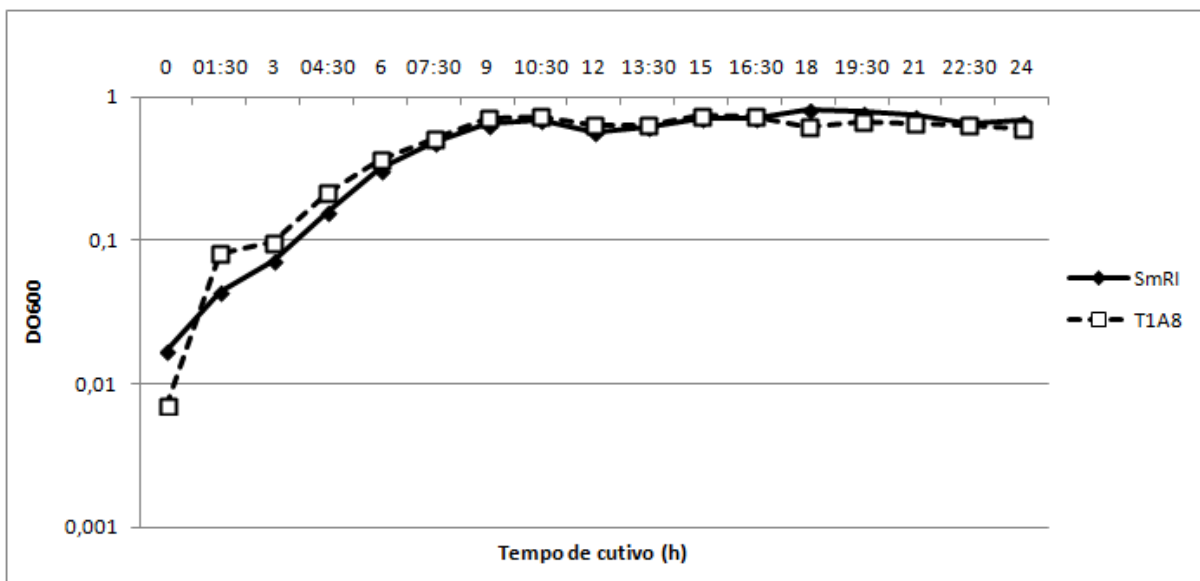
### 6.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *IOR* NO MUTANTE T1A8

A estirpe T1A8 de *H. seropedicae* possui o gene repórter *lacZ* sob controle do promotor do gene *ior*. Utilizando esta estirpe mutante, procuramos verificar a expressão de *ior* dependente da fase de crescimento (Figura 3). Este experimento foi conduzido na presença de alta ou baixa concentração de amônio (20 ou 2 mmol/L NH<sub>4</sub>Cl, respectivamente). A estirpe selvagem (SmR1) não apresentou atividade de β-galactosidase em nenhuma condição testada, no entanto, a estirpe T1A8 apresentou atividade elevada após 18 a 21 horas de cultivo na presença de alta concentração de amônio, indicando que a expressão de *ior* é tardia (Figura 2 e 3). A expressão do gene *ior* em fase estacionária de crescimento semelhante ao observado em estudos realizado com espécies de *Azospirillum brasilense*, *A.*

*lipoferum* e *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* os quais mostram que os níveis de AIA variam durante o crescimento bacteriano, sendo a maior produção de AIA durante a fase estacionária. (BROEK *et al*, 1999; PRINSEN *et al*, 1993; RADWAN., MOHAMED e REIS, 2004).



**Figura 2: Atividade específica de  $\beta$ -galactosidase da estirpe mutante T1A8 durante 24 horas de cultivo. Painel A, representa as 12 primeiras horas de cultivo. Painel B, representa de 12 a 24 horas de cultivo. Os valores correspondem a média da atividade específica de  $\beta$ -galactosidase de cada estirpe mutante testada em duplicata e expressa em nmol ONP/min/mg proteína, com intervalos de desvio padrão. A legenda N+ representa a condição de cultivo em alta concentração de amônio (20 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) e N- a condição de baixa concentração (2 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ).**



**Figura 03: Curva de crescimento durante 24 horas das estirpes SmRI e T1A8.** As culturas foram crescidas em meio NFbHPN Malato contendo 20 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . O crescimento foi acompanhado através de absorbância em 600 nm utilizando leitor de microplaca.

Fatores diversos podem estar envolvidos com a síntese de AIA bacteriano como estresse ambiental, osmótico, concentração do precursor (triptofano), concentração do próprio AIA, entre outros fatores (BRANDL e LINDOW,1997; COSTACURTA *et al*, 1998; BROEK *et al*, 1999; RADWAN, MOHAMED & REIS, 2004).

Para analisar a expressão de *ior* em resposta a triptofano, indol, ácido indol-3-acético e dos flavonóides naringenina, crisina e quercetina, foi escolhida uma condição na qual o gene tivesse alta expressão. Sendo assim, para os testes em diferentes compostos a estirpe T1A8 foi cultivada por 20h em alta concentração de amônio. Os diferentes compostos testados foram adicionados no momento do preparo do inóculo.

Flavonóides é a designação dada a um grande grupo de metabólitos secundários da classe dos compostos fenólicos (LEPINIEC *et al.*, 2006). Os flavonóides estão envolvidos em diversos processos, sendo um deles a interação planta-bactéria (BAIS *et al.*, 2006).

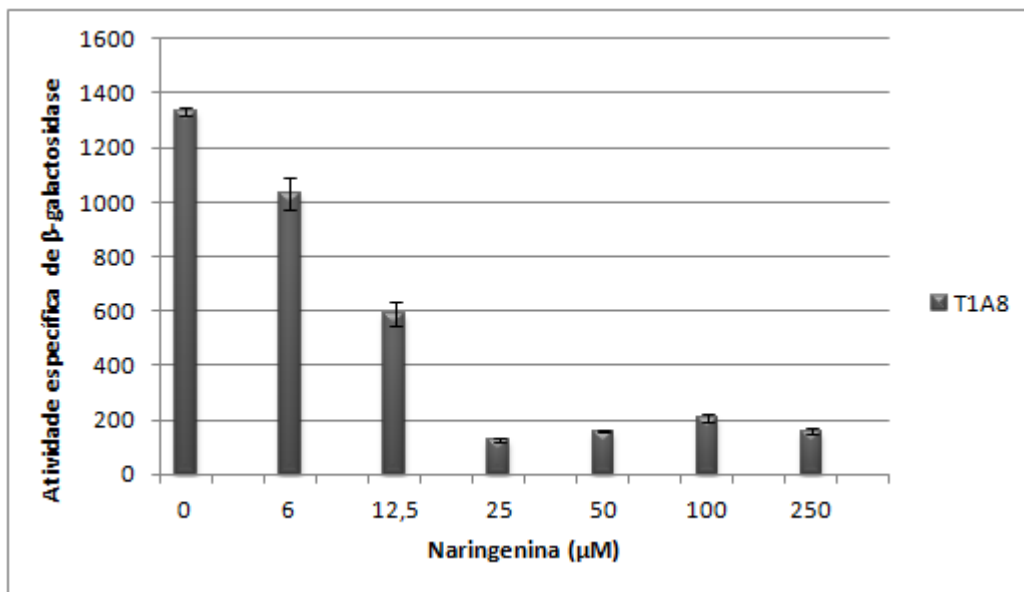


Por exemplo, os flavonóides ativam a transcrição dos genes de nodulação envolvidos na biossíntese de oligossacarídeo lipoquitinicos, chamados de fatores Nod, de organismos como *B. japonicum* e *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli*. Uma grande variedade de flavonóides (chalconas, flavononas, isoflavonas e flavonols) está envolvida na indução dos genes *nod* (MERCANTE *et al.*, 2002; SHAW, MORRIS & HOOKER, 2006).

É importante salientar que alguns flavonóides podem atuar como repressores da expressão dos gene *nod*. A daidzeína e a genisteína são fortes indutores em *B. japonicum*, porém são potentes inibidores da expressão dos genes *nod* em *R. meliloti* (GYÖRGYPAL *et al.*, 1991 *apud* MERCANTE *et al.*, 2002).

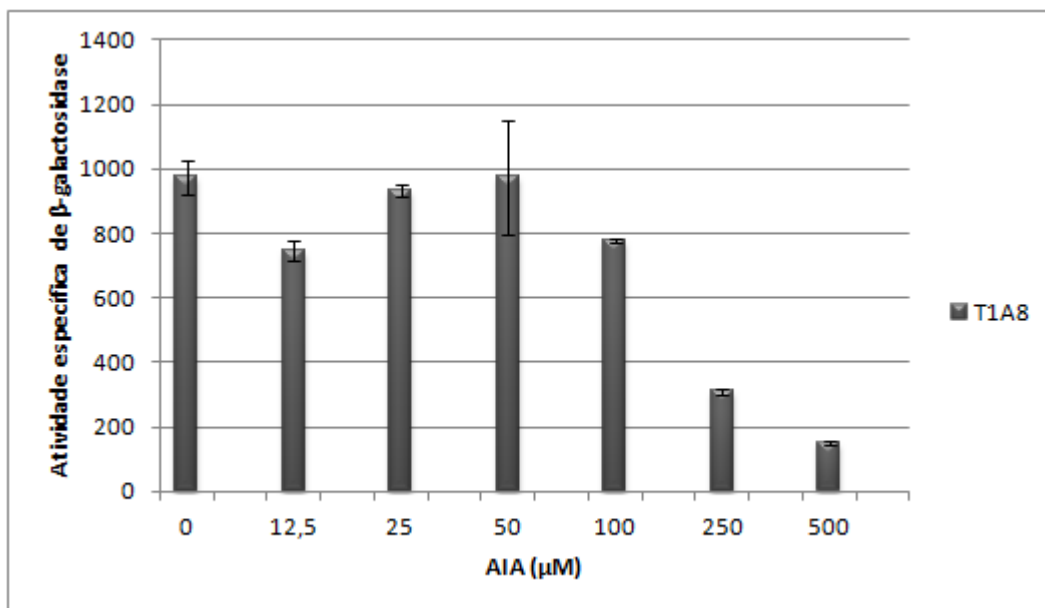
Existem outros genes que influenciam a simbiose entre a planta e o rizóbio que são regulados por flavonóides, em *Rhizobium* NGR234 a expressão do sistema de secreção do Tipo III é ativado pela proteína NodD que responde a flavonóides (VIPREY *et al.*, 1998).

Tadra-Sfeir (2008) testou a atividade de  $\beta$ -galactosidase da estirpe na presença de 50  $\mu$ M do flavonóide naringenina e constatou uma inibição causada por este composto. Para saber se outras concentrações afetariam a expressão do gene *ior*, a atividade de  $\beta$ -galactosidase da estirpe T1A8 foi testada em diferentes concentrações de naringenina (6; 12,5; 25; 50; 100 e 250  $\mu$ M). Podemos observar uma inibição do gene *ior* na presença de naringenina, sendo que ocorre uma maior inibição a partir de 25  $\mu$ M do flavonóide (Figura 4). É possível também verificar uma relação dose-dependente da regulação realizada por este flavonóide (Figura 4).



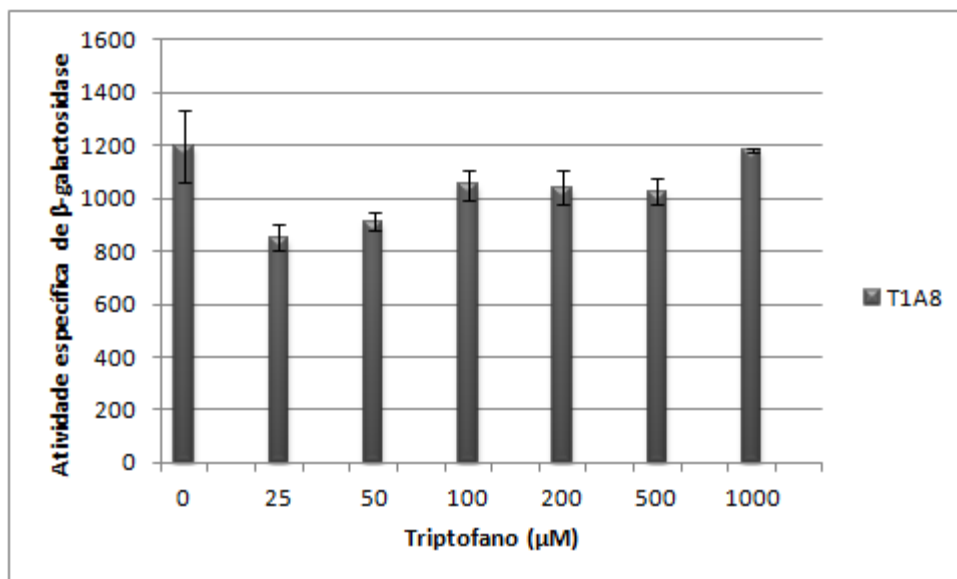
**Figura 4: Atividade específica de β-galactosidase em fase estacionária de crescimento da estirpe mutante T1A8 na presença de naringenina.** Efeito de diferentes concentrações de naringenina (µM) sobre o gene *ior* na condição de alto nitrogênio (20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl). Os valores são a média da atividade específica de β-galactosidase de cada estirpe mutante testada em duplicata expressa em nmol ONP/min/mg proteína, com intervalos de desvio padrão. Representação de três ensaios independentes.

Um mecanismo de “feedback” positivo tem sido descrito para *A. brasilense* no qual o gene *ipdC* é responsivo a AIA (BROEK *et al*, 1999). Sendo provável que o AIA desempenhasse um papel na regulação do gene *ior*, a atividade de β-galactosidase da estirpe T1A8 foi testada em diferentes concentrações de AIA (12,5; 25; 50; 100; 250 e 500 µM). Como controle foi utilizado meio sem AIA. Podemos observar que a expressão de *ior* é inibida por AIA, ocorrendo inibição a partir da dose de 250µM de AIA (Figura 5).



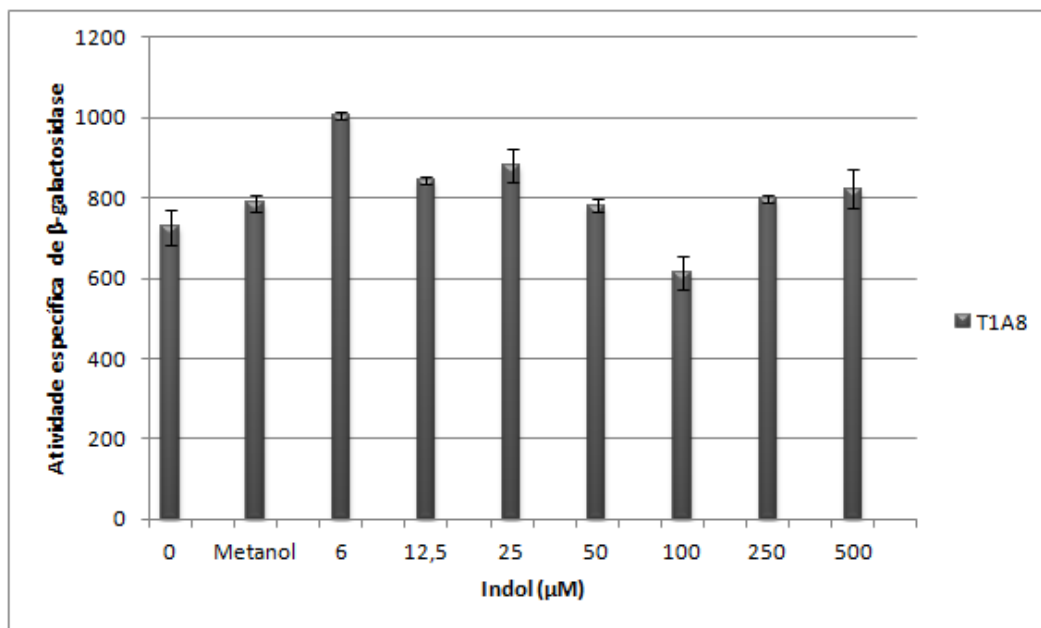
**Figura 5: Atividade específica de β-galactosidase em fase estacionária de crescimento da estirpe mutante T1A8 na presença de AIA.** Efeito de varias concentrações de AIA (µM) sobre o gene *ior* na condição de alto nitrogênio (20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl). Os valores são a média da atividade específica de β-galactosidase de cada estirpe mutante testada em duplicata expressa em nmol ONP/min/mg proteína, com intervalos de desvio padrão. Representação de três ensaios independentes.

Estudos demonstraram que aplicação de triptofano exógeno aumenta a produção de AIA em diversas bactérias como *Azospirillum sp*, *Pseudomonas putida* e *Rhizobium sp* (RADWAN, MOHAMED & REIS, 2004; SPAEPEN, VANDERLEYDEN & REMANS, 2007). A atividade de β-galactosidase desta estirpe foi testada em diferentes concentrações de triptofano (25, 50, 100, 200, 500 e 1000 µM). Como controle foi utilizado meio sem triptofano. Podemos observar que nas concentrações testadas, aparentemente não há regulação por triptofano do gene *ior* (Figura 6).



