

MICHELLE ZIBETTI TADRA

**Obtenção de genes mutagenizados da estirpe SmRI
de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pelo
flavonóide naringenina.**

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Bioquímica, BQ016, como requisito parcial à conclusão do Curso de Bacharel Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dr^a Rose Adele Monteiro

Co-orientador: Dr. Emanuel M. de Souza

CURITIBA
2006

MICHELLE ZIBETTI TADRA

**Obtenção de genes mutagenizados da estirpe SmRI
de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pelo
flavonóide naringenina.**

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Bioquímica, BQ016, como requisito parcial à conclusão do Curso de Bacharel Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dr^a Rose Adele Monteiro

Co-orientador: Dr. Emanuel M. de Souza

CURITIBA
2006

Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

TÍTULO DA MONOGRAFIA

Obtenção de genes mutagenizados da estirpe SmRI de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pelo flavonóide naringenina.

ALUNA

Michelle Zibetti Tadra

ORIENTADORA

Profa. Dra. Rose Adele Monteiro

Adjunto do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

CO-ORIENTADOR

Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Titular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

COLABORADORES

Profa. Dra. Roseli Wassem

Adjunto do Departamento de Genética

Lilian Noindorf - MSc

Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao professor Dr. Emanuel Maltempi de Souza, pela orientação, oportunidade de trabalhar no grupo, interesse, idéias e paciência.

À professora Dr^a Rose Adele Monteiro pela orientação, apoio, interesse, idéias, auxílio, amizade e por seu grande carinho.

À professora Dr^a Roseli Wassem por toda sua atenção, interesse, amizade e disponibilidade dispensados.

Aos professores do laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, Dr^a Liu Un Rigo, Dr Leonardo Cruz Magalhães, Dr^a Leda Chubatsu pela ajuda, sugestões e amizade e à Prof^a Dr^a Maria Berenice Steffens pelo carinho e conselhos.

Aos doutorandos Lílian Noindorf e Stefan Schwab, por todo auxílio, interesse, paciência, idéias e amizade.

Ao Marco Aurélio e Marco Antônio pela ajuda, atenção e amizade.

Ao pessoal do anexo, Lyz, Tuca, Anelís, Marcelo, Karen, Hudson, Vanessa, Giovani e Dani, pela atenção e por toda a alegria do dia-a-dia, e claro ao Helisson pela “encomodação” mas claro pelo carinho, atenção, auxílio e amizade dispensados.

A todo o pessoal do laboratório de Fixação de Nitrogênio, Fernanda, Carol, Rafa, Andrés, Ana Cláudia, Ju Osaki, Ju Inaba, Luciano, Gus, Fabiane, Giovana, Luiza, Adriana, Geraldo e Marcelo pela atenção e amizade.

Ao Valter pelas cantorias e claro por seu auxílio, dedicação, amizade e carinho.

À Dona Jú por toda sua atenção, apoio e carinho.

À Roseli Prado em especial, por toda paciência, auxílio, apoio, amizade e carinho.

Aos meus amigos de graduação Camila, Carolina, Emmanuel e em especial Stéfani por todas as risadas, dedicação, auxílio, incentivo e carinho.

À minha família, por todo apoio e incentivo, especialmente a meu tio Pedro pelo auxílio, a Tere pela preocupação, aos meus irmãos pela incomodação, e ao meu pai e minha mãe por todo o carinho.

Ao meu super noivo por toda sua dedicação, ajuda, apoio, amor, alegria e toda sua paciência em agüentar a estressada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	ix
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	01
1.2 Flavonóides	02
2. OBJETIVOS	06
3. MATERIAIS E MÉTODOS	07
3.1 Bactérias e plasmídeos	07
3.2 Meios de Cultura	08
3.3 Purificação de plasmídeos	09
3.4 Construção de mutantes aleatórios de <i>H. seropedicae</i> utilizando plasmídeo pTnMod-OGmKmlacZ.	09
3.5 Transformação bacteriana por eletroporação	10
3.5.1 Preparo de células competentes de <i>H. seropedicae</i> para eletroporação.	10
3.5.2 Transformação bacteriana	10
3.6 Transformação por conjugação	10
3.7 Análise dos mutantes na presença do flavonóide naringenina	11
3.7.1 Análise em placa	11
3.7.2 Ensaio de Atividade de β – galactosidase	11
3.7.2.1 Método padrão em tubo individual	11
3.7.2.2 Método em placa de 96 poços	12
3.8 Determinação da concentração de proteína	14
3.8.1 Método padrão em tubo	14
3.8.2 Método em placa de 96 poços	14
3.9 Preparação de naringenina	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Construção de mutantes aleatórios	16

4.2	Análise da expressão gênica dos mutantes na presença de naringenina	18
5.	CONCLUSÃO	23
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química da naringenina	05
Figura 2: Mapa físico do plasmídeo pTnMod-OGmKmlacZ	
Figura 3 – Esquema de construção de mutantes de <i>H. seropedicae</i>	11
Figura 4: Análise de expressão gênica diferencial em placa das estirpes mutantes de <i>H. seropedicae</i>	
Figura 5 – Atividade de β -galactosidase das estirpes mutantes analisadas em bloco de 96 poços	14
Figura 6: Atividade específica de β -galactosidase de cinco estirpes mutantes com expressão diferencial confirmadas	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estirpes de Bactérias de- <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	07
Tabela 2 – Estirpes de Bactérias de <i>Escherichia coli</i>	07
Tabela 3 – Lista de plasmídeos	07
Tabela 4 - Atividade de β -galactosidase das estirpes mutantes re-testadas em Tubo	15

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica endofítica, membro da subclasse β das Proteobactérias (Baldani *et al.*, 1986). Essa bactéria foi encontrada associada ao milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), e também à algumas espécies tropicais como a bananeira (*Musa spp*) e o abacaxizeiro (*Ananas comosus*). Estudos da interação de *H. seropedicae* com plantas mostraram o seu potencial como biofertilizante nitrogenado, e sua capacidade de estimular o desenvolvimento das plantas pela produção de fitohormônios. Mutantes aleatórios foram construídos pela inserção cromossomal aleatória de um plasmídeo (pTnMod-OGmKmlacZ) contendo um gene marcador *lacZ* e um gene que confere resistência à canamicina na estirpe selvagem SMRI. Foram obtidos três mil mutantes aleatórios de *Herbaspirillum seropedicae* estirpes SMRI. O gene *lacZ* não possui promotor, assim a expressão da β -galactosidase depende da presença do promotor a montante do ponto de inserção, o que permite a análise da expressão do gene mutagenizado em diferentes condições de crescimento. Os mutantes obtidos foram analisados quanto a expressão diferencial na presença do flavonóide naringenina. Os flavonóides são compostos liberados pelas plantas que agem como substâncias quimiotáticas e têm papel fundamental no processo de nodulação por bactérias do gênero *Rhizobium*. A expressão gênica diferencial foi analisada nestes mutantes através de ensaios de β -galactosidase e a identificação do gene mutado será feita por sequenciamento e comparação com o banco de dados do Programa Genoma do Paraná (GENOPAR).