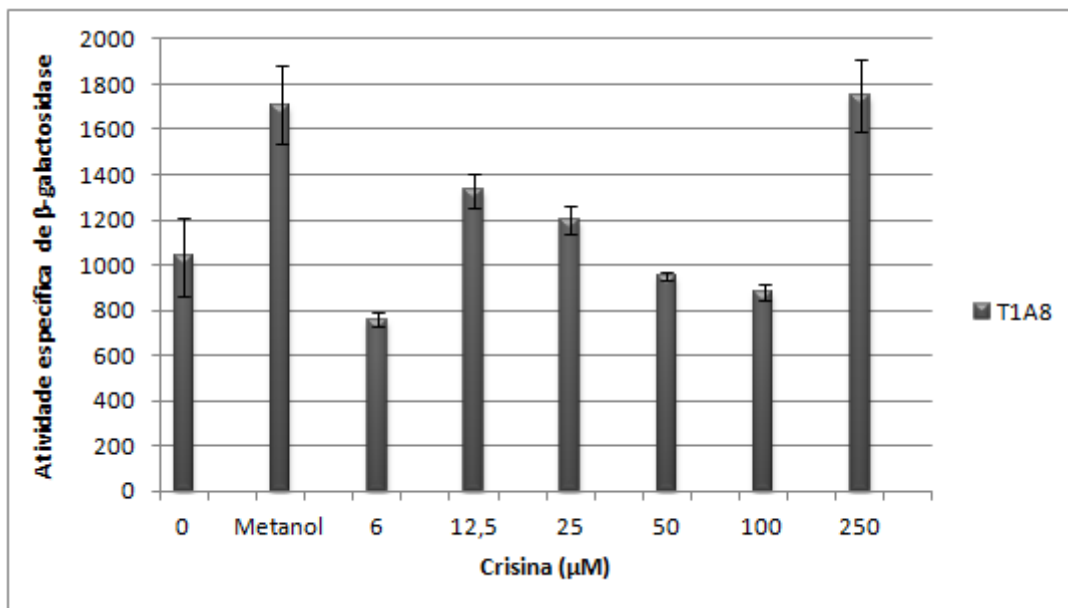
**Figura 6: Atividade específica de β-galactosidase em fase estacionária de crescimento da estirpe mutante T1A8 na presença de triptofano.** Efeito de várias concentrações de triptofano (µM) sobre o gene *ior* na condição de alto nitrogênio (20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl). Os valores são a média da atividade específica de β-galactosidase de cada estirpe mutante testada em duplicata expressa em nmol ONP/min/mg proteína, com intervalos de desvio padrão. Representação de três ensaios independentes.

Durante as reações necessárias para que o precursor triptofano se transforme em AIA, são gerados compostos indólicos intermediários (SPAEPEN, VANDERLEYDEN & REMANS, 2007). Sendo provável que algum desses compostos possa desempenhar um papel na regulação da rota, a atividade de β-galactosidase da estirpe T1A8 foi testada em diferentes concentrações de indol (6; 12,5; 25; 50; 100; 250 e 500 µM). Como controle foi utilizado meio sem indol e ainda meio contendo a mesma proporção de metanol utilizado para na solução de indol. Podemos observar que o gene *ior* não é regulado por indol nas concentrações testadas (Figura 7).



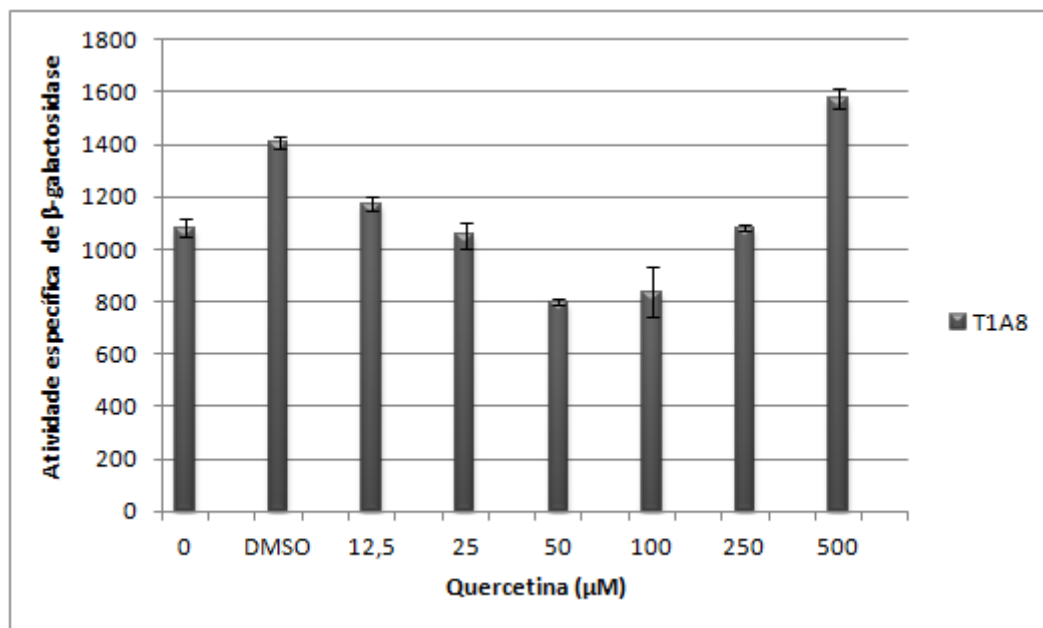
**Figura 7: Atividade específica de β-galactosidase em fase estacionária de crescimento da estirpe mutante T1A8 na presença de indol.** Efeito de varias concentrações de indol (µM) sobre o gene *ior* na condição de alto nitrogênio (20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl). Os valores são a média da atividade específica de β-galactosidase de cada estirpe mutante testada em duplicata expressa em nmol ONP/min/mg proteína, com intervalos de desvio padrão. Representação de dois ensaios independentes.

Outros dois flavonóides foram testados, a crisina e a quercetina. A atividade de β-galactosidase da estirpe T1A8 foi testada em diferentes concentrações de crisina (6; 12,5; 25; 50; 100 e 250 µM). Como controle foi utilizado meio sem crisina e ainda meio contendo a mesma proporção de metanol utilizado para dissolver o flavonóide. Podemos observar que a crisina aparentemente não desempenha nenhuma regulação sobre o gene *ior* (Figura 8). Foram utilizados 25 µL de metanol no ensaio controle, este volume corresponde com o ensaio de 250 µM de crisina, e o efeito observado de crisina na concentração de 250µM pode não ser real, uma vez que o controle com metanol exerceu um efeito parecido (Figura 8).



**Figura 8: Atividade específica de β-galactosidase em fase estacionária de crescimento da estirpe mutante T1A8 na presença de crisina.** Efeito de varias concentrações de crisina (µM) sobre o gene *ior* na condição de alto nitrogênio (20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl). Os valores são a média da atividade específica de β-galactosidase de cada estirpe mutante testada em duplicata expressa em nmol ONP/min/mg proteína, com intervalos de desvio padrão. Representação de dois ensaios independentes.

A atividade de β-galactosidase da estirpe T1A8 foi testada em diferentes concentrações de quercetina (6; 12,5; 25; 50; 100; 250 e 500 µM). Como controle foi utilizado meio sem quercetina e ainda meio contendo a mesma proporção de DMSO utilizado para diluir o flavonóide. Podemos observar que o gene *ior* não sofre regulação por quercetina (Figura 9).

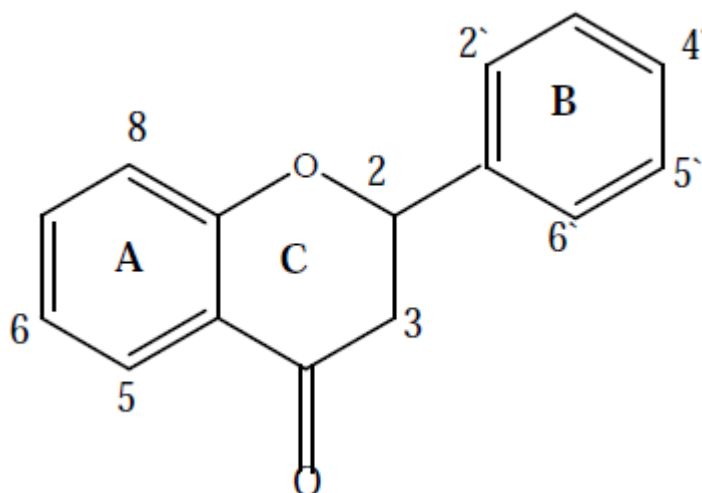


**Figura 9: Atividade específica de β-galactosidase em fase estacionária de crescimento da estirpe mutante T1A8 na presença de quercetina.** Efeito de varias concentrações de quercetina (µM) sobre o gene *ior* na condição de alto nitrogênio (20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl). Os valores são a média da atividade específica de β-galactosidase de cada estirpe mutante testada em duplicata expressa em nmol ONP/min/mg proteína, com intervalos de desvio padrão. Representação de dois ensaios independentes.

A estrutura básica dos flavonóides consiste de 15 átomos de carbono arranjados em três anéis denominados A, B e C (Figura 10). Os flavonóides diferem entre si de acordo com o tipo de ligação nos anéis, posição e natureza dos substituintes e são subdivididos nas principais classes: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonóides. Alguns flavonóides são apresentados na Tabela 5 (DORNAS *et al.*, 2008; LEPINIEC *et al.*, 2006; SHAW, MORRIS & HOOKER, 2006).

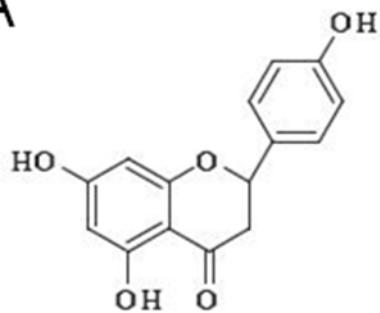
Os três flavonóides testados no presente trabalho (Figura 11) pertencem a classes distintas, sendo a narigenina uma flavonona, a crisina uma flavona e quercetina um flavonol (Tabela 5). Somente a naringenina demonstrou ação sobre a regulação do gene *ior*. Provavelmente as diferenças estruturais entre as classes podem estar relacionado com os resultados anteriormente apresentados, uma vez que já foi verificado em outros processos que as diferenças estruturais são relevantes, como a ação antioxidante dos flavonóides. Flavonas e flavonóis são de

origem biossintética muito próximas. Os flavonóis são, na verdade, flavonas substituídas na posição C3 por uma hidroxila. Estudos sobre a atividade estrutural indicam que a presença dessa hidroxila em C3 juntamente com um catecol no anel B favorecem a atividade antioxidante (DORNAS *et al*, 2008).

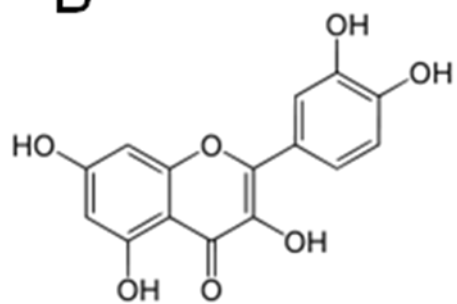


**Figura 10: Estrutura básica dos flavonóides.** Fonte: DORNAS (2008).

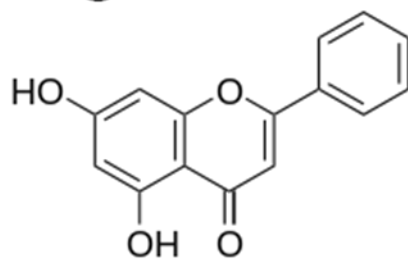


**A**

Naringenina

**B**

Quercetina

**C**

Crisina

**Figura 11: Estrutura dos flavonóides utilizados neste trabalho. A,** estrutura da naringenina. **B,** estrutura da quercetina. **C,** estrutura da crisina. Fonte: Adaptado de Reddy e colaboradores, 2007; e Sequetto, 2008.

**Tabela 5- Alguns representantes das subclasses de flavonóides.**

Flavonóides	Posição dos substituintes na estrutura básica dos flavonóides								
	3	5	7	3'	4'	5'			
<i>Antocianidinas</i>									
Cianidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH			
Delfinidina	H	H	H	OH	H	OH			
Malvidina	H	H	H	O-Me	H	O-Me			
Pelargonidina	OH	OH	OH	OH	H	H			
Peonidina	H	H	H	O-Me	H	OH			
<i>Flavanols (+) –</i>									
Catequina	H	OH	H	OH	OH	H			
<i>Flavanona</i>									
Naringenina	H	OH	OH	H	OH	H			
Naringina	H	OH	O-Ru	H	OH	H			
Hesperedina	H	OH	O-Ru	OH	O-Me	H			
<i>Flavonas</i>									
Apigenina	H	OH	OH	H	OH	H			
Crisina	H	OH	OH	H	H	H			
Diosmina	H	OH	O-Ru	OH	O-Me	H			
<i>Flavonóis</i>									
Quercetina	OH	OH	OH	H	OH	H			
Canferol	H	OH	OH	H	OH	H			
Miricetina	H	OH	OH	OH	OH	OH			
<i>Isoflavonóides</i>									
Daidzeína	H	H	OH	H	OH	H			
Genisteína	H	OH	OH	H	OH	H			
Flavonóides	Posição dos substituintes na estrutura básica dos flavonóides*								
	2	3	4	6	7	3'	4'	5'	6'
<i>Auronas</i>									
Aureusina	H	H	OH	H	H	OH	OH	O-Gli	H
Aureusidina	H	H	OH	OH	H	OH	OH	H	H
<i>Chalconas</i>									
Florentina	OH	H	OH	OH	H	H	H	H	OH
Floridzina	O-Gl	H	H	OH	H	H	H	H	OH

Adaptado de DORNAS (2008). Legenda: Ru-Rutina, Me-Metia, Gl-Glicose, Gli-Glicosídeo.

\*Os números 2, 3, 4, 5, 6, 7, e 3', 4', 5' e 6' indicam a posição dos substituintes na estrutura básica dos flavonóides (Figura 10).

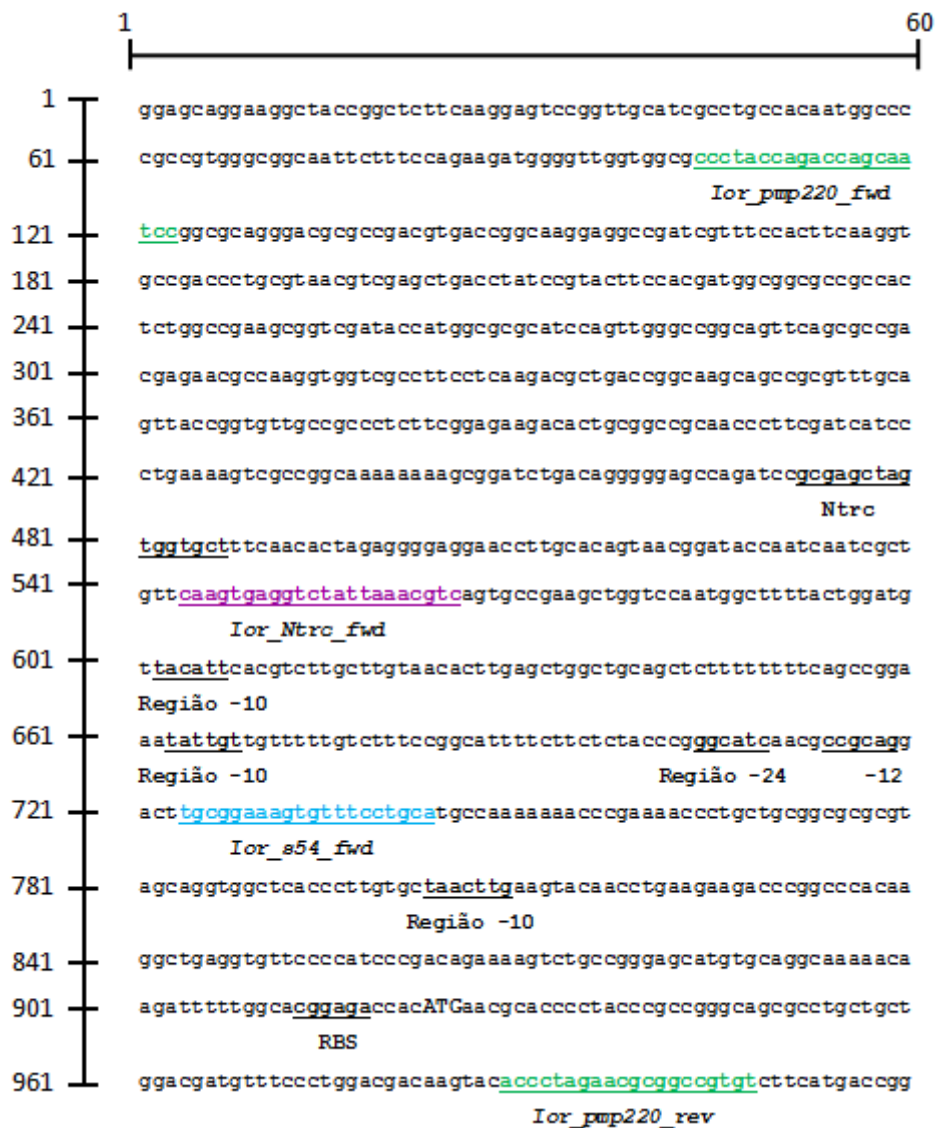
## 6.2. DESENHO DOS PARES DE "PRIMERS" PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA COMPLETA DO GENE *IOR*.

Para auxiliar no estudo da regulação do gene *ior*, sua provável região promotora foi amplificada a partir do DNA genômico da estirpe SmR1 (item 5.6), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) contendo sítio de restrição para facilitar o processo de subclonagem no vetor de fusão pMP220.

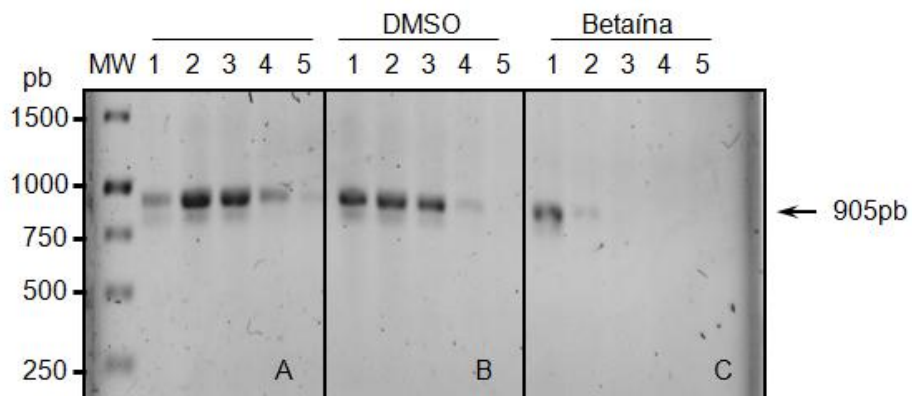
Para a amplificação da provável região promotora foram utilizados os seguintes *primers*: *lor\_pmp220\_fwd* CCCTACCAGATCTGCAATCC (contendo o sítio BglII) e *lor\_pmp220\_rev* ACACGGCCGAATTCTAGGGT (contendo o sítio EcoRI), o local de anelamento dos *primers* na sequência da provável região promotora está indicado na figura 12. Para a amplificação deste fragmento foi realizada uma reação de amplificação padrão conforme em Materiais e Métodos item 5.5 (Figura 13, painel A), também foi utilizado DMSO (5%) (Figura 13, painel B) e betaína 1M (Figura 13, painel C).

Embora ambos *primers* tenham temperaturas de anelamento teóricas de 58°C, para otimização da reação de PCR foi utilizado um gradiente de temperatura entre 50 e 60°C. Este recurso do termociclador permitiu a utilização de cinco temperaturas (50°C, 52,7°C, 55,4°C, 58,1°C e 60°C) para anelamento dos *primers*. Os parâmetros do termociclador para amplificação da região de interesse foram: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C para a abertura inicial da dupla fita de DNA; 25 ciclos de 45 segundos a 94°C para a abertura das fitas, 30 segundos nas temperaturas escolhidas do gradiente para o anelamento dos oligonucleotídeos com a fita de DNA, e 1 minuto e 30 segundos a 72°C para a extensão da fita nascente.

Comparando a intensidade dos amplificados pode se observar que a reação de PCR contendo betaína 1M foi a condição que proporcionou menor rendimento de produto amplificado. Aparentemente a presença de DMSO tem um efeito na menor temperatura, aumentando a quantidade do amplificado, porém em temperaturas maiores a ausência de DMSO é melhor. Na reação de PCR padrão, as temperaturas 52,7°C e 55,4°C foram as que apresentaram maior quantidade de amplificado (Figura 13).



**FIGURA 12: Sequência de nucleotídeos da provável região promotora do gene Hsero\_4278.** A sequência mostra a provável região promotora do gene Hsero\_4278 onde se encontra destacado sublinhado e em cor diferenciada o alinhamento dos primers utilizados para a amplificação da região promotora (sequência de DNA disponível no GenBank). Ainda encontra-se destacada sublinhada e em negrito as sequências consenso para possível ligação do fator NtrC, fator  $\sigma^{54}$  (-12 e -24), região -10, sítio de ligação ao ribossomo (RBS) e também o início da tradução ATG.



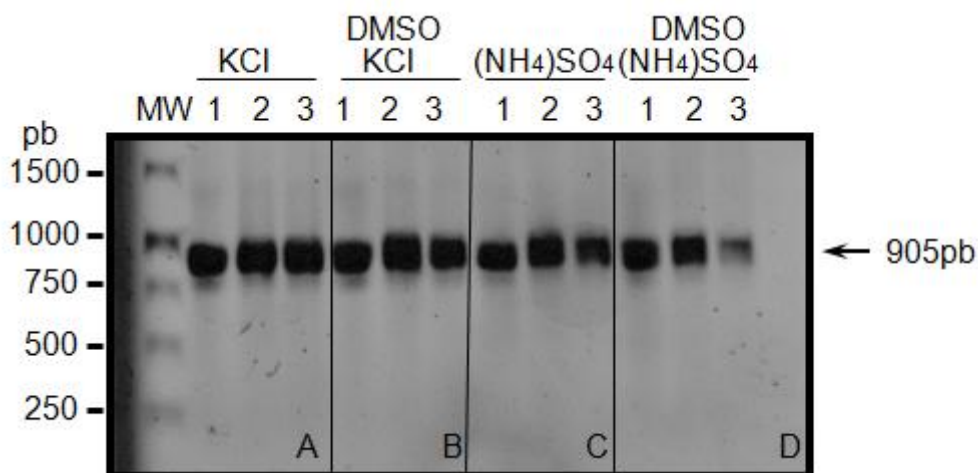
**FIGURA 13: Eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TAE 1X do produto de amplificação da região promotora do gene *ior* de *H. seropedicae*.** A reação de amplificação foi realizada como descrito utilizando DNA genômico como molde e tampão de reação padrão (painel A) ou na presença de 5% de DMSO (painel B) ou 1 M de betaína (painel C) e diferentes temperaturas de anelamento (linhas 1 a 5 respectivamente (50°C, 52,7°C, 55,4°C, 58,1°C e 60°C)). Linha MW indica os marcadores de massa molecular (em bp). A seta indica o produto de amplificação (905 bp). O DNA foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida pelo sistema de fotodocumentação UVP.

Durante a amplificação foi gerado um produto inespecífico de tamanho um pouco menor que o produto esperado de 905 pb. A fim de diminuir a quantidade deste produto, foi testado outro tampão de reação contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  que, de acordo com o fabricante, podem melhorar a amplificação do produto de interesse. A figura 14 mostra o resultado obtido utilizando tampão de amplificação contendo KCl (Figura 14, linhas 1 a 3 dos painéis A e B), também foi testada na ausência ou presença de DMSO (5%) na reação de PCR (Figura 14, painel B). A amplificação utilizando tampão de amplificação contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 14, linhas 1 a 3 dos painéis C e D), também foi testada na ausência ou presença de DMSO (5%) na reação de PCR (Figura 14, painel D). Os produtos da amplificação por PCR foram analisados em géis de agarose 1%, em tampão TAE 1X. Três temperaturas de anelamento foram utilizadas: 50°C, 52,7°C e 55,4°C.

Comparando os amplificados pode-se observar que mudando a condição não houve alteração na geração do produto inespecífico. Entretanto, comparando as temperaturas em todas as condições, pode-se observar que na temperatura de 50°C houve maior quantidade de produto inespecífico.

A condição escolhida para amplificação da região de interesse é a reação de PCR padrão contendo KCl, e utilizando a temperatura de 55,4°C para anelamento

dos *primers*. Esta condição foi escolhida devido ao bom rendimento do produto de interesse apesar da geração do produto inespecífico, porém os dois produtos gerados são de tamanhos distintos e por esse motivo é possível realizar uma seleção de clones utilizando enzimas de restrição, e a confirmação do clone é feita também por sequenciamento.



**FIGURA 14: Eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TAE 1X do produto de amplificação da região promotora de 905pb do gene *ior* de *H. seropedicae*.** A reação de amplificação foi realizada como descrito utilizando DNA genômico como molde e tampão de reação padrão contendo KCl 1X (painel A) ou tampão de reação padrão contendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1X (painel C) ou na presença de 5% de DMSO (B e D) e diferentes temperaturas de anelamento (linhas 1 a 3 respectivamente 50°C, 52,7°C e 55,4°C). Linha MW indica os marcadores de massa molecular (em bp). A seta indica o produto de amplificação (485 bp). O DNA foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida pelo sistema de fotodocumentação UVP.

### 6.3. CONSTRUÇÃO DE “PRIMERS” PARA A AMPLIFICAÇÃO DE SEGMENTOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *IOR*.

Segmentos da região promotora do gene *ior*, contendo deleções de possíveis regiões de sinalização também foram amplificadas a partir do DNA genômico da estirpe SmR1 (item 5.6), utilizando *primers* para amplificar os segmentos da região promotora também foram desenhados contendo sitio de restrição para facilitar a subclonagem.

Como parâmetro para as deleções foram utilizadas prováveis sequências consenso para fatores de regulação. Foram encontradas na região promotora

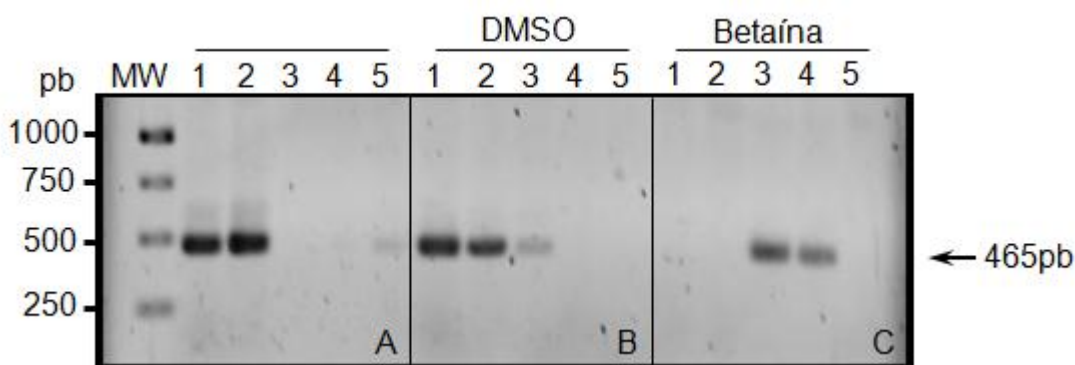
sequências consenso para ligação da proteína NtrC e do fator sigma 54. (Figura 12). Na primeira construção o produto amplificado contém uma deleção de 440pb em relação a primeira construção que contem toda região promotora. Essa região foi escolhida por apresentar uma provável sequência consenso para ligação da proteína NtrC. A proteína NtrC juntamente com a proteína NtrB constitui um sistema de dois componentes que controla a expressão de genes envolvidos no metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio. Em condições de limitação de nitrogênio a NtrB fosforila a NtrC ativando-a, enquanto que em condições de excesso de nitrogênio a NtrC é desfosforilada pela NtrB, sendo assim inativada (NINFA; MAGASANIK, 1986).

A região promotora com a deleção foi amplificada a partir do DNA genômico da estirpe SmR1 (item 5.6), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *lor\_Ntrc\_fwd* CAAGTGAGATCTATTAACGTC (contendo o sítio BgIII) e *lor\_pmp220\_rev* ACACGGCCGAATTCTAGGGT (contendo o sítio EcoRI), o local de anelamento dos *primers* na sequência da provável região promotora está indicado na figura 12. Para a amplificação deste fragmento foi realizada uma reação de amplificação padrão conforme em materiais e métodos item 5.5 (Figura 15, painel A); também foi utilizado DMSO (5%) (Figura 15, painel B) e betaína 1M (Figura 15, painel C).

Embora ambos os *primers* tenham temperaturas de anelamento teórica de 58°C, foi realizado um gradiente de 48 a 56° C para otimização da PCR. Este recurso do termociclador permitiu a utilização das cinco temperaturas: 48°C, 49,6°C, 52°C, 54,8°C e 56,1°C. Os parâmetros do termociclador para amplificação da região de interesse foram: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C para a abertura inicial da dupla fita de DNA; 25 ciclos de 45 segundos a 94°C para a abertura das fitas, 30 segundos nas temperaturas escolhidas do gradiente para o anelamento dos oligonucleotídeos com a fita de DNA, e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita nascente.

Na reação de PCR padrão teve amplificação às temperaturas 48°C, 49,6°C e 56,1°C, porém na maior temperatura a quantidade foi inferior. Vale ressaltar, que houve geração de produto inespecífico acima do produto esperado de 465 pb. Na condição contendo DMSO 5%, houve amplificação do produto de interesse nas temperaturas 48°C, 49,6°C e 52°C, e também houve geração de produto inespecífico, mas em menor quantidade. Na condição contendo betaína 1M, teve produto de PCR nas temperaturas 52°C e 54,8°C, porém em quantidade inferior.

Comparando as diferentes condições pode se observar que a reação de PCR com DMSO 5% nas temperaturas 48°C e 49,6°C são as melhores condições para obter o produto desejado, uma vez que possui um bom rendimento e produz uma quantidade de produto inespecífico inferior quando comparado com a reação de PCR padrão. Além disso, é possível realizar uma seleção de clones utilizando enzimas de restrição, e a confirmação do clone foi feita também por sequenciamento.



**FIGURA 15: Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X dos produtos de amplificação do segmento da região promotora de 465pb do gene *ior* de *H. seropedicae*.** A reação de amplificação foi realizada como descrito utilizando DNA genômico como molde e tampão de reação padrão (painel A) ou na presença de 5% de DMSO (painel B) ou 1 M de betaína (painel C) e diferentes temperaturas de anelamento (linhas 1 a 5 respectivamente 48°C, 49,6°C, 52°C, 54,8°C e 56,1°C). Linha MW indica os marcadores de massa molecular (em bp). A seta indica o produto de amplificação (465 bp). O DNA foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida pelo sistema de fotodocumentação UVP.

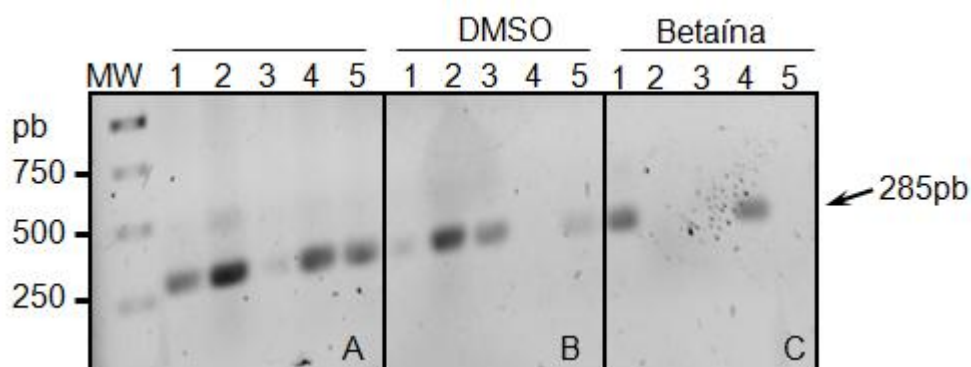
Para a análise da regulação do gene *ior*, a região promotora também foi amplificada contendo com uma deleção de 620pb. Esta região foi escolhida para ser deletada por possuir uma sequência consenso para a proteína NtrC e para o fator  $\sigma^{54}$ . O fator sigma 54 é um fator alternativo da RNA polimerase de bactérias envolvido em diversas funções biológicas, como no metabolismo de nitrogênio e degradação do tolueno, entre outros (MERRICK e CHAMBERS, 1992; FISCHER, 1994).



A região promotora com a deleção foi amplificada a partir do DNA genômico da estirpe SmR1 (item 5.6), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *lor\_s54\_fwd* TGCGGAAAGATCTTCCTGCATGC (contendo o sítio BglII) e *lor\_pmp220\_rev* ACACGGCCGAATTCTAGGGT (contendo o sítio EcoRI), o local de anelamento dos *primers* na sequência da provável região promotora está indicado na figura 12. Para a amplificação deste fragmento foi realizada uma reação de amplificação padrão conforme em materiais e métodos item 5.5 (Figura 16, painel A), também foi utilizado DMSO (5%) (Figura 16, painel B) e betaína 1M (Figura 16, painel C).

Embora os *primers* tenham temperaturas de anelamento teóricas sendo 54°C para *lor\_s54\_fwd* e 58°C para *lor\_pmp220\_rev* foi realizado um gradiente de 48 a 58°C para otimização. Este recurso do termociclador permitiu a utilização das cinco temperaturas: 48,7°C, 50,7°C, 53,7°C, 56,1°C e 58,4°C. Os parâmetros do termociclador para amplificação da região de interesse foram: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C para a abertura inicial da dupla fita de DNA; 25 ciclos de 45 segundos a 94°C para a abertura das fitas, 30 segundos nas temperaturas escolhidas do gradiente para o anelamento dos oligonucleotídeos com a fita de DNA, e 1 minuto a 72°C para a extensão da fita nascente. Na reação padrão de PCR (Figura 16, painel A) houve amplificação nas cinco temperaturas escolhidas, sendo que na temperatura 53,7°C houve uma menor quantidade de produto de PCR gerado. A temperatura que apresentou maior rendimento foi 50,7°C, mas houve geração de produto inespecífico.

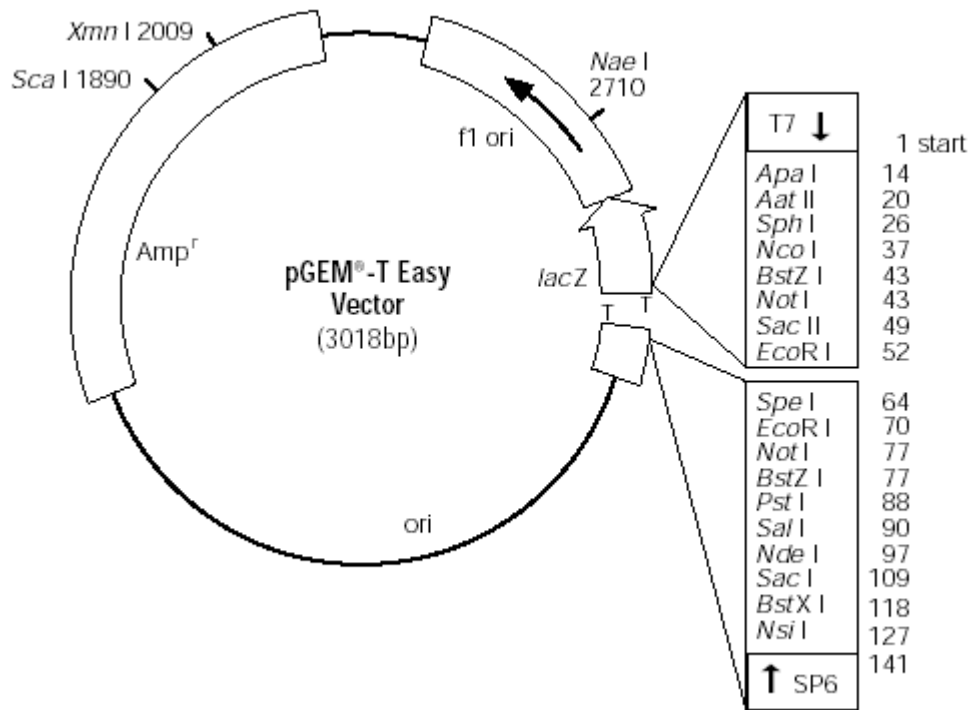
Na condição contendo DMSO 5% não houve amplificação apenas na temperatura 56,1°C. Sendo a temperatura 50,7°C a que apresentou maior quantidade de produto amplificado. Na condição contendo betaína 1M o produto foi amplificado nas temperaturas 48,7°C e 56,1°C. Comparando as diferentes condições pode-se observar que a condição com betaína é a que proporciona menor rendimento. Comparando as temperaturas nas condições na reação padrão e DMSO 5% observar-se que na temperatura 50,7°C é a qual apresenta maior rendimento, sendo esta temperatura na condição padrão a melhor condição para a amplificação.