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Herbaspirillum seropedicae*

As plantas não conseguem utilizar o nitrogênio atmosférico, por isso necessitam de bactérias fixadoras de nitrogênio, que o convertem em uma forma assimilável: a amônia. As bactérias fixadoras de nitrogênio mais eficientes estabelecem simbiose com plantas superiores, nas quais a energia para a fixação de nitrogênio e proteção para estas são fornecidas pela planta (MYLONA *et al.*, 1995)

Microrganismos endofíticos passam a maior parte do seu ciclo de vida dentro de tecidos de plantas, porém não causam, aparentemente, nenhum dano a estas (QUISPEL, 1992). Várias bactérias fixadoras de nitrogênio, denominadas de diazotrofos endofíticos, foram identificadas associadas com gramíneas, como por exemplo os gêneros *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia*.

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica endofítica, Gram-negativa, vibrióide, membro da subdivisão β das Proteobactérias (BALDANI *et al.*, 1986). Essa bactéria foi encontrada associada ao milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) (BALDANI *et al.*, 1984; PIMENTEL *et al.*, 1991; BODDEY *et al.*, 1995). O *H. seropedicae* também foi encontrado em espécies tropicais como a bananeira (*Musa spp.*) e o abacaxizeiro (*Ananas comosus*).

Estudos de inoculação artificial da bactéria, através de microscopia, em folhas de cana-de-açúcar mostraram que o *H. seropedicae* coloniza os vasos do xilema das folhas, permanecendo localizada no ponto de inoculação (OLIVARES *et al.*, 1997). Segundo BALDANI (1996) e OLIVARES *et al.*, (1997) a colonização das raízes de cana-de-açúcar por *H. seropedicae* é muito semelhante aquela observada para *Acetobacter diazotrophicus*, exceto que a colonização ocorre principalmente nas junções das raízes secundárias, onde através de espaços intercelulares colonizam o xilema.

O início da associação entre o arroz e o *H. seropedicae* ocorre através da adesão da bactéria à superfície das raízes, seguida de proliferação, preferencialmente nas raízes secundárias e ferimentos da epiderme, penetração e espalhamento da bactéria através dos

espaços intercelulares e feixes vasculares das partes aéreas com subsequente colonização e estabelecimento nos vasos do xilema (JAMES *et al.*, 1997). Essa associação entre *Herbaspirillum*-planta pode trazer mútuos benefícios. BALDANI e colaboradores (1995) inocularam diferentes estirpes de *Herbaspirillum* spp. Em sementes de arroz e observaram que a estirpe Z94 contribui com até 54% do nitrogênio total acumulado pela planta; as outras estirpes também contribuíram com aproximadamente 30% do nitrogênio.

Os resultados descritos acima indicam que o *H. seropedicae* tem grande potencial como biofertilizante nitrogenado, além de estimular o desenvolvimento das plantas pela produção de fitohormônios (OLIVARES *et al.*, 1997).

Os genes responsáveis pela interação planta-*H. seropedicae* ainda não são conhecidos, mas assim com em rizóbios acredita-se que eles podem ser regulados por diversos fatores que podem incluir flavonóides.

1.2 Flavonóides

O primeiro indutor estudado foi isolado de sementes de alfafa e identificado com um composto fenólico, denominado flavona luteolina, que é derivado dos fenilpropanóides (PETERS *et al.*, 1986). Após a identificação desse flavonóide (luteolina), outros indutores presentes nas sementes e raízes de outras leguminosas hospedeiras começaram a ser investigados.

Os flavonóides pertencem a uma ampla classe de metabólitos secundários, sendo distribuídos por todo o reino vegetal e sintetizados tanto na parte aérea quanto nas raízes (HARBORNE, 1967). São compostos liberados pelas plantas que agem como substâncias quimiotáticas e estimulam a multiplicação das bactérias na rizosfera. Eles têm papel fundamental no processo de nodulação de leguminosas por bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (HUNGRIA, M.1994).

Os diversos trabalhos que vêm sendo desenvolvidos mostram que as plantas hospedeiras liberam grupos diferentes de flavonóides. Contudo, o espectro de flavonóides é dependente da espécie de planta (ROLFE, 1988) e do estágio de desenvolvimento da planta (HARTWIG *et al.*, 1990; PHILLIPS, 1992). Os flavonóides exsudados por sementes e raízes de uma determinada leguminosa consiste de uma mistura

de indutores fracos e fortes, além de compostos inibidores e ineficazes (MULLIGAN e LONG, 1985; PETERS *et al.*, 1986; REDMOND *et al.*, 1986; HARTWIG *et al.*, 1989,1990; HUNGRIA *et al.*, 1992).

Os efeitos dos indutores podem ser aditivos ou sinérgicos, mas os indutores fracos em quantidades modestas podem reduzir o efeito de indutores fortes (HARTWIG *et al.*, 1989). Os indutores potentes podem atuar em concentrações menores que 1mmol/L (GÖTTFERT, 1993). Segundo HARTWIG *et al.*, (1989), a presença de concentrações subótimas de diferentes indutores podem resultar num aumento sinérgico na expressão do gene.

As bactérias do solo pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*, comumente referidas como rizóbios, são capazes de associar-se simbioticamente com espécies leguminosas, formando estruturas especializadas, os nódulos radiculares. Este processo de nodulação é controlado, em grande parte, pela troca de sinais entre a bactéria simbiote e a planta hospedeira (MERCANTE *et al.*, 2002).

A expressão dos genes bacterianos responsáveis pela síntese dos fatores Nod (genes *nod*) é induzida por flavonóides excretados pelas raízes das plantas. Estes flavonóides ativam a proteína NodD, que ativa a transcrição de outros genes envolvidos na síntese de lipo-quitto-oligossacarídeo, chamados de fatores Nod (GÖTTFERT *et al.*, 1993). Os fatores Nod são produzidos através da ação dos produtos dos genes *nod*, *noe* e *nol* e são divididos em duas categorias: os genes *nod* estruturais e os genes *nod* específicos. O primeiro grupo é composto pelos genes *nodABC*, comuns entre os rizóbios, os quais codificam enzimas responsáveis pela síntese da estrutura básica do nódulo, sendo que este é posteriormente modificado por outras enzimas codificadas pelos outros genes específicos da espécie (MARGAERT *et al.*, 1997).