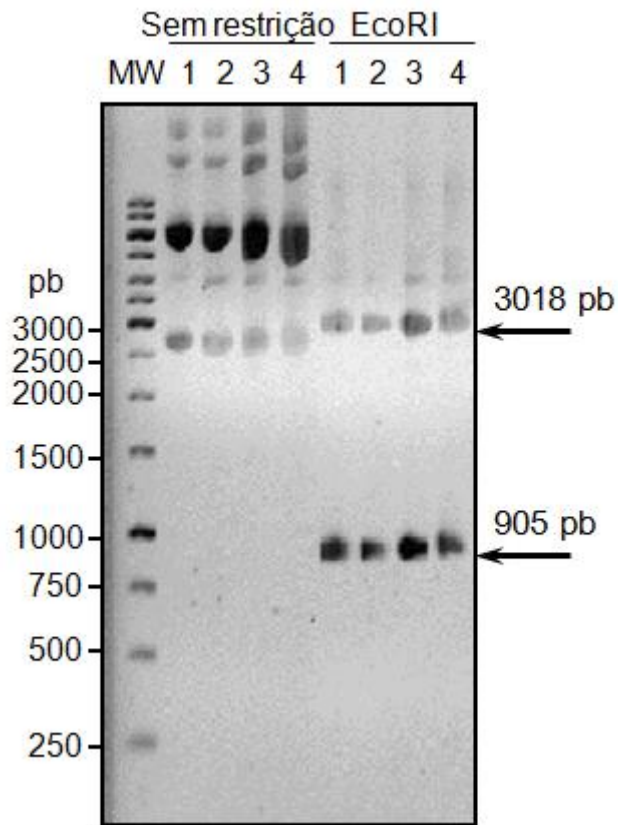
**FIGURA 16:** Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X dos produtos de amplificação do segmento da região promotora de 285pb do gene *ior* de *H. seropedicae*. A reação de amplificação foi realizada como descrito utilizando DNA genômico como molde e tampão de reação padrão (painel A) ou na presença de 5% de DMSO (painel B) ou 1 M de betaína (painel C) e diferentes temperaturas de anelamento (linhas 1 a 5 respectivamente 48,7°C, 50,7°C, 53,7°C, 56,1°C e 58,4°C). Linha MW indica os marcadores de massa molecular (em bp). A seta indica o produto de amplificação (285 bp). O DNA foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida pelo sistema de fotodocumentação UVP.

#### **6.4. CLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE DNA CONTENDO A REGIÃO PROMOTORA COMPLETA E COM DELEÇÕES NO VETOR DE CLONAGEM TA pTZ57R/T OU pGEM-T EASY.**

A região promotora do gene *ior* amplificada foi clonada no vetor pGEM-T Easy (Figura 17) utilizando o sistema TA que facilita a clonagem de produtos de PCR. Após seleção de bactérias resistentes ao antibiótico ampicilina, os plasmídeos foram isolados e analisados para verificar a presença do inserto de interesse (Figura 18). Análise por restrição com a enzima EcoRI indica que os clones selecionados apresentam um banda com taxa de migração compatível com a região promotora *ior*. Este fragmento foi sequenciado para confirmação de identidade (dados não mostrados) e clonado no vetor pMP220 para análise de expressão.

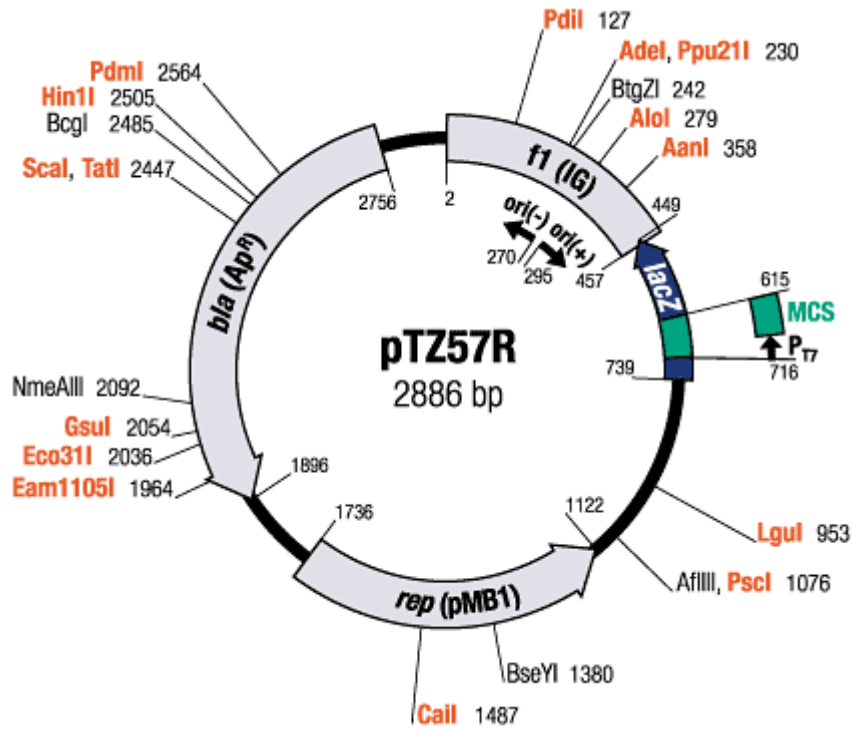


**Figura 17: mapa físico do plasmídeo pGEM-T Easy.** Sítios de restrição estão indicados. Encontra-se indicado o gene *lacZ* que codifica a β-galactosidase e *Amp<sup>r</sup>* o gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina Fonte: [www.promega.com](http://www.promega.com).

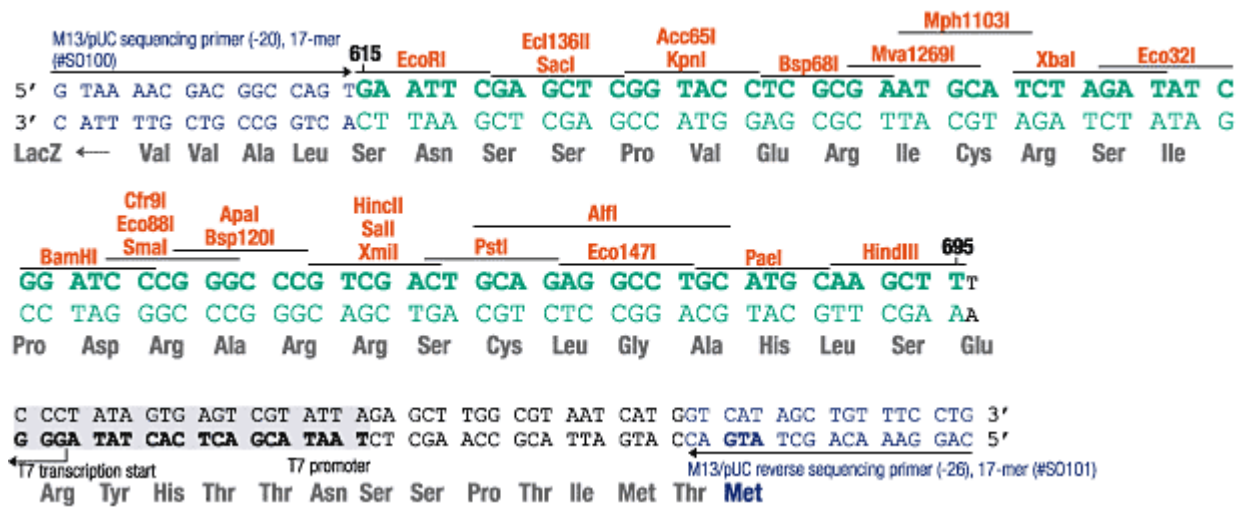


**Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X de plasmídeos pGEM-T contendo a região promotora do gene *ior* de *H. seropedicae*.** As linhas de 1 a 4 correspondem aos plasmídeos isolados de diferentes clones resistentes ao antibiótico ampicilina. A esquerda estão os plasmídeos não digeridos e a direita após digestão com a enzima EcoRI. As setas indicam o fragmento contendo a região promotora (905 pb) e o vetor de clonagem (3018 pb). MW indica os marcadores de massa molecular (em pb). O gel foi corado com brometo de etídeo.

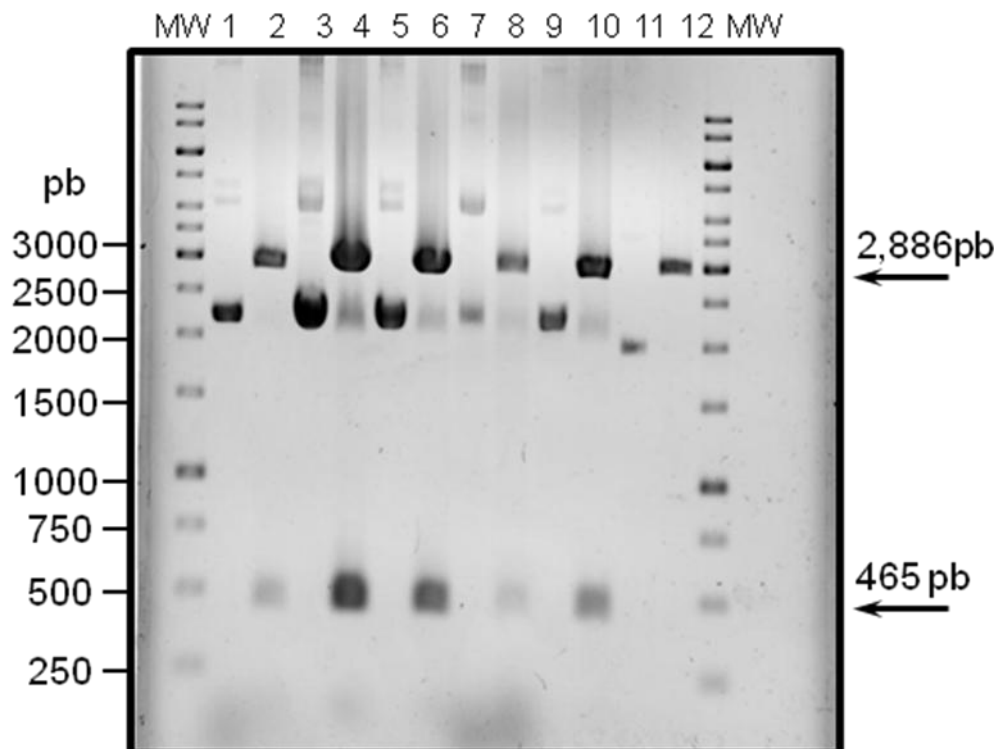
O fragmento de DNA correspondente a região promotora do gene *ior* deletada em 440 pb foi clonada no vetor pTZ57R/T (figura 19) utilizando o sistema TA. Clones resistentes a ampicilina foram selecionados e analisados por restrição com as enzimas EcoRI e BglII para a presença do inserto de interesse (Figura 20). Este fragmento foi sequenciado (dados não mostrados) para confirmação de sua identidade e posteriormente clonado no vetor pMP220 para análise de expressão.



**Sítio de policlonagem**

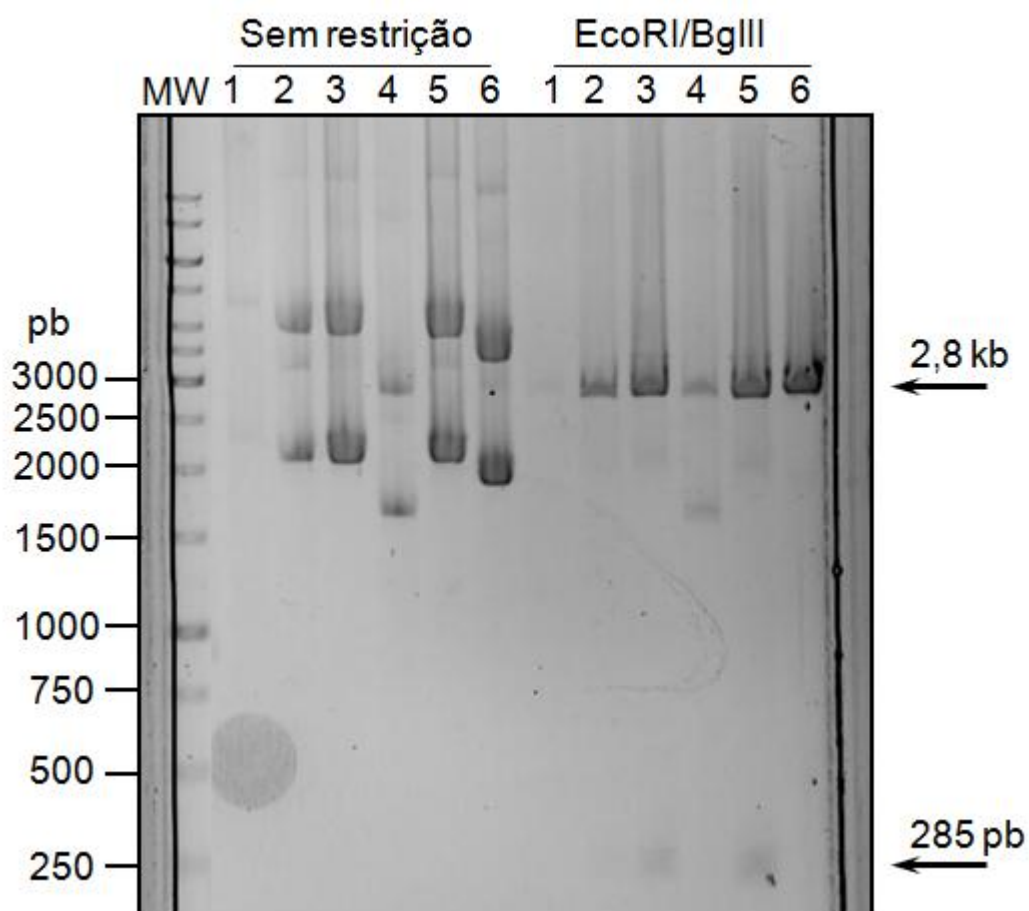


**FIGURA 19: Mapa físico do vetor pTZ57R/T.** Representação esquemática do vetor de clonagem pTZ57R/T e o sítio de policlonagem. Encontra-se indicado o gene *lacZ* que codifica para β-galactosidase e o gene *Ap<sup>r</sup>* que confere resistência ao antibiótico ampicilina. Fonte: [www.fermentas.com](http://www.fermentas.com)



**Figura 20: Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X de plasmídeos pTZ57R/T contendo a região promotora com deleção de 440 pb do gene *ior* de *H. seropedicae*.** As linhas de 1 a 12 correspondem aos plasmídeos isolados de diferentes clones resistentes ao antibiótico ampicilina. As linhas 1, 3, 5, 7, 9 e 11 estão os plasmídeos não digeridos. As linhas 2, 4, 6, 8, 10 e 12 estão os plasmídeos digeridos com as enzimas EcoRI e BglII. As setas indicam o fragmento contendo a região promotora deletada (465 pb) e o vetor de clonagem (2,886 pb). MW indica os marcadores de massa molecular (em pb). O gel foi corado com brometo de etídeo.

O fragmento de DNA correspondente a região promotora do gene *ior* deletada em 620pb foi clonada no vetor pTZ57R/T (figura 19) utilizando o sistema TA. Clones resistentes a ampicilina foram selecionados e analisados por restrição com as enzimas EcoRI e BglII para a presença do inserto de interesse (Figura 21). Os clones apresentados nas linhas 2, 3 e 5 apresentaram insertos com tamanho compatível ao esperado (285bp). Este fragmento foi sequenciado (dados não mostrados) para confirmação de sua identidade.

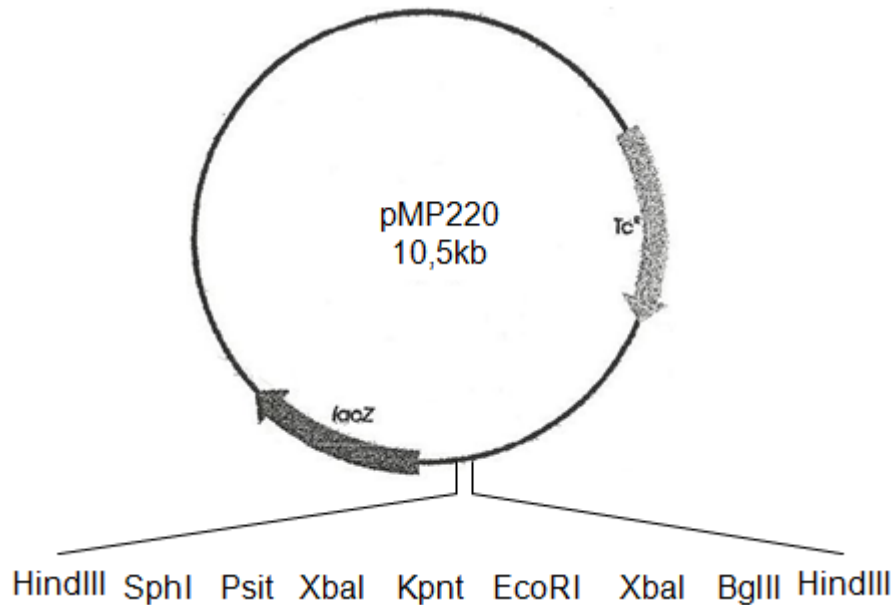


**Figura 21:** Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X de plasmídeos isolados durante a clonagem da região promotora do gene *ior* de *H. seropedicae* contendo uma deleção de 620pb. As linhas 1 a 6 correspondem aos plasmídeos isolados de diferentes clones resistentes ao antibiótico ampicilina. A esquerda estão os plasmídeos não digeridos e a direita após digestão com as enzimas EcoRI e BglIII. As setas indicam o fragmento contendo a região promotora deletada (285 pb) e o vetor de clonagem (2,8 kb). MW indica os marcadores de massa molecular (em pb). O gel foi corado com brometo de etídeo.

### 6.5. SUBCLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE DNA CONTENDO SEGMENTOS DA REGIÃO PROMOTORA DE INTERESSE NO VETOR DE FUSÃO pMP220

Para a análise da expressão do gene *ior* a região promotora íntegra e deletada foi subclonada no vetor de fusão pMP220 (Figura 22). Para isso, os plasmídeos contendo os segmentos da região promotora foram digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e BglIII para a liberação dos fragmentos desejados e,

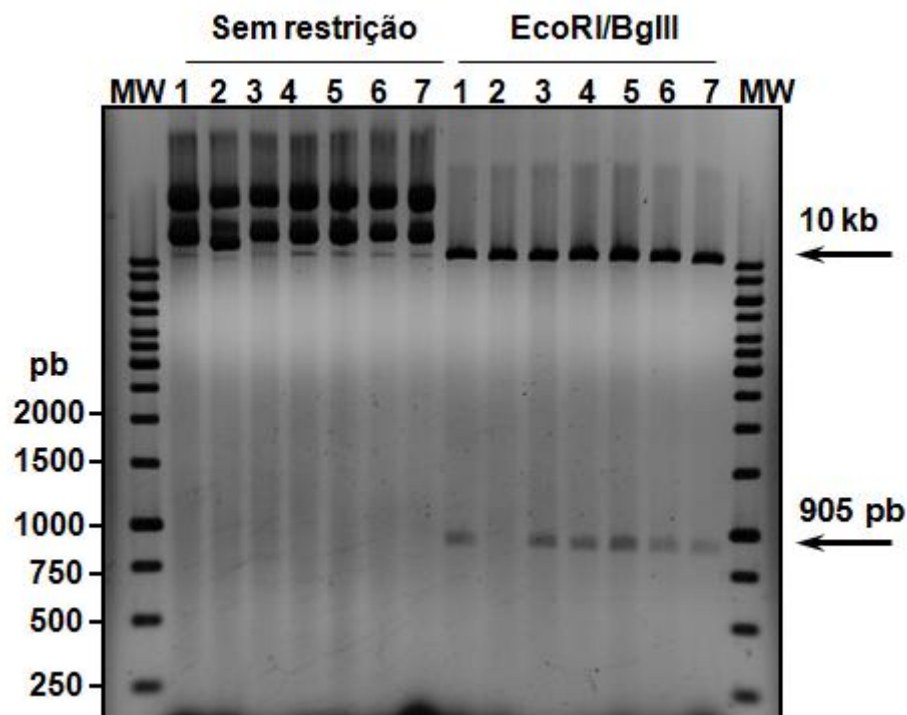
em seguida os fragmentos foram subclonados nos sítios das mesmas enzimas no vetor pMP220.



**FIGURA 22: Mapa físico do vetor pMP220.** Representação esquemática do vetor de clonagem pMP220 e o sítio de policonagem. Este vetor foi utilizado para as clonagens de segmentos da região promotora do gene *ior* para a construção de fusões *ior::lacZ*. O vetor possui resistência ao antibiótico tetraciclina. Fonte: Spaink *et al*, 1987-adaptado.

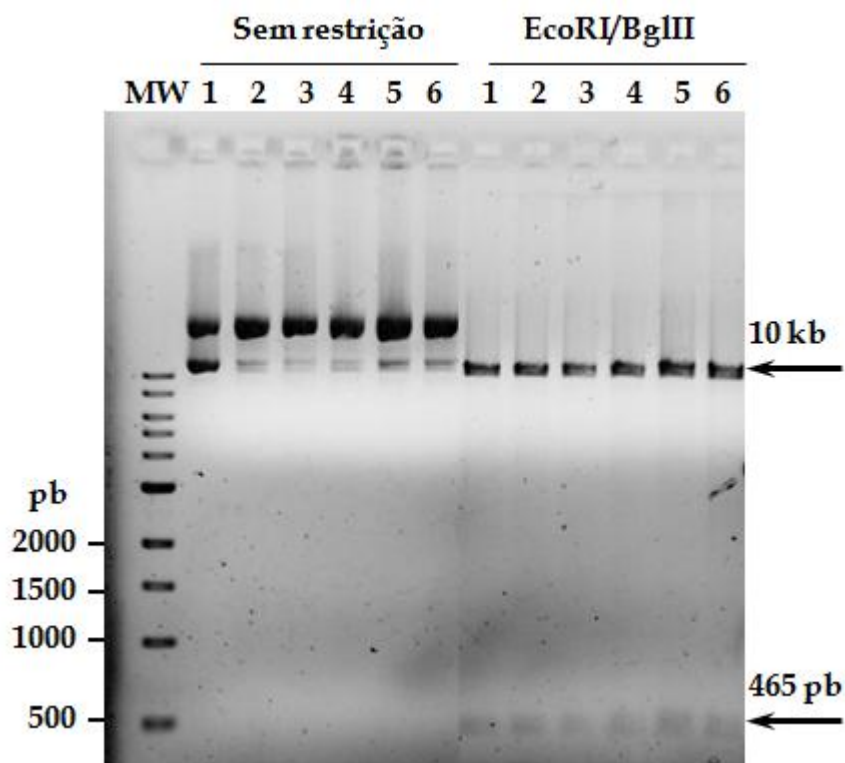
No presente trabalho, a região promotora completa do gene *ior* foi subclonada no vetor de fusão pMP220 obtendo a fusão pMP*promotor::lacZ*. Os clones foram confirmados por restrição utilizando as enzimas EcoRI e BglII através da liberação do fragmento de 905 pb inserido no vetor pMP220 (Figura 23, linhas 1, 3, 4, 5, 6, 7). Clones também foram confirmados por sequenciamento (dados não mostrados).





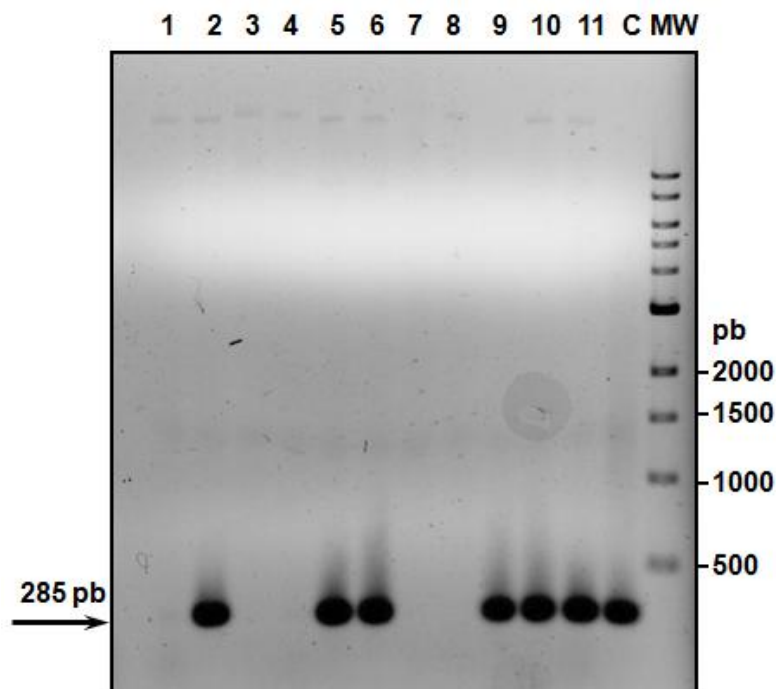
**FIGURA 23:** Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X de plasmídeos **pMP*promotor::lacZ*** isolados durante a subclonagem da região promotora do gene *ior* de *H. seropedicae*. As linhas de 1 a 7 correspondem aos plasmídeos isolados de diferentes clones resistentes ao antibiótico tetraciclina. A esquerda estão os plasmídeos não digeridos e a direita após digestão com as enzimas EcoRI e BglIII. As setas indicam o fragmento contendo a região promotora (905 pb) e o vetor de clonagem (10 kb). MW indica os marcadores de massa molecular (em pb). O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida pelo sistema de fotodocumentação UVP.

No presente trabalho, a região promotora do gene *ior* com a deleção de 440pb da região promotora 5' foi subclonada no vetor de fusão pMP220 obtendo a fusão pMP $\Delta$ *ntrC::lacZ*. Os clones, contendo a deleção da sequência consenso para o fator NtrC, foram confirmados por restrição utilizando as enzimas EcoRI e BglIII através da liberação do fragmento de 465 pb inserido no vetor pMP220 (Figura 24, linhas 1 a 6). Os clones também foram confirmados por sequenciamento (dados não mostrados).



**FIGURA 24:** Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X de plasmídeos **pMP $\Delta$ ntrC::lacZ** isolados durante a subclonagem da região promotora do gene *ior* de *H. seropedicae* com uma deleção de 440pb. As linhas de 1 a 6 correspondem aos plasmídeos isolados de diferentes clones resistentes ao antibiótico tetraciclina. A esquerda estão os plasmídeos não digeridos e a direita após digestão com as enzimas EcoRI e BglIII. As setas indicam o fragmento contendo a região promotora deletada (465pb) e o vetor de clonagem (10 kb). MW indica os marcadores de massa molecular (em pb). O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida pelo sistema de fotodocumentação UVP.

No presente trabalho, a região promotora do gene *ior* com a deleção de 620pb da região promotora 5', a qual não contém as sequências consenso para os fatores NtrC e  $\sigma^{54}$ , foi subclonada no vetor de fusão pMP220 obtendo a fusão pMP $\Delta$ ntrC $\Delta$ s54::lacZ. Os clones foram confirmados por PCR (item 5.5), utilizando os primers *lor\_s54\_fwd* e *lor\_pmp220\_rev*, tendo como DNA molde o plasmídeo purificado de colônias resistentes ao antibiótico tetraciclina (Figura 25, linhas 2, 5, 6, 9, 10 e 11). Os clones também foram confirmados por sequenciamento (dados não mostrados).



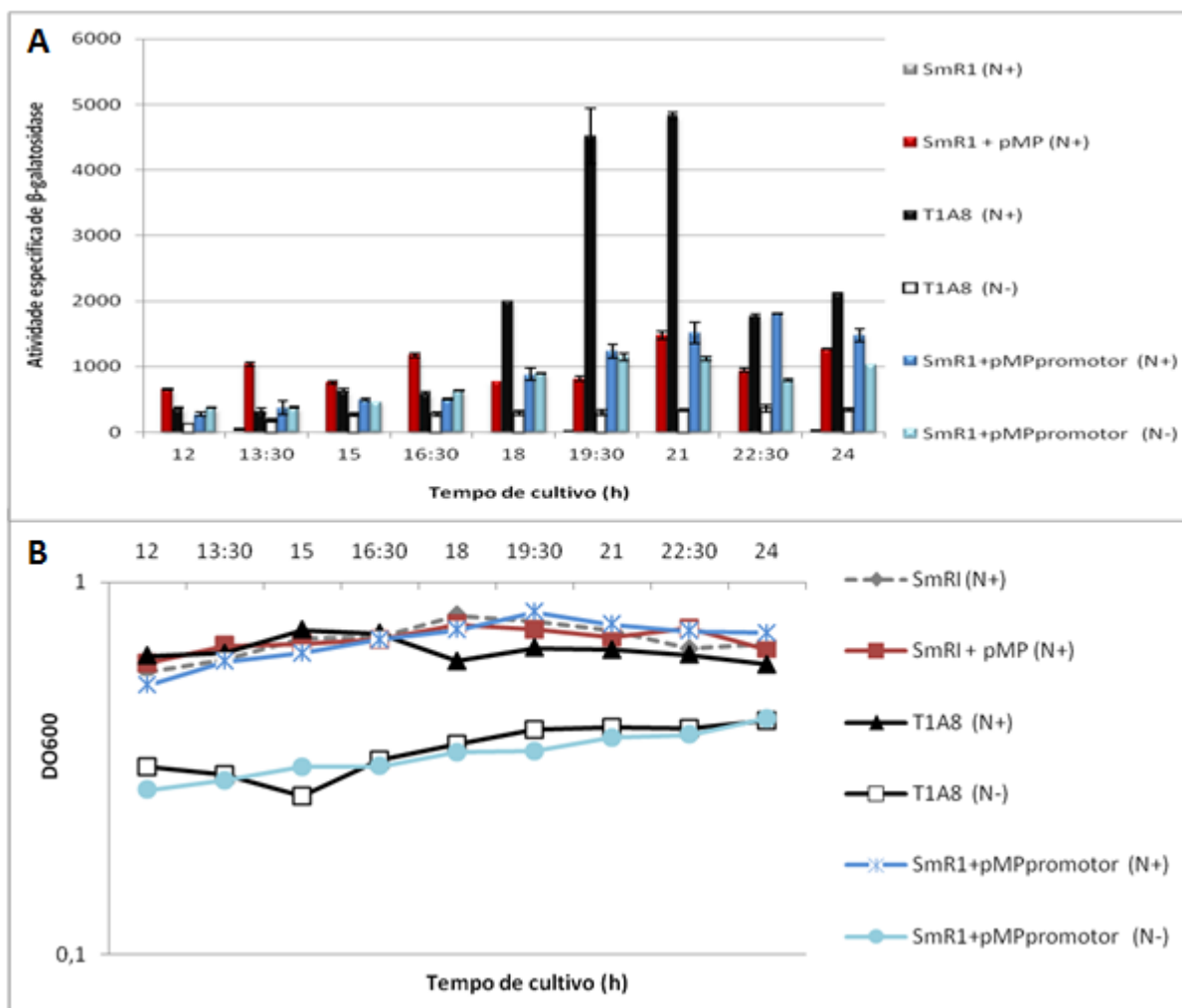
**FIGURA 25: Eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TAE 1X do produto de amplificação da região promotora do gene *ior* de *H. seropedicae* com uma deleção de 620pb.** Utilizando DNA plasmidial de colônias resistentes à tetraciclina como molde e tampão de reação padrão como descrito no item 5.5. O programa para a amplificação consistiu dos seguintes passos: 94°C-5' um ciclo; 94°C-45", 50°C-45" e 72°C – 1'. 25 ciclos; e 72°C-10' um ciclo. Linhas 1 a 11 produto de amplificação de diferentes plasmídeos isolados. Linha C indica o controle, o qual o produto de amplificação foi obtido de DNA genômico. Linha MW indica os marcadores de massa molecular (em bp). A seta indica o produto de amplificação (285 bp). O DNA foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida pelo sistema de fotodocumentação UVP.

## 6.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *IOR* NAS FUSÕES pMP*promotor::lacZ*, pMP $\Delta$ *ntrC::lacZ* e pMP $\Delta$ *ntrC* $\Delta$ *s54::lacZ*

A expressão do gene *ior* foi analisada pela determinação da atividade de  $\beta$ -galactosidase de clones contendo a região promotora íntegra ou deletada parcialmente fusionada ao gene *lacZ*.

O padrão de indução do gene *ior* na estirpe de SmR1 transformada com plasmídeo contendo a fusão pMP*promotor::lacZ* foi comparada com a estirpe mutante T1A8. Esta análise foi realizada em células cultivadas na condição de alta e baixa concentração de amônia durante o período de 24 horas.

A figura 26 mostra as atividades de  $\beta$ -galactosidase em atividade específica das culturas do mutante T1A8 e da fusão pMPpromotor:lacZ crescidas em meio NFbHPN-Malato. Como controle negativo foi utilizado a estirpe selvagem SmR1 contendo ou não o vetor pMP220.