Além dos fatores Nod que são essenciais para formação dos nódulos, existem outros determinantes que influenciam na simbiose, dentre os quais foi encontrado, em rizóbios, o sistema de secreção Tipo III (TTSS), que primeiramente foi identificado em bactérias patogênicas de plantas e animais (MARIE *et al.*, 2001). Em rizóbios este sistema é ativado da mesma forma que os genes Nod, ou seja, através da ativação da proteína NodD por flavonóides. Os genes TTSSs são expressos no estágio intermediário da simbiose,

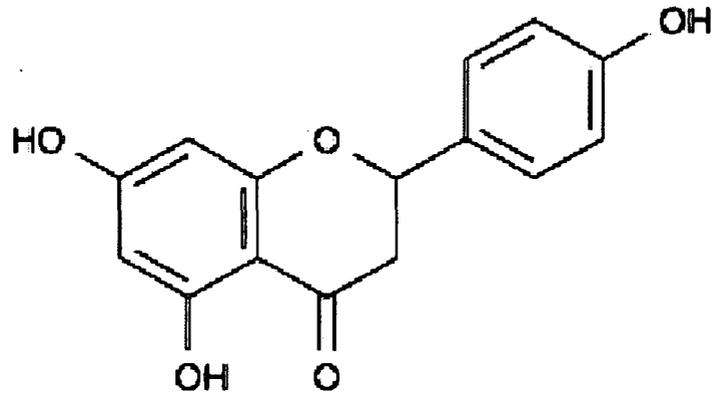
depois dos genes *nod* mas antes dos genes *fix* e *nif* (estes últimos responsáveis pela fixação de nitrogênio), o que indica que os genes TTSS não são requeridos para a fixação de nitrogênio mas sim para a infecção pela bactéria (VIPREY *et al.*, 1998).

Os genes *hrp* codificam proteínas que formam o sistema de secreção do tipo III (TTSS), e intermediam a transferência de proteínas através da membrana bacteriana e da membrana plasmática eucariótica das células hospedeiras (BUTTNER e BONAS 2002). O sistema HRP injeta proteínas estrategicamente nas células hospedeiras sem causar nenhum processo proteolítico. As proteínas secretadas por esse sistema têm como funções regular a secreção de outras proteínas por esse sistema, facilitar a translocação das proteínas secretadas nas células hospedeiras e alterar diretamente as funções e estruturas das células hospedeiras (GREENBERG e VINATZER, 2003). Como consequência as proteínas codificadas por esses genes permitem a colonização, crescimento patogênico e exploração da planta (LONG e STASKAWICZ, 1993).

A associação de bactérias diazotróficas endofíticas com raízes de plantas não resulta na formação de estruturas vegetais facilmente detectáveis. Por causa desta falta de um fenótipo claro, devido principalmente a dispersão da bactéria por todo o corpo da planta, os mecanismos de interação e estimulação de crescimento vegetal por estas bactérias são pouco conhecidos.

Naringenina, um flavonóide específico (Figura I), encontrada na associação entre *Phaseolus vulgaris* e *Rhizobium leguminosarum*, exsudada de radiculares das raízes (HUNGRIA *et al.*, 1991), que estimula a colonização através das rachaduras das raízes laterais (LRC) que são independentes dos genes *nod* (GOUGH *et al.*, 1997).

Figura 1- Estrutura química da naringenina



Estrutura química da naringenina cuja fórmula é 5,7,4'-tri-hidroxi-flavanona.

Os genes responsáveis pelo processo de colonização do *Herbaspirillum seropedicae* ainda não foi esclarecido e vários genes podem estar envolvidos neste processo. Através da obtenção de mutantes aleatórios e análise dos genes mutagenizados, a partir do gene repórter *lacZ*, na presença de naringenina, poderemos identificar quais são os genes que apresentam uma diferença de expressão na presença do flavonóide e qual o papel deste na colonização de plantas por *H. seropedicae*.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral obter linhagens de *Herbaspirillum seropedicae* com inserções do cassete repórter *lacZ* em genes regulados pelo flavonóide naringenina. Para isso apresenta os seguintes objetivos específicos:

- Obter uma coleção de mutantes aleatórios com o plasmídeo pTnMod-OgmK*lacZ*;
- Analisar nestes mutantes aleatórios a expressão do gene *lacZ* na presença do flavonóide naringenina;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Bactérias e plasmídeos

Tabela 1

Estirpes de Bactérias de- *Herbaspirillum seropedicae*

Estirpe	Referência
SmR1	PEDROSA <i>et al.</i> , 1997

Tabela 2

Estirpes de Bactérias de *Escherichia coli*

Estirpe	Referência
S17.1	SIMON <i>et al.</i> , 1983
Top10	INVITROGEN

Tabela 3

Plasmídeos

Plasmídeo	Características	Origem – Referência
pTnMod- OGmKmlacZ	Km ^R , Gm ^R , lacZ sem promotor, Tn	SCHWAB, S. Trabalho não publicado.

3.2 Meios de Cultura

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Broth (LB) e Luria-Broth agar (LA). O meio sólido (LA) é obtido pela adição de ágar (15g/L) ao meio líquido (LB).

O meio LB possui a seguinte composição:

Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de sódio	10 g/L
Triptona	10 g/L

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio NFbHPN (MACHADO et al., 1995), utilizando malato como fonte de carbono.

O meio NFb malato apresenta a seguinte composição:

MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻¹ g/L
NaCl	1,0 x 10 ⁻¹ g/L
CaCl ₂	2,0 x 10 ⁻² g/L
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 ⁻² g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻² g/L
Ácido málico	5,0 g/L
Biotina	1,0 x 10 ⁻⁴ g/L
NaMoO ₄ .2H ₂ O	2,0 x 10 ⁻⁴ g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	2,35 x 10 ⁻⁴ g/L
H ₃ BO ₃	2,8 x 10 ⁻⁴ g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	8,0 x 10 ⁻⁶ g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,4 x 10 ⁻⁵ g/L
pH	6,5

A mistura de fosfato será autoclavada separadamente e adicionada fria ao meio em um volume de 50 mL/L.

A composição da solução de fosfatos é:

K ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	159,7 g/L
K ₂ HPO ₄	17,8 g/L

Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH₄Cl 20 mmol/L.

3.3 Purificação do plasmídeo

A purificação do plasmídeo a partir da bactéria *E. coli*, estirpe Top10, foi realizada pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). Três mililitros de uma cultura cultivadas durante aproximadamente 12 horas foram centrifugadas a 13.000 rpm por 2 minutos. O sedimento de células foi ressuspenso em 200 µL de tampão GET (50 mmol/L glicose, 25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 10 mmol/L de EDTA pH 8,0) A lise foi então efetuada com 200 µL de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% e NaOH 200 mmol/L adicionados vagarosamente. Em seguida 200 µL de acetato de potássio 3 mol/L pH 4,8 foram acrescentados e após homogeneização a mistura será mantida 10 minutos no gelo. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi separado e precipitado pela adição de 600 µL de isopropanol. Depois de 15 minutos no gelo as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos, o precipitado será dissolvido em H₂O ultra pura. Os plasmídeos foram novamente precipitados com 3 volumes de etanol absoluto por 1 hora a temperatura ambiente. Após a centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos o precipitado foi lavado com etanol 80%, e seco à vácuo. O precipitado foi dissolvido em água.

3.4 Construção de mutantes aleatórios de *H. seropedicae* utilizando plasmídeo pTnMod-OGmKmlacZ.

Os mutantes aleatórios foram construídos devido a inserção aleatória do transposon no genoma do microrganismo. Para isso será utilizado os plasmídeo pTnMod-OGmKmlacZ.

O plasmídeo foi transformado por eletroporação ou conjugação na estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. Os mutantes foram selecionados a partir da resistência ao antibiótico canamicina (500 µg/mL) e gentamicina (80 µg/mL).

3.5 Transformação bacteriana por eletroporação

3.5.1 Preparo de células competentes de *H. seropedicae* para eletroporação.

Vinte e cinco mililitros de meio líquido NFBHPN malato foram inoculados na proporção de 1/100 com uma cultura crescida durante 12h. A cultura foi incubada sob agitação a 30°C até atingir uma D.O₆₀₀ entre 0,5 e 1,0. Após crescimento, a cultura foi mantida no gelo durante 30 minutos e, em seguida, centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos. As células foram lavadas duas vezes com 40 mL de H₂O estéril gelada, sendo então ressuspensas em 10 mL de glicerol 15%. Após centrifugação a 4.000 rpm por 5 minutos, o sedimento de células foi ressuspenso em 0,2 mL de glicerol 15%. A suspensão celular foi fracionada em alíquotas de 40 µL e armazenada a -70°C:

3.5.2 Transformação bacteriana

O método utilizado para transformação bacteriana foi o descrito pelo fabricante (Gibco-BRL), 1 µL da mistura da ligação foi adicionada a 40 µL da suspensão de células eletrocompetentes, mantendo-se a mistura no gelo por pelo menos 1 minuto. Em seguida essas células foram transferidas para um cubeta de eletroporação (BRL) sendo submetidas a um campo elétrico (4 KΩ, 330 µF) para permitir a entrada do plasmídeo na célula. Após a eletroporação as células foram ressuspensas em 1 mL de meio NFbmalato e incubadas a 30°C, sob agitação por 1 hora. Após a incubação, alíquotas da suspensão foram plaqueadas em meio NFbHPN malato sólido contendo o antibiótico canamicina (500 µg/mL) a fim de selecionar os transformantes.

3.6 Transformação por conjugação

As estirpes doadora (*Escherichia coli* estirpe S17.1) e receptora (*H.seropedicae* estirpe SmRI) foram cultivadas em meios próprios sem antibiótico, sendo que a receptora por 6 horas e a doadora por 3 horas.

Para a transformação das estirpes de *H. seropedicae*, 5 µL da estirpe doadora serão misturados com 50 µL de estirpe receptora (MILLER, 1992). Esta mistura será plaqueada em meio NFbHPN malato sólido: LA 3:1, a risco. As placas serão incubadas a 30°C,

durante a noite. As colônias formadas serão raspadas e ressuspensas em 1 mL de meio líquido e, então, 100 μ L desta suspensão replaqueadas em NFbHPN malato sólido na presença dos antibióticos adequados para a seleção dos transconjugantes. Incubou-se a 30°C, até a visualização das colônias dos transconjugantes.

3.7 Análise dos mutantes na presença do flavonóide naringenina

3.7.1 Análise em placa.

Foram construídas placas de 96 poços com os mutantes aleatórios e destas os mutantes aleatórios replaqueados para análise na presença do flavonóide. Para análise foram construídas duas placas sendo uma denominada controle com meio NfbHP malato sólido, canamicina (500 μ g/ml), gentamicina (80 μ g/ml), 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidase (30 μ g/ml – X Gal) e a placa com o flavonóide contendo todos os compostos da placa controle adicionando o flavonóide naringenina (50 μ mol/L). As placas foram incubadas à 30°C por 24 horas. Após esse período os mutantes que apresentarem expressões diferenciadas de β -galactosidase, através de análise por visualização, foram coletadas e armazenadas, para posterior análise em ensaio em meio líquido.

3.7.2 Ensaio de Atividade de β -galactosidase.

3.7.2.1 Método padrão em tubo individual

Este método foi baseado no ensaio de MILLER (1972), mas foi efetuado com algumas adaptações. O crescimento foi feito em 3 mL de NFbHPN malato líquido, em vidro de 5 mL, com canamicina (500 μ g/mL) incubado à 30°C por 12 horas. Após o primeiro crescimento, foi realizado um segundo crescimento com as condições a serem analisadas. Foram feitas 2 condições, uma controle e a outra com o flavonóide naringenina, a controle foi feita em 3 mL de NFbHPN malato líquido com canamicina (500 μ g/mL) e a com flavonóide, com todos os componentes da controle mais o flavonóide naringenina (50 μ mol/L). O ensaio iniciou no momento que foi detectado o crescimento da cultura com uma D.O.₆₀₀ de 1,2 a 1,5. Alternativamente à apresentação da atividade de β -galactosidase em função da densidade ótica da cultura a 600 nm, neste

ensaio relacionou-se o valor de D.O.₄₁₅ em função da concentração de proteína da cultura, mas ao invés de se coletar ~700 µL da cultura para determinação da D.O.₆₀₀ foram coletados 20 µL para a determinação da concentração de proteína (em tubo individual – 3.8.1) da amostra de cultura. Desta forma, a atividade específica de β-galactosidase foi dada em unidades arbitrárias (U.A.):

Atividade específica β-galactosidase:

$$\frac{1000 \cdot (D.O._{420} - 1,75 \cdot D.O._{530})}{V.t. \cdot [prot]}$$

em que V foi o volume de amostra ensaiado (0,050 mL); t foi o tempo de reação (em minutos); e $[prot]$ a concentração de proteína da cultura (em mg/mL).

3.7.2.2 Método em placa de 96 poços

Este método foi padronizado segundo SCHWAB, S. (2002), tendo como base o ensaio de atividade de β-galactosidase descrito por MILLER (1972), mas com algumas adaptações. Foi utilizado para a caracterização o gene *lacZ*, inserido através da inserção do transposon, que codifica a enzima β-galactosidase. O sistema de reação é o mesmo que o sistema em tubo, porém com um fator de diminuição de volume de 2,5 vezes.

Deste modo, foi crescido em bloco de 96 poços, em 1,250 mL em meio líquido NFbHPN malato com canamicina (500 µg/mL), as estirpes mutantes em agitador de placas à 30°C durante 12-14 horas. Após este primeiro crescimento foi realizado um novo crescimento agora com os meios a serem analisados tendo sido feito dois blocos um denominado controle com NFbHPN malato e canamicina (500 µg/mL), e outro com todos os compostos do bloco controle mais o flavonóide naringenina (50 µmol/L), durante 12 a 14 horas à 30°C no agitador de placas.

Destas foram transferidos 20 µL de cultura de *H. seropedicae* (em triplicata), que apresentaram D.O.₆₀₀ entre 1,2 e 1,5, ou de meio de cultura (branco de reação) para um poço de um bloco de 96 poços de 2,2 mL (MEGA-Titer plate, Sorenson, nº catálogo 23130) contendo 380 µL de mistura de tampão Z (SDS 0,27% e β-mercaptopaetanol

0,39% em $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mmol/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mmol/L, KCl 10 mmol/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mmol/L, pH 7,0). Foram adicionados 25 μL de clorofórmio. A placa foi velada com uma tampa adesiva (Sorenson Bioscience, Inc., nº de catálogo 21950). Misturou-se em agitador de placas (cerca de 2 minutos), centrifugou-se brevemente e deixou-se estabilizar em banho-maria a 28°C, por 10 minutos. Para iniciar a reação foram adicionados 80 μL de solução de *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG 4 mg/mL em tampão Z) e, depois de determinado período de tempo (conforme o desenvolvimento da coloração amarela), adicionados 200 μL de uma solução de Na_2CO_3 1 mol/L, para interromper a reação. A mistura foi centrifugada a 2600 \times g (utilizando rotor para placas) durante 10 minutos. Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para uma placa de fundo chato (Greiner Bio-One, nº de catálogo 655180) para a leitura da D.O._{415} no leitor de microplacas Benchmark, da Bio-Rad (EUA).