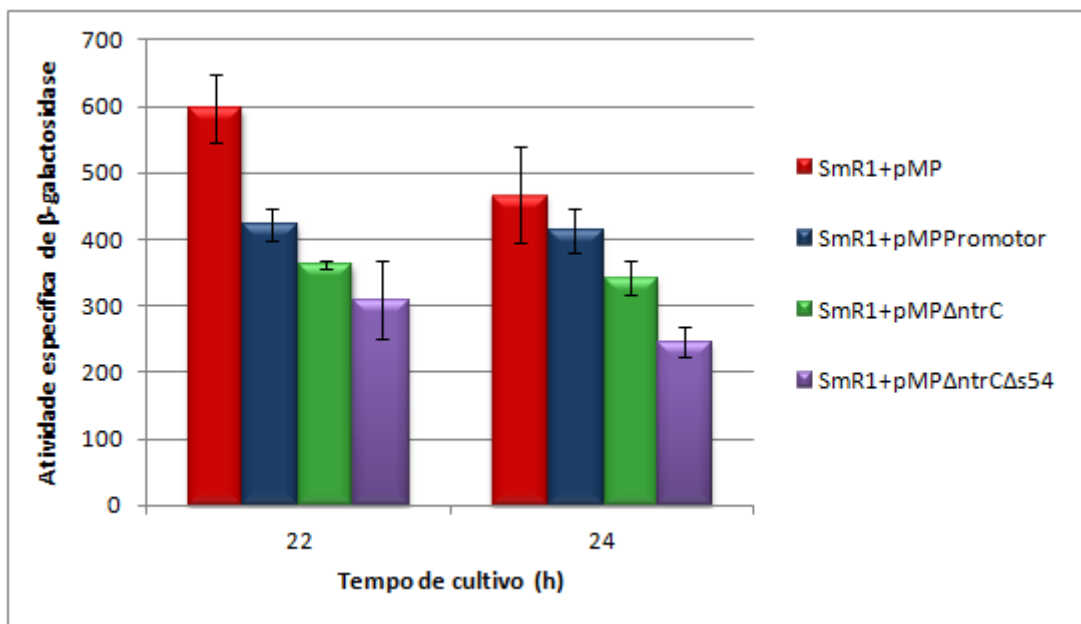


**Figura 26: Atividade específica de  $\beta$ -galactosidase de *H. seropedicae* estirpe SmR1 (selvagem) e transformada com os plasmídeos indicados e da estirpe T1A8 durante o período de 12 a 24 horas de cultivo. A. Os valores são a média da atividade específica de  $\beta$ -galactosidase de cada estirpe testada em duplicata expressa em nmol ONP/min/mg proteína, com intervalos de desvio padrão. A legenda N+ representa a condição alto nitrogênio (20 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), N- a condição de baixo nitrogênio (2 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). B. Curva de crescimento durante o período de 12 a 24 horas. O crescimento foi acompanhado através de absorvância em 600 nm utilizando leitor de microplaca.**

Conforme observado anteriormente (figura 2) a estirpe mutante T1A8 que possui uma fusão cromossomal *ior::lacZ* apresentou uma elevada expressão a partir de 18 horas de cultivo na presença de alta concentração de amônio. Entretanto, a estirpe SmR1 carregando a fusão plasmidial *pMP<sub>promotor</sub>::lacZ* apresentou uma menor atividade quando comparada a fusão cromossomal (mutante T1A8) na condição de alta concentração amônia. Além disso, o controle com a estirpe SmR1 contendo o vetor pMP220 (que possui o gene repórter *lacZ* sem promotor) apresentou uma atividade específica de  $\beta$ -galactosidase de escape relativamente alta, chegando a cerca de 1500 unidades de atividade específica. Esta elevada atividade controle indica, portanto, uma baixa expressão da fusão plasmidial nas condições testadas. Apesar da baixa atividade, entretanto, é possível observar que o perfil de expressão do gene *ior* nas diferentes fusões continua o mesmo, ou seja, é possível observar que a expressão do gene continua sendo durante a fase estacionária (Figura 26).

Para identificar qual é a sequência regulatória do gene *ior*, as fusões *pMP<sub>promotor</sub>::lacZ*, *pMP $\Delta$ *ntrC*::lacZ* e *pMP $\Delta$ *ntrC* $\Delta$ *s54*::lacZ* foram analisados em condição de alta concentração de nitrogênio durante o tempo de cultivo de 22 e 24 horas, esses tempos foram escolhidos por apresentarem a maior indução do gene *ior* na construção plasmidial *pMP<sub>promotor</sub>::lacZ*. As culturas foram crescidas em meio NFbHPN-Malato, como controle negativo foi utilizado a estirpe selvagem SmR1 contendo o vetor pMP220.

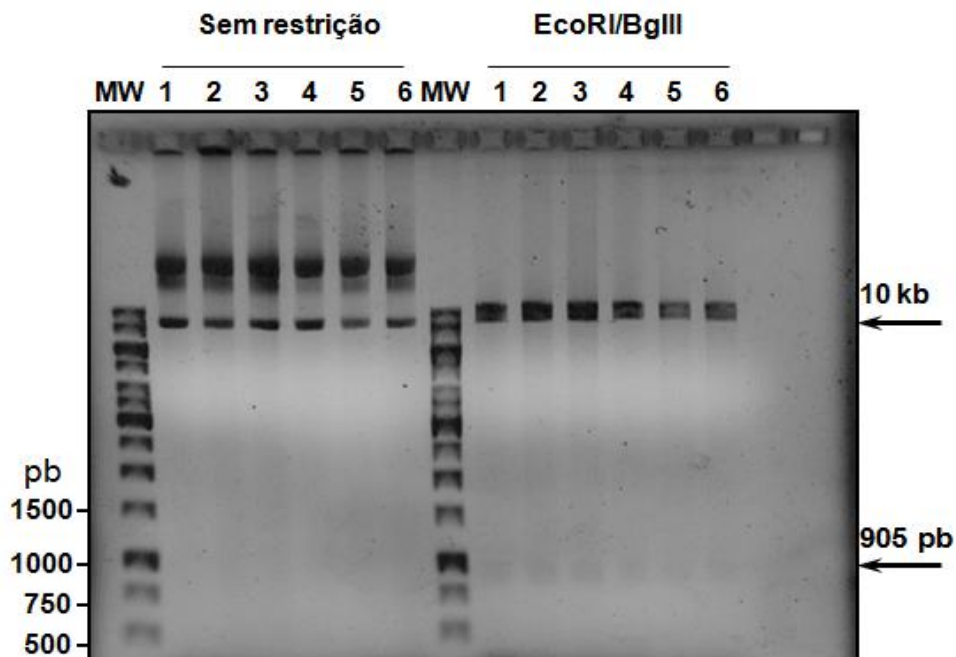
Podemos observar que novamente uma baixa atividade das fusões analisadas quando comparadas ao controle com a estirpe SmR1 contendo o vetor pMP220 (Figura 27). Considerando que todas as construções apresentam baixa atividade em *H. seropedicae*, os plasmídeos foram transferidos para *E. coli* estirpe ET8000 e a expressão das fusões foram analisadas.



**Figura 27: Atividade específica de  $\beta$ -galactosidase da estirpe SmR1 contendo pMP*promotor*, pMP*ΔntrC*, pMP*ΔntrCΔs54*.** As culturas foram crescidas em meio NFbHPN Malato contendo 20 mmol/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Os valores são a média da atividade específica de  $\beta$ -galactosidase de cada estirpe mutante testada em duplicata expressa em nmol ONP/min/mg proteína, com intervalos de desvio padrão.

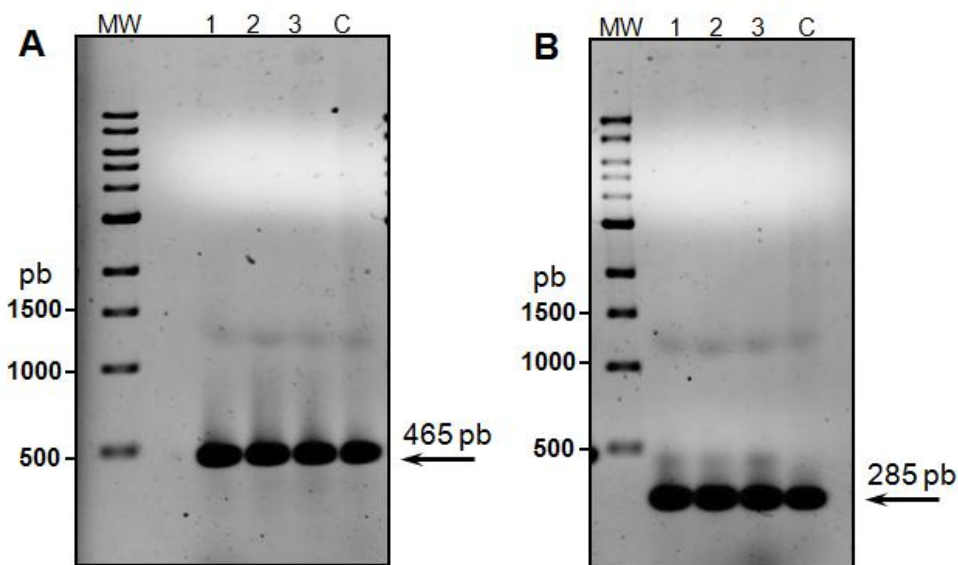
## 6.7. TRANSFORMAÇÃO DAS FUSÕES *lor::lacZ* NA *E. coli* ET8000

A fusão pMP*promotor::lacZ* foi transformada em ET8000, (item 5.11). Os clones foram confirmados por restrição utilizando as enzimas EcoRI e BglII através da liberação do fragmento de 905 pb inserido no vetor pMP220 (Figura 28, linhas 1 a 6).



**FIGURA 28:** Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X de plasmídeos isolados durante a transformação da fusão **pMP*promotor::lacZ*** em ET8000. As linhas de 1 a 6 correspondem aos plasmídeos isolados de diferentes clones resistentes ao antibiótico tetraciclina. À esquerda estão os plasmídeos não digeridos e à direita após digestão com as enzimas EcoRI e BglIII. As setas indicam o fragmento contendo a região promotora de 905pb e o vetor pMP220. MW indica os marcadores de massa molecular (em pb). O gel foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida pelo sistema de fotodocumentação UVP.

As fusões plasmidiais **pMP $\Delta$ *ntrC::lacZ*** e **pMP $\Delta$ *ntrC* $\Delta$ *s54::lacZ*** foram transformadas em ET8000 (item 5.11). Os clones foram confirmados por PCR (item 5.5), utilizando os primers *lor\_ntrC\_fwd* e *lor\_pmp220\_rev* para a fusão **pMP $\Delta$ *ntrC::lacZ***, tendo como DNA molde o plasmídeo purificado de colônias resistentes ao antibiótico tetraciclina (Figura 29 A, linhas 1 a 3). Para a fusão **pMP $\Delta$ *ntrC* $\Delta$ *s54::lacZ*** foram utilizados os primers *lor\_s54\_fwd* e *lor\_pmp220\_rev*, tendo também como DNA molde o plasmídeo purificado de colônias resistentes ao antibiótico tetraciclina (Figura 29 B, linhas 1 a 3).



**FIGURA 29: Eletroforese em gel de agarose 1% e tampão TAE 1X do produto de amplificação de segmentos da região promotora do gene *ior* de *H. seropedicae*.** Utilizando DNA plasmidial de colônias ET8000 resistentes à tetraciclina como molde e tampão de reação padrão como descrito no item 5.5. O programa para a amplificação consistiu dos seguintes passos: 94°C-5' um ciclo; 94°C-45", 50°C-45" e 72°C – 1'. 25 ciclos; e 72°C-10' um ciclo. Linha C indica o controle, o qual o produto de amplificação foi obtido de DNA genômico. Linha MW indica os marcadores de massa molecular (em pb). **A**, Linhas 1 a 3 produto de amplificação de diferentes plasmídeos isolados, a seta indica o produto de amplificação (465 pb). **B**, Linhas 1 a 3 produto de amplificação de diferentes plasmídeos isolados, a seta indica o produto de amplificação (285 pb). O DNA foi corado com brometo de etídeo e a imagem obtida pelo sistema de fotodocumentação UVP.

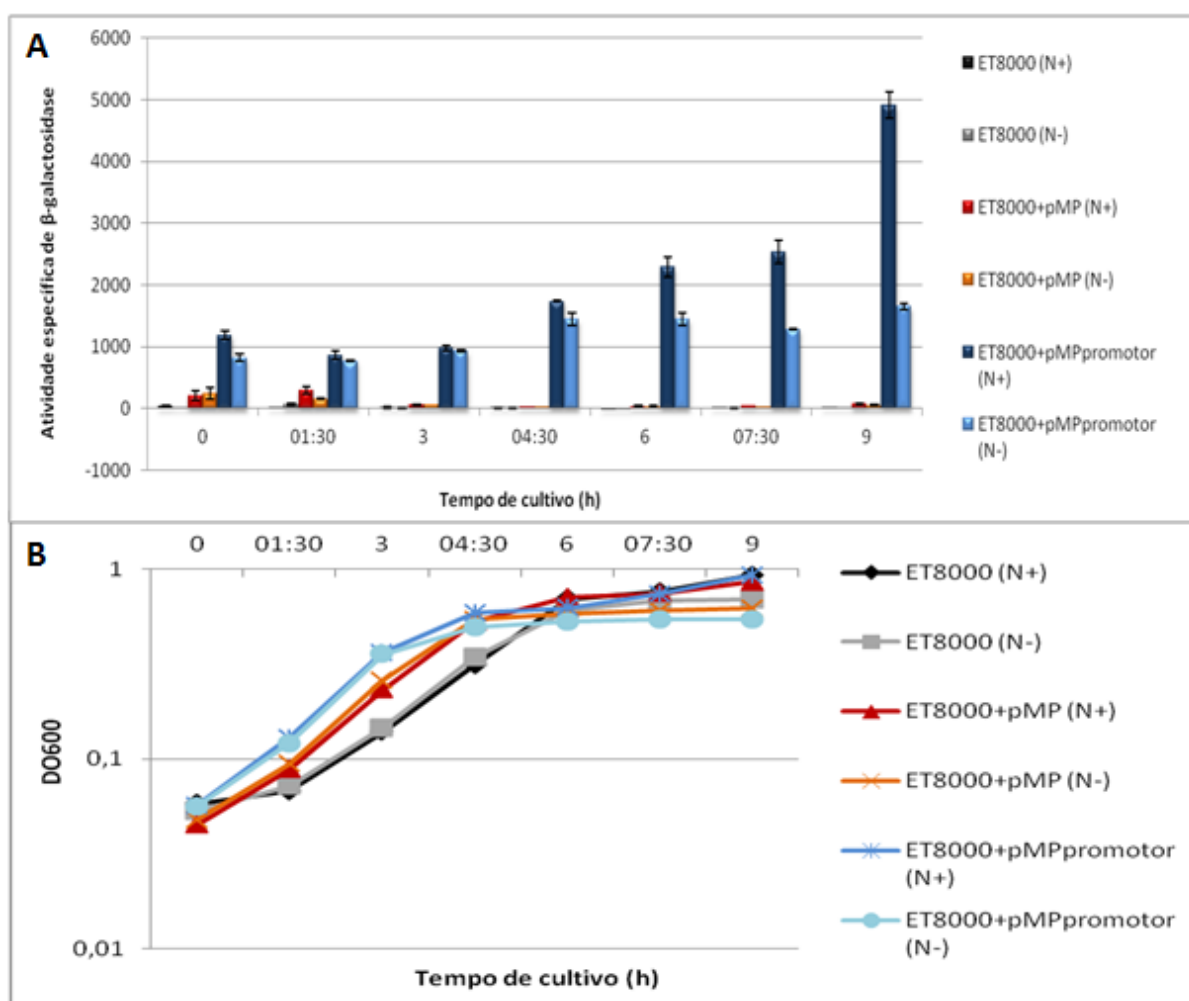
Para verificar o padrão de expressão do gene *ior* na bactéria ET8000, foi realizada uma análise da expressão deste gene em condição de alta e baixa concentração de amônia durante 9 horas de cultivo, utilizando a estirpe ET8000 contendo a fusão pMP*promotor::lacZ*. As culturas foram crescidas em meio NFDM, como controle negativo foi utilizado a estirpe ET8000 contendo ou não o vetor pMP220.

Podemos observar (Figura 30) que na condição de baixo nitrogênio a expressão do gene *ior* a partir de 4:30 horas de cultivo se mantém parecida até as 9 horas, e é importante salientar que durante este período a densidade populacional se mantém nesta condição. Diferentemente, na condição de alta concentração de nitrogênio a densidade populacional continua a aumentar depois de 4:30 horas de cultivo. Este resultado sugere que o gene *ior* não é induzido por alta concentração



de nitrogênio, uma vez que o gene parece ter uma atividade basal, e sendo induzido em fase estacionária.