A atividade específica de β -galactosidase foi dada em nanomoles de ONP formado por minuto por miligrama de proteína total (nmol ONP/mom/mg proteína). Considerou-se o coeficiente de extinção molar para *o*-nitrofenol (ONP) a 415 nm, no sistema com a reação terminada com a adição de Na_2CO_3 , em placa de fundo chato (Greiner Bio-One, nº de catálogo 655180) de 4596 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Este valor permite a conversão entre a D.O._{415} e a quantidade de ONP formado na reação de hidrólise do ONPG. Considerando isto, a atividade específica foi expressa em nanomoles de ONP por minuto por miligrama de proteína através da seguinte equação:

Atividade específica β -galactosidase:

$$\frac{\text{D.O.}_{415} \cdot 255 \text{ nmol ONP}}{\text{V.t. } [\text{prot}]}$$

em que V foi o volume de amostra ensaiado (0,20 mL); t foi o tempo de reação (em minutos); $[\text{prot}]$ foi a concentração de proteína determinada (em mg/mL); e 255 nmol ONP representava um fator de conversão entre D.O._{415} e nmol de ONP. Este valor foi obtido a partir da Lei de Lambert-Beer, tendo em conta: o coeficiente de extinção molar determinado e citado acima; que o volume de reação do sistema foi de 680 μL ; e que o caminho ótico foi de 0,5804 cm com -1 de D.O._{415} equivale a 255 nmol de ONP.

3.8 Determinação da concentração de proteína.

O método utilizado para medir a concentração de proteína foi descrito por BRADFORD (1976).

3.8.1 Método padrão em tubo

Foram transferidos volumes de 30 a 125 μL de cultura de *H. seropedicae* ou de 0 a 20 μL de solução padrão de BSA 1 mg/mL (em triplicata) para tubos plásticos de 1,5 mL contendo 75 μL de NaOH 0,27 mol/L, mais o volume de meio de cultura necessário para perfazer 200 μL . Misturou-se suavemente e deixou-se decorrer a lise celular, durante a noite, à temperatura ambiente. Foram adicionados às amostras e aos padrões (soluções de albumina sérica bovina de concentrações entre 0 e 0,020 mg/mL) 900 μL de reativo de Bradford (0,04 g de Coomassie blue G-250 dissolvido em 20 mL de etanol + 40 mL de ácido fosfórico 85% para 100 mL de H₂O) diluído 3x em H₂O destilada, minutos antes à sua utilização. Após 2 minutos de reação, transferiram-se cerca de 700 μL para uma cubeta de 1 cm para a leitura da D.O.₅₉₅ no espectrofotômetro Cary 3E UV-visível, da Varian (Austrália).

3.8.2 Método em placa de 96 poços

Foram transferidos volumes de 30 a 125 μL de cultura de *H. seropedicae* ou de 0 a 20 μL de solução padrão de BSA 1 mg/mL (em triplicata) para poços da placa de 96 poços de prolipropileno (Greiner Bio-One, n° catálogo 651201) contendo 75 μL de NaOH 0,27 mol/L, mais o volume de meio de cultura ou H₂O necessário para perfazer 200 μL . A placa foi vedada com uma tampa adesiva (Sorenson Bioscience, Inc., n° catálogo 21950), misturou-se suavemente e deixou-se decorrer a lise celular, durante a noite, à temperatura ambiente. Foram transferidos 36,5 μL de lisado celular/solução padrão de BSA para uma placa de fundo chato (Greiner Bio-On, n° de catálogo 655180). Foram adicionados às amostras e aos padrões 163,5 μL de reativo de Bradford (0,04 g de Coomassie blue G-250 dissolvido em 20 mL de etanol + 40 mL de ácido fosfórico 85% para 100 mL de H₂O) diluído 3x em H₂O destilada, minutos antes à sua utilização. Após 2 minutos de reação, as

placas foram transferidas para o leitor de microplacas Benchmark, da Bio-Rad (EUA), para leitura da D.O.₅₉₅, no leitor de microplacas Benchmark, da Bio-Rad (EUA).

3.9 Preparação de naringenina

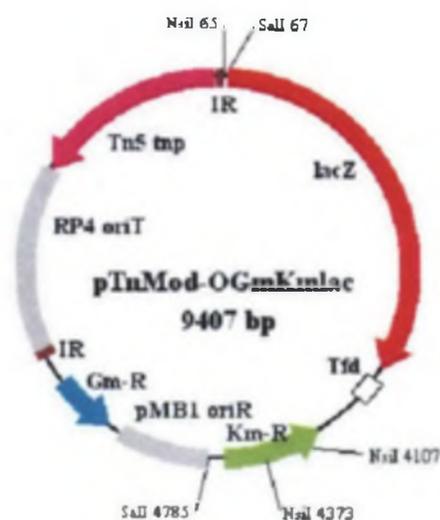
O peso molecular do composto é de 272,3, sendo então calculado um peso de 0,2723 g dissolvidos em 100 mL de etanol 80%, obtendo-se uma concentração final de 10 mmol/L. A partir deste estoque foi então sendo utilizado nas placas em uma concentração de 50 µmol/L.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção de mutantes aleatórios.

O plasmídeo pTnMod-OGmKmlacZ foi utilizado para a mutagênese aleatória na estirpe SmRI de *H. seropedicae*. Este plasmídeo contém um transposon cuja sequência inclui um gene de resistência a gentamicina e canamicina (para seleção dos mutantes) e origem de replicação oriR de pMB1, com alta especificidade para *E. coli*. Esta especificidade faz com que o plasmídeo seja instável (suicida) em outros hospedeiros, e ainda permite que seja possível a recuperação do fragmento de DNA mutagenizado do hospedeiro em *E. coli*, o que torna possível que este seja sequenciado e o gene identificado. O plasmídeo inclui ainda o gene da transposase de Tn5 fora da sequência de inserção. Como o plasmídeo é suicida, a transposase é perdida, e isto evita novos eventos de transposição depois que o transposon foi inserido aleatoriamente no DNA do hospedeiro. O plasmídeo possui também a origem de transferência oriT de RP4, possibilitando ser transferido para o hospedeiro a ser mutagenizado por conjugação. Por último ele também possui o gene repórter lacZ sem promotor permitindo através da expressão deste gene a visualização de atividades diferenciadas em diferentes condições.

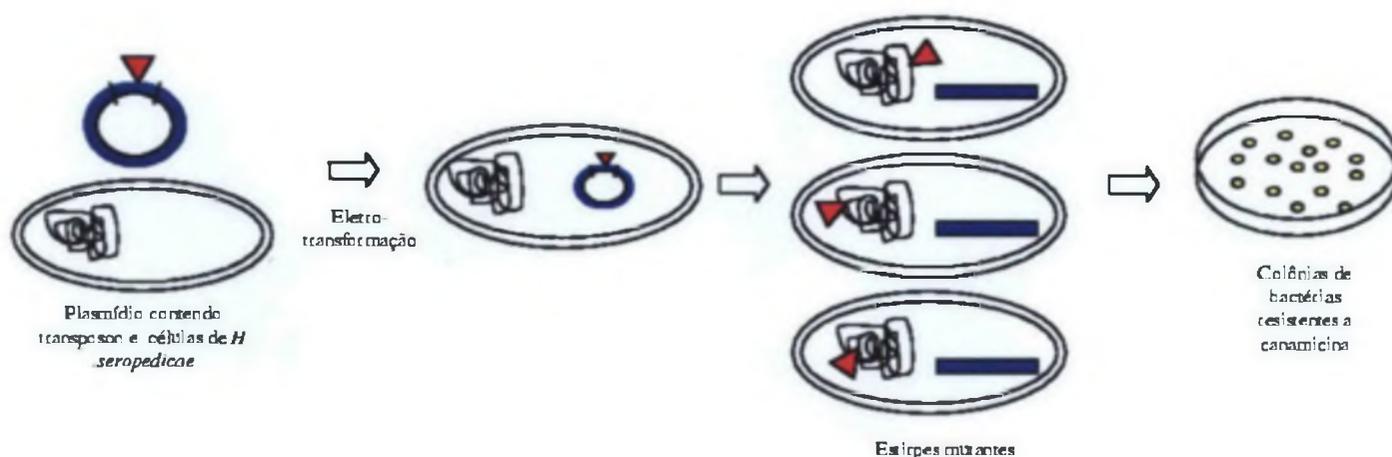
Figura 2: Mapa físico do plasmídeo pTnMod-OGmKmlacZ (SCHWAB, S. Trabalho não publicado)



Este plasmídeo foi utilizado para obtenção de uma coleção de mutantes aleatórios de *H. seropedicae* SmRI.

A inserção do transposon no genoma bacteriano ocorre aleatoriamente sendo que o plasmídeo após a inserção é degradado pois não possui origem de replicação necessária para se manter dentro da célula de *H. seropedicae*. A seleção dos mutantes foi realizada através do gene que confere resistência à canamicina (Figura 1). Posteriormente as estirpes mutantes foram armazenadas em glicerol 87% a -70°C . Neste trabalho foram obtidos 3.000 mutantes aleatórios pela inserção do transposon no genoma da estirpe SmR1.

Figura 3: Esquema de construção de mutantes de *H. seropedicae*



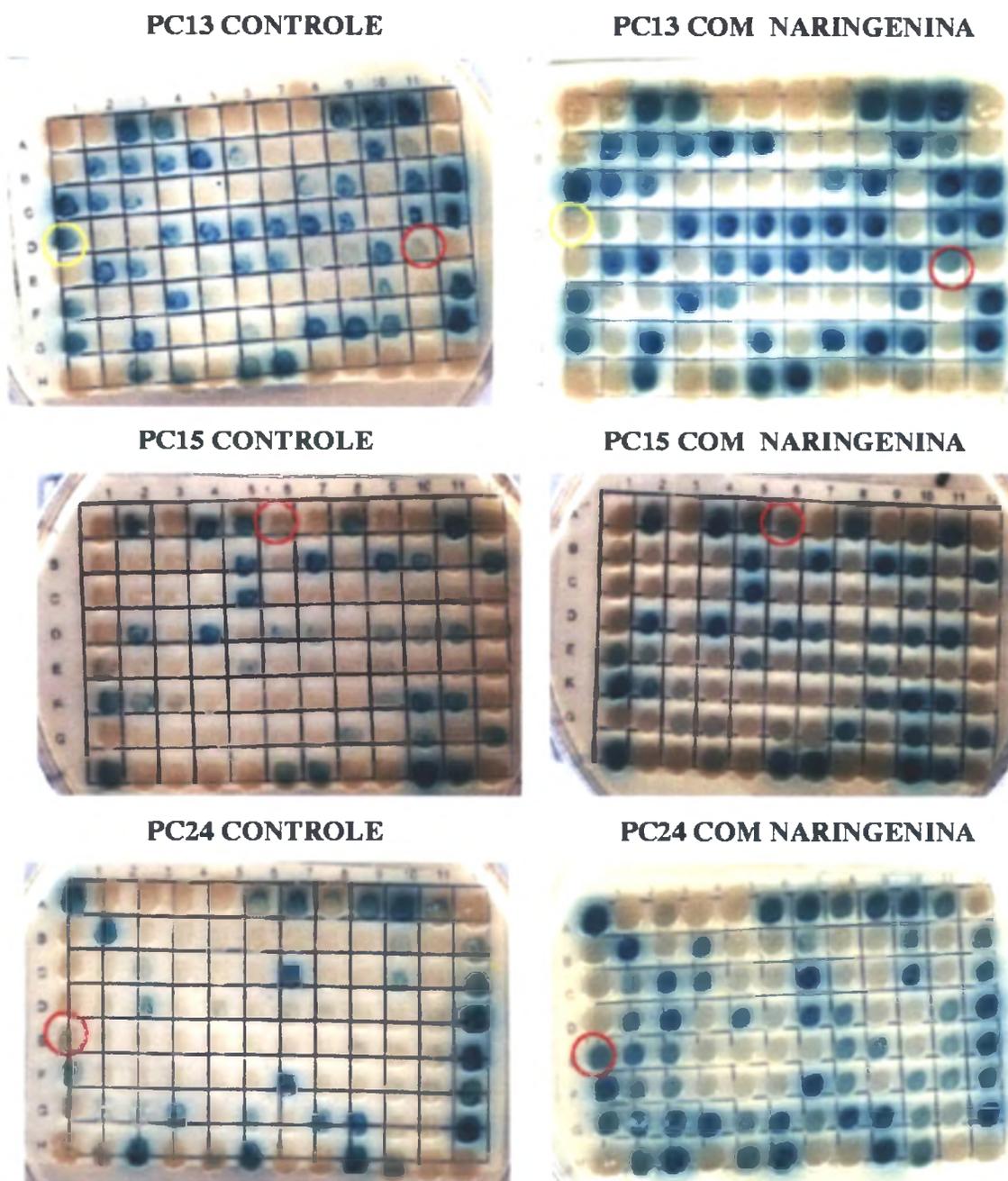
A partir da inserção aleatória do transposon através de eletrotransformação ou conjugação foi obtido uma coleção de 3000 estirpes mutantes aleatórias de *H. seropedicae* SmR1.