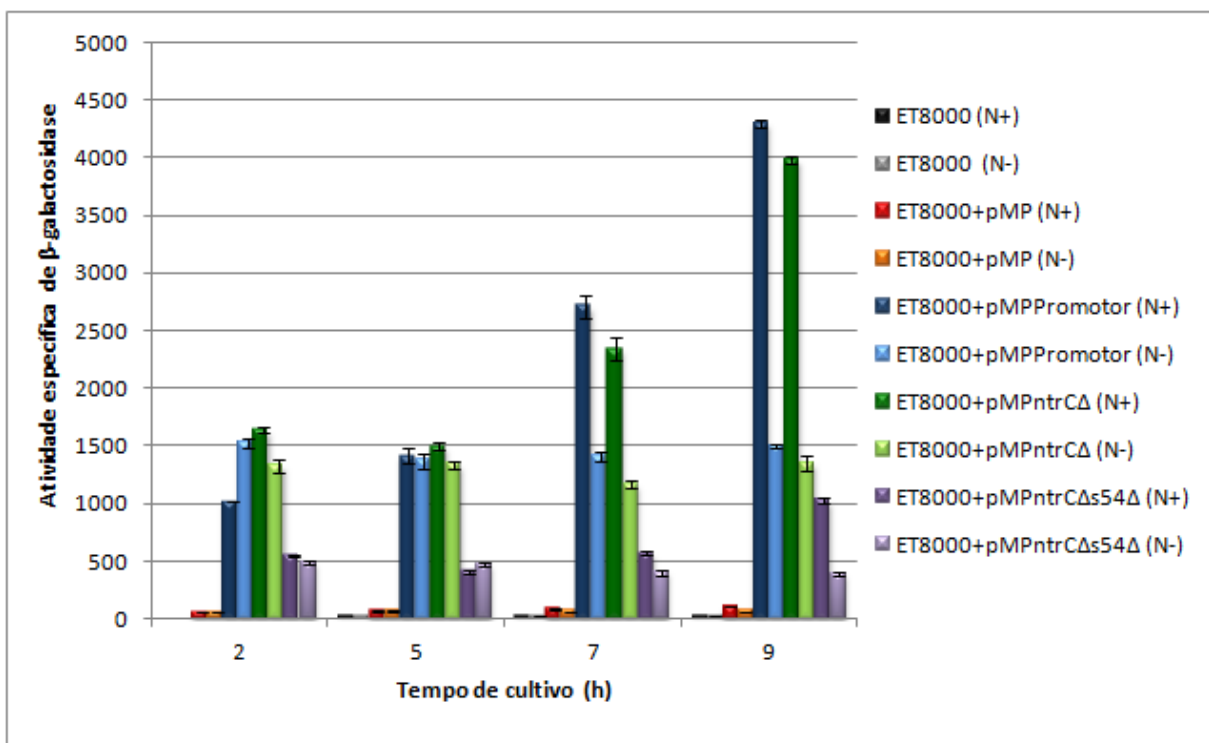
Estes resultados mostram também que não há nenhum problema com a fusão pMP*promotor::lacZ* e a baixa atividade desta fusão plasmidial em *H. seropedicae* deve ser uma característica da bactéria



**Figura 30: Atividade específica de β-galactosidase da fusão plasmidial pMP*promotor::lacZ* em ET8000 durante o período de 9 horas de cultivo. A.** Os valores são a média da atividade específica de β-galactosidase de cada estirpe mutante testada em duplicata expressa em nmol ONP/min/mg proteína, com intervalos de desvio padrão. A legenda N+ representa a condição alto nitrogênio (20 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl I), N- a condição de baixo nitrogênio (2 mmol/L de NH<sub>4</sub>Cl). **B.** Curva de crescimento durante o período de 0 a 9 horas. O crescimento foi acompanhado através de absorvância em 600 nM utilizando leitor de microplaca.

Para verificar o papel das sequências regulatórias presente na sequência promotora do gene *ior*, as fusões  $pMP_{promotor}::lacZ$ ,  $pMP_{\Delta ntrC}::lacZ$  e  $pMP_{\Delta ntrC\Delta s54}::lacZ$  foram analisados em condição de alta e baixa concentração de nitrogênio durante o tempo de cultivo de 2, 5, 7 e 9 horas. As culturas foram crescidas em meio NFDM, como controle negativo foi utilizado a estirpe ET8000 contendo ou não o vetor pMP220.

Podemos observar que a fusão  $pMP_{\Delta ntrC}::lacZ$  possui o mesmo padrão de expressão que fusão  $pMP_{promotor}::lacZ$  (Figura 31). O resultado sugere que a deleção de 440 pb não afeta a regulação da região promotora, sendo assim a sequência regulatória continua nesse segmento.



**Figura 31: Atividade específica de  $\beta$ -galactosidase em ET8000 durante o período de 2, 5, 7 e 9 horas de cultivo.** Os valores são a média da atividade específica de  $\beta$ -galactosidase de cada estirpe mutante testada em duplicata expressa em nmol ONP/min/mg proteína, com intervalos de desvio padrão. A legenda N+ representa a condição alto nitrogênio (20 mmol/L de  $NH_4Cl$ ), N- a condição de baixo nitrogênio (2 mmol/L de  $NH_4Cl$ ).

Na figura 31 é possível observar também que a fusão pMP $\Delta$ nrC $\Delta$ s54::lacZ possui uma menor expressão quando comparada com as demais fusões, cerca de 4 vezes menor. O resultado sugere que a deleção de 620pb causa redução da atividade da região promotora, provavelmente na região entre -199 e -379 em relação ao ATG tenha uma sequência regulatória relevante.

Levando em consideração que a indução do gene *ior* ocorre durante a fase estacionária de crescimento foi realizada uma análise para verificar prováveis sequências consenso para ligação do fator sigma RpoS ( $\sigma^{38}$  ou  $\sigma^S$ ). RpoS, ou  $\sigma^S$  é uma subunidade sigma da RNA polimerase da *Escherichia coli*, que é induzida e pode ser parcialmente substituída pelo fator vegetativo  $\sigma^{70}$  (RpoD) sob condições de estresse (HENGGE-ARONIS, 2002).

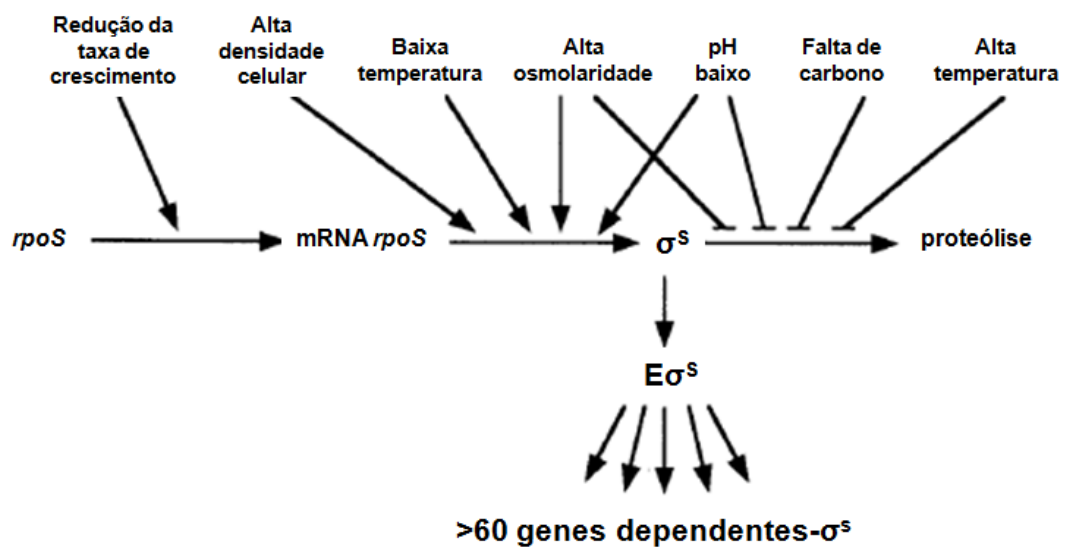
Genes dependentes  $\sigma^S$  não são somente induzidos em fase estacionária, mas também em respostas a muitas condições diferentes de estresse (BEARSON *et al*, 1996; SLEDJESKIL, GUPTAE E GOTTESMAN, 1996; MUFFLER *et al*, 1996; MUFFLER *et al*, 1997; HENGGE-ARONIS, 2002). Visto como um regulador mestre da resposta ao estresse geral, o qual é acionado por muitos sinais diferentes de estresse. Em contraste com a resposta de estresse específico que tende a eliminar o agente causador do dano e/ou para mediar à reparação celular, a resposta ao estresse geral torna a célula amplamente resistente de modo que os danos são evitados, em vez de precisar de reparos (HENGGE-ARONIS, 2002).

O metabolismo também é afetado por genes controlados por  $\sigma^S$ , as células mudam o metabolismo voltado para o crescimento máximo para um metabolismo de manutenção (HENGGE-ARONIS, 2002).

A resposta de estresse geral possui como parâmetro decisivo o nível celular de  $\sigma^S$ , estes níveis aumentam em resposta a falta por carbono, nitrogênio ou fosfato, bem como aminoácidos, e isto leva a entrada da fase estacionária (uma cessão completa ou parcial na taxa de crescimento) (HENGGE-ARONIS, 2002).

Condições indutoras adicionais são hiperosmolaridade (MUFFLER *et al*, 1996), temperatura elevada (MUFFLER *et al*, 1997) ou baixa (SLEDJESKIL, GUPTAE E GOTTESMAN, 1996), pH ácido (BEARSON *et al*, 1996), a densidade celular (HENGGE-ARONIS, 2002) e, provavelmente outras situações ambientais de estresse.

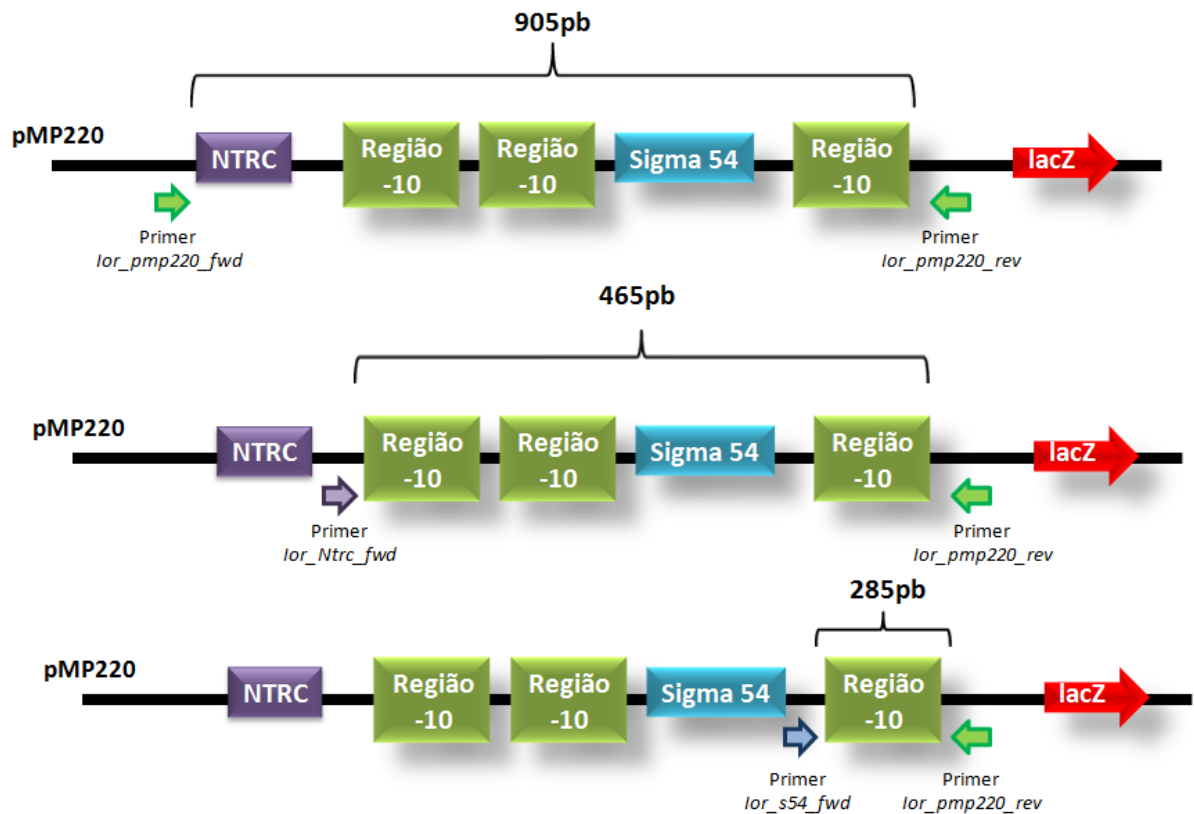
A regulação  $\sigma^S$  ocorre teoricamente em diferentes níveis (Figura 32) A transcrição RpoS é estimulada com a redução na taxa de crescimento (HENGGE-ARONIS, 2002). A taxa de transcrição de RpoS mRNA é estimulada por alta osmolaridade (MUFFLER *et al*, 1996) e pH ácido (BEARSON *et al*, 1996). Além disso, em resposta ao estresse como carência de nutrientes, pH ácido, hiperosmolaridade a proteólise do fator  $\sigma^S$  é consideravelmente reduzida ou cessada. Como consequência o nível de  $\sigma^S$  é rapidamente aumentado na célula (HENGGE-ARONIS, 2002).



**Figura 32: Vários níveis de regulação  $\sigma^S$  são diferentemente afetados por várias condições de estresse.** O nível celular de  $\sigma^S$  pode ser obtido ou pela estimulação da síntese de  $\sigma^S$  nos níveis de transcrição de  $rpoS$  ou na tradução do mRNA  $rpoS$  ou por inibição da proteólise de  $\sigma^S$ . Fonte: HENGGE-ARONIS, 2002-adaptado.

Durante o estudo foi possível verificar a existência de três sequências semelhantes à região -10 de promotores mostradas na figura 12, porém não foi verificado a sequência consenso para a região -35. Fatores  $\sigma^{70}$  e  $\sigma^{38}$  possuem alto grau de similaridade em suas sequências consensos, mas parece haver uma combinação de características para permitir a discriminação entre  $\sigma^{70}$  e  $\sigma^{38}$ . Typas e Hengge (2006) mostraram que região -35 parcialmente degenerada ou a exclusão completa dela confere uma maior seletividade para o fator sigma  $\sigma^S$  sobre o fator sigma  $\sigma^{70}$ .

Em relação às três sequências consenso relativas à região -10, uma delas é excluída como candidata para o fator sigma S, pois esta sequência continua no fragmento de 285pb (Figura 33), o qual corresponde a fusão pMP $\Delta$ ntrC $\Delta$ s54::lacZ que apresentou menor expressão quando comparada as demais fusões. Sendo assim, existem duas prováveis sequências consenso para região -10, nas quais o fator sigma S pode se ligar. Vale ressaltar que ambas as sequências consenso se encontram no fragmento de 465 pb (Figura 33), o qual corresponde a fusão pMP $\Delta$ ntrC::lacZ que obteve uma expressão parecida com a fusão pMP*promotor*::lacZ (905 pb), este resultado sugere que é nesta região de tamanho de 465 pb que corresponde a região regulatória do gene *ior*.



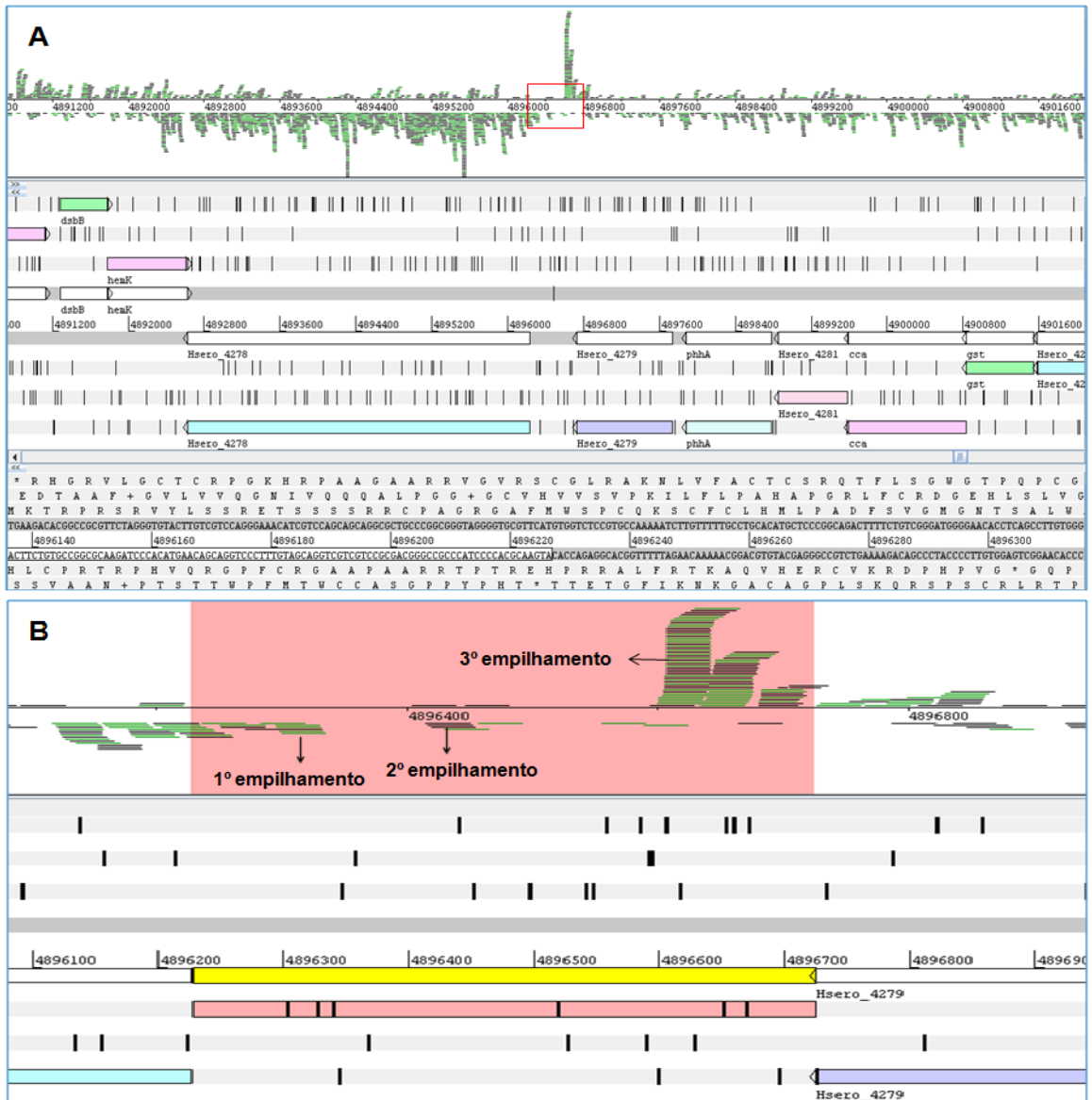
**Figura 33: Representação esquemática dos segmentos da região promotora do gene *ior*.** Estão mostradas as regiões para os fatores de regulação: Ntrc (roxo), região -10 (verde) e sigma 54 (azul).