4.2 Análise da expressão diferencial do gene *lacZ* em resposta à naringenina

A expressão do gene *lacZ* dos mutantes com inserção cromossomal *lacZ::Km* foi determinada através da atividade β -galactosidase em culturas crescidas na presença do flavonóide naringenina (50 $\mu\text{mol/L}$). Isto foi possível porque o gene *lacZ*, que codifica para β -galactosidase, presente no transposon não possui promotor. Dessa forma, a expressão de β -galactosidase depende da presença de um promotor de *H. seropedicae* localizado amontante do ponto de inserção.

Primeiramente foram realizadas análises em placa. As placas contendo meio NFbHPN, X-gal (35 $\mu\text{g/mL}$) e naringenina (50 $\mu\text{mol/L}$) foram comparadas com a placa controle (sem naringenina) quanto a expressão diferenciada (Figura 3). Das 3000 estirpes mutantes, 363 apresentaram uma expressão diferencial, sendo 288 o expressão de β -galactosidase aumentada na presença do flavonóide e 75 expressão β -galactosidase diminuída na presença do flavonóide naringenina.

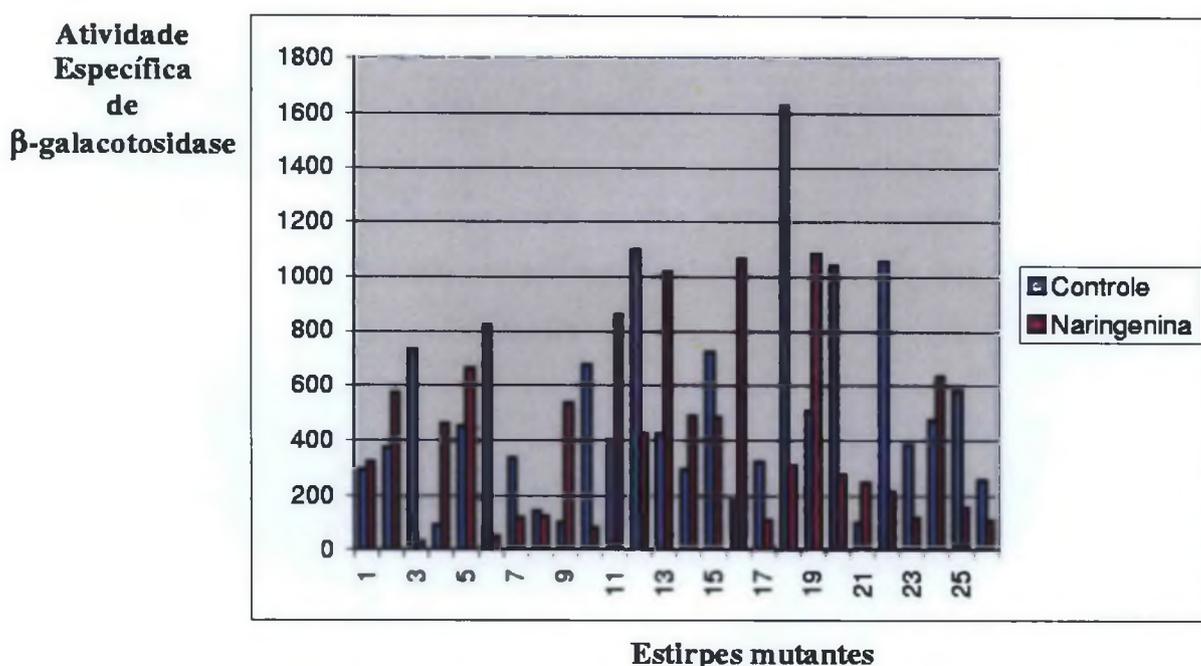
Figura 4: Análise de expressão gênica diferencial em placa das estirpes mutantes de *H. seropedicae*



As estirpes mutantes foram cultivados em placa de 96 poços com meio NFbHPN, X-gal (35 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a outra com o flavonóide naringenina (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$). Colônias circuladoas em vermelho têm expressão aumentada e as em amarelo diminuída em comparação com o controle.

As colônias com expressão de β -galactosidase superior ou inferior a controle foram isoladas e cultivadas em meio líquido em bloco de 96 poços e a atividade de β -galactosidase determinada (Figura 4).

Figura 5: Atividade de β -galactosidase de estirpes mutantes analisadas em bloco de 96 poços



Valores de atividade específica de β -galactosidase de estirpes mutantes, de um ensaio de atividade em meio líquido realizado em um bloco de 96 poços.

Das 363 estirpes mutantes que apresentaram expressão diferencial na presença do falvonóide naringenina, foi realizado ensaio de atividade de β -galactosidase em bloco de 96 poços de 96 estirpes mutantes. Destas 96 estirpes mutantes, 49 ou não apresentaram diferença na atividade ou necessitam serem retestados devido aos valores apresentarem

grande desvio padrão, e 47 apresentaram diferença na expressão, sendo destas 39 expressão aumentada na presença de naringenina e 8 expressão diminuída.

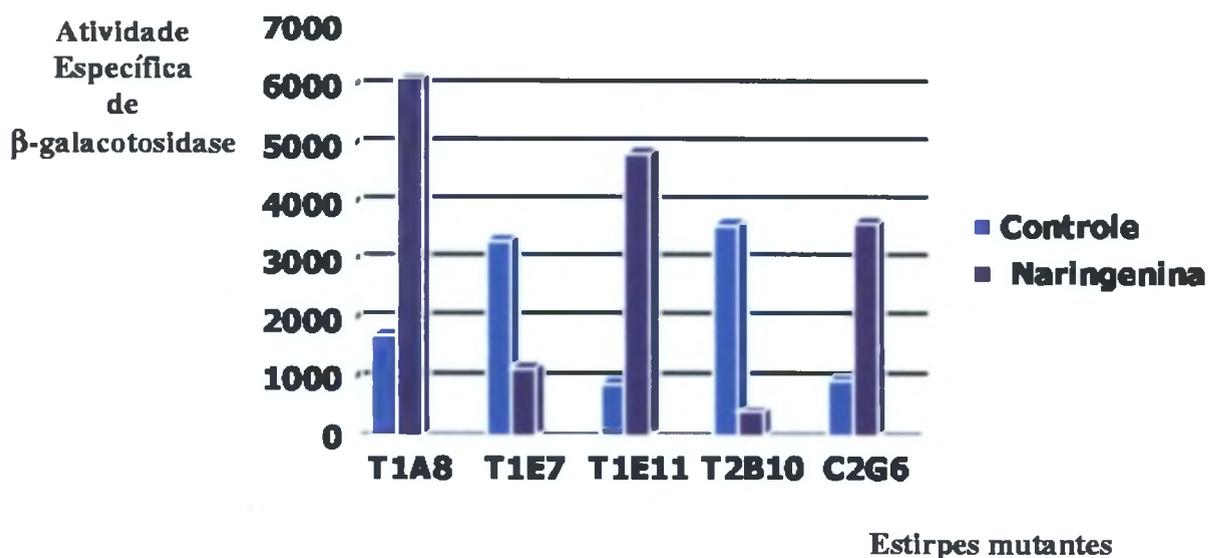
Após esta primeira análise estão sendo realizados novos ensaios de atividade de β -galactosidase em tubo para confirmação dos primeiros dados. Foram realizados ensaios com 10 estirpes mutantes e 5 confirmaram a atividade diferenciada comparada com a análise em bloco de 96 poços (Tabela 4).