O transcriptoma RNAseq (Tadra-Sfier *et al*, dados não publicados) mostra que a região entre os genes Hsero\_4278 e o gene Hsero\_4279 possui cerca de 500 pb, e é neste segmento onde se encontra a provável região promotora do gene *ior*, sendo o início do gene em 4.896.227 (Figura 34, A). Podemos observar que a região

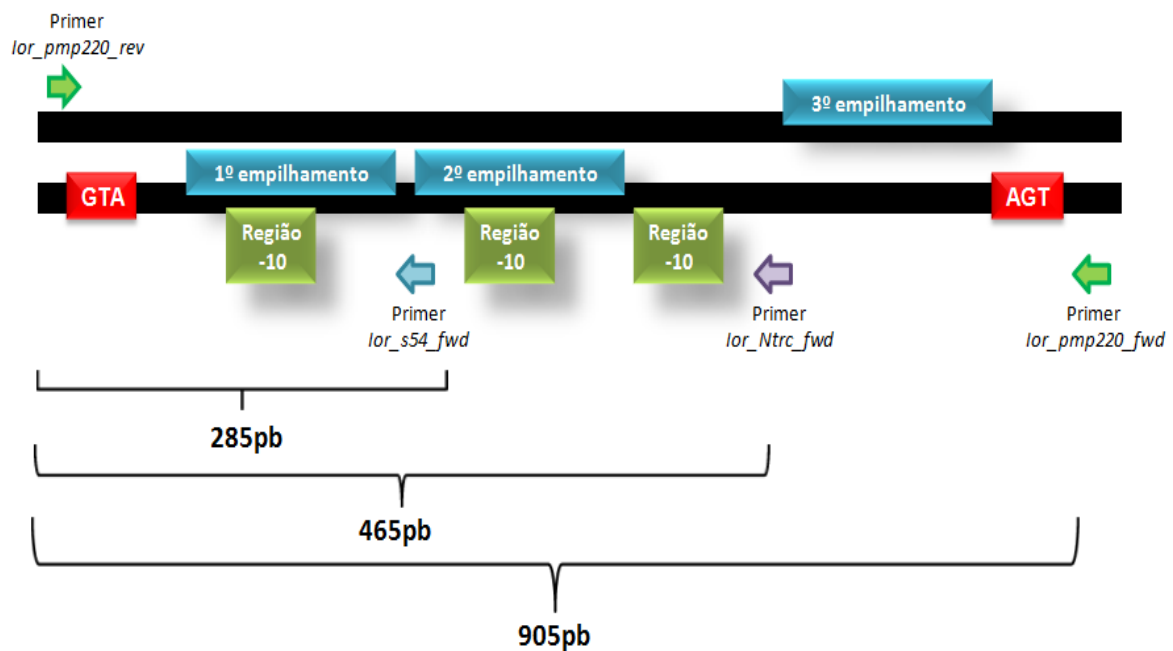
promotora não é bem coberta, possuindo três regiões com empilhamentos de leituras (*reads*) distintos, o final do primeiro *read* coincide com o início do transcrito (Figura 34, B). O segundo *read* se encontra entre 4896400 e 4896500 (Figura 34, B). O último *read* encontra-se na fita oposta e inicia-se próximo 4896600 (Figura 34, B).

O segmento da região promotora que possui 905 pb (fusão pMP*promotor*) possui o três empilhamentos mostrados na figura 35, o segmento de 465pb (fusão pMP $\Delta$ *ntrC*) possui o dois primeiros empilhamentos e cerca de 10 pb do 3º empilhamento. O segmento de 285 pb (fusão pMP $\Delta$ *ntrC* $\Delta$ s54) possui o primeiro empilhamento e cerca de 30pb pertencentes ao segundo empilhamento (Figura 35).

Os dados do transcriptoma conjuntamente com os ensaios de  $\beta$ -galactosidase realizados em ET8000, no quais indicam que região regulatória do gene se encontra entre -199 e -379 em relação à ATG, sugerem que a região -10 localizada entre o 2ª e o 3º empilhamento (Figura 35) seja a região de ligação para o fator sigma S.



**Figura 34: Região do genoma de *H. seropedicae* onde se encontra o gene Hsero\_4278. A,** Empilhamento de leituras distintas nas duas fitas na região do genoma onde se encontra o gene Hsero\_4278, indicado em azul claro. **B,** Detalhe da região, sinalizada em vermelho no painel A, para visualização de três empilhamentos na região intergênica. Os dados são visualizados pelo Artemis 13.0.



**Figura 35: Representação esquemática dos empilhamentos da região intergênica do gene *ior*.** Estão mostrados os três empilhamentos da região intergênica em relação às regiões -10, e aos segmentos da região promotora clonados no vetor de fusão pMP220.

Os resultados obtidos de todas as fusões inseridas na *E. coli* estirpe ET8000 sugerem que não há nada de errado com as construções, mas que provavelmente as fusões quando colocadas em *H. seropedicae* estirpe SmR1 sofra alguma interferência em suas expressões.

O 3º empilhamento que se encontra na fita oposta (Figura 34B e 35) corresponde a um micro RNA, e sugere-se uma possível competição entre a expressão do gene *ior* e do micro RNA. Além disso, a expressão deste micro RNA aparentemente é específico para *H. seropedicae* uma vez que existe a expressão em *E. coli* (fusão plasmidial *ior::lacZ*) e não em *H. seropedicae*. No entanto, um aspecto não avaliado é a diferença de regulação entre a fusão cromossomal e a fusão plasmidial.

Os resultados obtidos indicam que o gene *ior* de *H. seropedicae* é expresso em condições tardias com excesso de nitrogênio, e regulado negativamente por naringenina e AIA. Análises da sequência promotora indicam um possível sítio -10 localizado -315 nucleotídeos a 5' do início de tradução da proteína *lor* que pode responder ao fator sigma S. Análises de RNAseq também indicaram a expressão de



um microRNA na região promotora e na fita oposta de *ior*, o que poderia explicar a baixa expressão das fusões plasmidiais *ior::lacZ* em *H. seropedicae*. Estes dados também sugerem que a influência da expressão desse microRNA não ocorre em *E. coli*.

## 7. CONCLUSÕES

- A expressão do gene *ior* de *H. seropedicae* ocorre em fase estacionária de crescimento e em condições de excesso de nitrogênio.
- A expressão de *ior* é regulada negativamente por naringenina e AIA e aparentemente não sofre influência dos flavonóides crisina ou quercetina e dos compostos triptofano e indol.
- Um provável promotor tipo sigma S foi identificado a -315 nucleotídeos a montante do início de tradução do gene *ior*
- A expressão de um microRNA na região promotora e em direção oposta a *ior* pode influenciar a expressão deste em *H. seropedicae*.

## 8. REFERÊNCIAS

ALONI R, PRADEL K.S., ULLRICH C.I. The 3-dimensional structure of vascular tissues in *Agrobacterium tumefaciens* induced crown galls and in the host stems of *Ricinus communis* L. **Planta**. v.196. p. 597–605, 1995.

AZEVEDO, M. O. e organizadores. **Técnicas Básicas em Biologia Molecular**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003.

BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annu. Rev. Plant. Biol.** V. 57, p. 233-266, 2006.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 36. p. 86-93, 1986.

BALDANI, V. L.D.; BALDANI; J.I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biol. Fertil. Soils**. v.30. p. 485-491, 2000.

BASTIÁN, F., COHEN, A., PICCOLI, P., LUNA, V., BARALDI, R., BOTTINI, R., Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regul.** v. 24, p. 7-11, 1998.

BEARSON, S. M. D.; BENJAMIN JR, W. H.; SWORDS, W. E.; FOSTER, J. W. Acid shock induction of RpoS is mediated by the mouse virulence gene mviA of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.** v. 178. p. 2572-2579, 1996.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDL, M. T.; LINDOW, S. E. Cloning and Characterization of a Locus Encoding an Indolepyruvate Decarboxylase Involved in Indole-3-Acetic Acid Synthesis in *Erwinia herbicola*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 62. p. 4121–4128, 1996.

BRANDL M.T.; LINDOW S.E. Environmental signals modulate the expression of an indole-3-acetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola*. **Mol Plant–Microbe Interact.** v.10. p.499–505, 1997.

BROEK, A.V.; LAMBRECHT, M.; EGGERMONT, K.; VANDERLEYDEN, J. Auxins Upregulate Expression of the Indole-3-Pyruvate Decarboxylase Gene in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.** v. 181. p. 1338–1342, 1999.

CANNON, F. C.; DIXON, R. A.; POSTGATE, J. R. Chromosomal integration of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation genes in *E. coli*. **J. Gen Microbiol**, v. 80, p. 227-239, 1974.

CHUNG, C. T.; NIEMELA, S. L.; MILLER, R. H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.86. p. 2172-2175, 1989.

COSTACURTA A.; MAZZAFERA P.; ROSATO Y.B. Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. citri is increased in the presence of plant leaf extracts. **FEMS Microbiol Lett**. v. 159. p.215–220, 1998.

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S Ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **App. Environ. Microbiol**. v.67. p. 2375–2379, 2001.

DOBBELAERE S.; CROONENBORGH S.; THYS A.; VANDE BROEK A.; Vanderleyden J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant Soil**. v. 212. p.155–164, 1999.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**. v. 28, p. 241- 249, 2008.

FISCHER, H. M. Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. **Microbiol Rev**, v. 58, n. 3, p. 352-386, 1994.

GYÖRGYPAL, Z.; KONDOROSI, E.;KONDOROSI A. Diverse signal sensitivity of NodD protein homologs from narrow and broad host range rhizobia. **Mol. Plant-Microbe Interact**.v.4. p.356-364, 1991.

GRANT, S.G.N.; JESSEE, J.; BLOOM, F.R.; HANAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p.4645-4649, 1990.

HARTMANN, A.; SINGH, M.; KLINGMÜLLER, W. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. **Can J Microbiol**. v.29. p. 916-923, 1983.

HENGGE-ARONIS, R. Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the  $\sigma$ S (RpoS) Subunit of RNA Polymerase. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**. v.66. p. 373–395, 2002.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. *Herbaspirillum* An Endophytic Diazotrophic Colonizing Vascular Tissue In Leaves Of *Sorghum bicolor* L. Moench. **J. Experimen. Bot**. v.48. p. 785-797, 1997.

- KAPER, J.M.; VELDSTRA, H. On the metabolism of tryptophan by *Agrobacterium tumefaciens*. **Biochim Biophys Acta**. v.30. p.401–420, 1958.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal** (1ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen in *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **Can. J. Microbiol.** v. 43, p. 887-891, 1997.
- LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends Microbiol.** v. 8, n. 7, p. 298-300, 2000.
- LAST, R.L.; BISSINGER, P.H.; MAHONEY, D.J.; RADWANSKI, E.R.; FINK, G.R. Tryptophan mutants in *Arabidopsis* – the consequences of duplicated tryptophan synthase beta genes. **Plant Cell**. v.3. p.345–358, 1991.
- LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I.; ROUTABOUL, J-M.; BAUDRY, A.; POURCEL, L.; NESI, N.; CABOCHE, M. Genetics and Biochemistry of seed flavonoids. **Annu. Rev. Plant. Biol.** v.57, p. 405-430, 2006.
- LIU, P.; NESTER, E.W. Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits vir gene expression and growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.103. p.4658–4662, 2006.
- MAC NEIL, D. General method, using Mu-Mud1 dilysogens, to determine the direction of transcription of and generate deletions in the *glnA* region of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 146. p. 260-268, 1981.
- MACHADO, I.M.P.; YATES, M.G.; MACHADO, H.B., SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 29. p. 1599-1602, 1996.
- MAI, X.; ADAMS, M. W. W. Indolepyruvate Ferredoxin Oxidoreductase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus firiosus*. **J. Biol. Chem.** v. 269. p. 16726-16732, 1994.
- MERCANTE, F.M.; GOI, S.R.; FRANCO, A.A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizóbio. **Ver. Univ. Rural.** v. 22. p.65-81, 2002.
- MERRICK, M.; CHAMBERS, S. The Helix-Turn-Helix Motif of  $\sigma^{54}$  Is Involved In Recognition of the –13 promoter region. **J. Bacteriol.** v. 174, p. 7221-7226, 1992.

MILLER J H. **Experiments in molecular genetics**. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1972.

MORRIS, R. O. Genes Specifying Auxin and Cytokinin Biosynthesis in Phytopathogens. **Ann. Rev. Plant Physiol.** P. 509-538, 1986.

MUFFLER, A.; TRAUlsen, D. D.; LANGE, R.; HENGGE-ARONIS, R. Posttranscriptional Osmotic Regulation of the sigma (s) Subunit of RNA Polymerase in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v.178. p. 1607–1613, 1996.

MUFFLER, A.; BARTH, M.; MARSCHALL, C.; HENGGE-ARONIS, R. Heat Shock Regulation of sS Turnover: a Role for DnaK and Relationship between Stress Responses Mediated by sS and s32 in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 179. p. 445–452. 1997.

NELSON, D. L; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. (4 ed). São Paulo: Sarvier, 2006.

NINFA, A.J.; MAGASANIK, B. Covalent modification of the *ginG* product, NR<sub>I</sub>, by the *glnL* product, NR<sub>II</sub>, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.83. p. 5909-5913, 1986.

NORMANLY, J.; COHEN, J.D.; FINK, G.R. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.90. p.10355–10359, 1993.

OBERHANSLI, T.; DEFAGO, G.; HAAS, D. Indole-3-acetic-acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens* – role of tryptophan side-chain oxidase. **J Gen Microbiol.** v.137. p.2273–2279, 1991.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Appl Environ Microbiol.** v.68. p.3795–3801, 2002.

PEDROSA, F.O.; BENELLI, E.M.; YATES, M.G.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A.; KLASSEN, G.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; CHUBATSU, L.S.; RIGO, L.U. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Biotechnol.** v. 91. p. 189-195, 2001.

PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genet.** v. 7(5): e1002064, 2011.

PERLEY, J.E.; STOWE, B.B. The Production of Tryptamine from Tryptophan by *Bacillus cereus* (KVT). **Biochem. J.** v. 100. p. 169-174, 1966.

PHILIP, R. W.; BRAUN , A. C. Crown gall production by bacteria-free tumor tissues. **Science.** v. 94. p. 239-241, 1941.

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; VAN ONCKELEN, H. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Mol Plant–Microbe Interact.** v. 6. p.609–615, 1993.

PUYVELDE, S. V.; CLOOTS, L.; ENGELEN, K.; DAS, F.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Transcriptome Analysis of the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* Reveals an Extensive Auxin Response. **Microb Ecol.** p. 723–728, 2011.

RADWAN, T.E.E.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesq. Agrop. Bras.** v. 39, p. 987-999, 2004.

RONCATO-MACCARI, L D. B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y., CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.; SOUZA, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiol.**, v.45. p. 39-47, 2003b.

RONCATO-MACCARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E. M. Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. **Symbiosis.**, v.35. p. 01-10, 2003a.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** (2 ed.). New York: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.74. p. 5463-5467, 1977.

SEKINE, M.; WATANABE, K.; SYONO, K. Molecular cloning of a gene for indole-3-acetamide hydrolase from *Bradyrhizobium japonicum*. **J Bacteriol.** v.171. p.1718–1724, 1989.

SEQUETTO, L. P. **Efeitos de alendronato de sódio, sinvastatina, crisina e tintura de Camellia sinensis na osteoporose induzida por dexametasona em ratos.** 220 f. Tese (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

SHAW, L.J.; MORRIS, P.; HOOKER, J.E. Perception and modification of plant flavonoid signals rhizosphere microorganisms. **Environ. Microbiol.** V. 8, n. 11, p. 1867-1880, 2006.

SIDDIQUI, M. A.; FUJIWARA, S.; IMANAKA T. Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase from *Pyrococcus* sp. KOD1 possesses a mosaic structure showing features of various oxidoreductases. **Mol Gen Genet.** p. 433-439, 1997.

SIDDIQUI, M. A.; FUJIWARA, S.; TAKAGI, M.; IMANAKA, T. In vitro heat effect on heterooligomeric subunit assembly of thermostable indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase. **FEBS Lett.** v. 434. p. 372-376, 1998.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PULHER, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Biotechnology**, v. 1, p. 784-791, 1983.

SLEDJESKIL, D.D; GUPTAE, A.; GOTTESMAN, S. The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*. **EMBO J.** v. 15. p. 3993-4000, 1996.

SMITH, E. F.; TOWNSEND, C. O. A plant-tumor of bacterial origin. **Science.** v.25. p. 671-673, 1907.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling. **FEMS Microbiology Rev.** v.31, p. 425-448, 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 Mol Biol.** v.9. p.27–39, 1987.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum* a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiol Rev.** v.24. p.487–506, 2000.

TADRA-SFEIR, M. Z. **Mutagênese aleatória e identificação de genes regulados por naringenina em *Herbaspirillum seropedicae*.** 82 f. Tese (Mestrado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

TADRA-SFEIR, M. Z. **Caracterização funcional de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pelo flavonóide naringenina.** 145 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** (4 ed). São Paulo: Artmed, 2009.

THEUNIS, M.; KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W.J.; PRINSEN, E. Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3- acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Mol Plant–Microbe Interact.** v.17. p.1153–1161, 2004.

TYPAS, A.; HENGGE, R. Role of the spacer between the -35 and -10 regions in  $\sigma^S$  promoter selectivity in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** P. 1037–1051, 2006.



VIPREY, V.; GRECO, A. D.; GOLINOWSKI, W.; BROUGHTON, W.J.; PERRET, X. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Mol Microbiol.**, v. 26, p. 1381-1389, 1998.

ZHAO, Y.; CHRISTENSEN, S.K.; FANKHAUSER, C.; CASHMAN, J.R.; COHEN, J.D.; WEIGEL, D.; CHORY, J. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. **Science**. v.291. p.306–309, 2001.