Tabela 4: Atividade de β -galactosidase das estirpes mutantes re-testadas em tubo.

Valores da atividade β -galactosidase das estirpes mutantes que foram re-testadas em meio controle (NFbHPN) e naringenina (50 μ mol/L). Na última coluna relação da atividade de β -galactosidase naringenina/controlE. Os valores da atividade de β -galactosidase foram determinados conforme descrito em materiais e métodos ítem 3.7.2 e estão expressos em nmol *o*-nitrofenol/min.mg proteína.

Na tabela 4 podemos observar que três mutantes obtiveram atividade de β -galactosidase aumentada, na presença de naringenina, e dois atividade diminuída. A porcentagem de aumento ou diminuição (valores negativos) da atividade variam em cada mutante, podendo indicar que os genes mutageneizados não são os mesmos.

Figura 6: Atividade específica de β -galactosidase de cinco estirpes mutantes com expressão diferencial confirmadas



Estirpes mutantes que apresentaram expressão diferencial confirmadas em tubo individual na presença do flavonóide naringenina.

Estes resultados nos mostram que o flavonóide utilizado podem interagir de modo diferenciado alterando a expressão dos genes mutagenizados, indicando que estes podem estar relacionados com a interação planta/*H. seropedicae*.

Após a confirmação da expressão diferencial, os mutantes são selecionados para identificação do gene mutado. A extração do DNA gênomico total esta sendo feita e este fragmentado com enzimas de restrição. Os fragmentos são submetidos a um sistema de ligação que é então submetido a eletrotransformação em estirpes de *E. coli* Top10, que serão selecionados através do antibiótico canamicina. É importante salientar que no momento da escolha da enzima que é realizado a fragmentação é necessário uma prévia análise, pois só poderemos utilizar enzimas que não fragmentem dentro do transposon.

Os plasmídeos das bactérias transformantes de *E. coli*, que foram selecionados serão extraídos e sequenciados para comparação com o banco de dados do Programa Genoma do Paraná (GENOPAR) para finalmente identificação do gene muagenizado.

5. Conclusões

A expressão de genes de *Herbaspirillum seropedicae* da estirpe SmRI, é regulada positivamente e negativamente pelo flavonóide naringenina indicando que estes genes mutageneizados podem estar relacionados com a interação planta-bactéria.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DOBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **An. Acad. Brás. Cienc.**, v. 56, p. 365, 1984.

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 Jou of Syst Bact.** V. 36. P. 86-93. 1986.

BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Selection of *Herbaspirillum* spp. strains associated with rice seedlings amended with ¹⁵N-labeled fertilizer. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics – The Role of Biological Nitrogen Fixation.** BOODEY, R.M.; DE RESENDE, A.S. Eds., EMBRAPA, P. 202-203. 1995.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **Int J Syst Bacteriol.**; v. 46, p. 802-810, 1996.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, p. 911-992, 1997.

BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil.** V.174.P. 195-209. 1995.

BUTTNER, D.; BONAS, U. Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. **The EMBO Journal**, v. 21, p. 5313-5322, 2002.

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.

GOTTFERT M. Regulation and function of rhizobial nodulation genes. **FEMS Microbiol Rev.** v. 10, p. 39-63, 1993.

GOUGH, C.; GALERA, C.; VASSE, J.; WEBSTER, G.; COCKING, E. C.; DÉNARIÉ, J. Specific flavonoids promote intercellular root colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. **Mol. Plant –Micr. Inter.**, v. 10, p.560-570, 1997.

GREEMBERG, J.T.; VINATZER, B. A., Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. **Current Opinion in Microbiology.**, v. 6, p. 20-28, 2003.

LONG, S.R.; STASKAWICZ, B. J.; Prokaryotic plant parasites. **Cell Press.**, v. 73, p. 921-935, 1993.

HARBORNE, J.B. Comparative biochemistry of the flavonoids. **Academic Press**, 1967.

HARTWIG, U. A.; MAXWELL, C. A.; JOSEPH, C. M.; PHILLIPS, D. Interactions among flavonoid nod gene inducers released from alfalfa seeds and roots. **Plant. Physiol.**, v. 91, p.1138-1142, 1989.

HARTWIG, U. A.; MAXWELL, C. A.; JOSEPH, C. M.; PHILLIPS, D. A. Effects of alfafa *nod* gene-inducing flavonoids on *nodABC* transcription in *Rhizobium meliloti* strains containing different *nodD* genes. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 2769-2773, 1990.

HUNGRIA, M.; JOHNSTON, A.W.B.; PHILLIPS, D.A. Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on *nodD*-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 5, p.199-203, 1992

HUNGRIA, M. Sinais Moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. Revisão de Literatura **Rev Bras. Ci. Solo.**, v.18, p. 339-364, 1994

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**. V. 48. N. 308. P. 785-797. 1997.

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. Méd. Biol. Res.**, v. 29, p.1599-1602,1995.

MARIE, C.; BROUGHTON W. J.; DEAKIN, W. J.; Rhizobium type III secretion systems: legume charmers or alarmes. **Current Opinion in Plant Biology.**, v. 4 , p. 336-342, 2001.

MERCANTE, F.M.; GOI, S.R.; FRANCO, A.A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizóbio. **Rev Univ. Rural**. v. 22, p.65-81, 2002.

MERGAERT, P.; MONTAGU, M.V.; HOLSTERS, M. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Molecular Microbiology*. v. 25, p.811-817, 1997.

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

MILLER, J.H. *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.456, 1992.

MULLIGAN, J. T. & LONG, S.R. Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudates requires *nodD*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 82, p.6609-6613, 1985.

MYLONA, P.; PAWLOSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*. v. 7. P. 869-885. 1995.

OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. *Bio. and Fert. of Soils*. V. 21. P. 197-200. 1996.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist.*; v. 135. v. 723-737. 1997.

PEDROSA, F.O.; TEIXEIRA, K.R.S.; MACHADO, I.M.P.; STEFFENS, M.B.R.; KLASSEN, G.; BENELLI, E.M.; FUNAYMA, S.; RIGO, R.U.; ISHIDA, M.L.; YATES, M.G.; SOUZA, E.M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. *Soil. Biol. Biochem.*; v. 29, p. 843-846, 1997.

PETERS, N.K.; FROST, J.W.; LONG, S.R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Science**; v. 233, p.977-980, 1986

PHILLIPS, D.A. Flavonoids: plant signals to microbes. In: STFFORD, H.A. & IBRAHIM, R.K., eds. **Metabolism in Plants. Plenum Press.**, 1992

PIMENTEL, J. P.; OLIVARES, F.; PITARD, R. M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DOBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae* **Plant. Soil.**; Dordrecht, v. 137, p. 61-65, 1991.

QUISPEL, A. A search of signals in endophytic microorganisms. In: **Molecular signals in Plant-Microbe Communications.** (D.P.S. Verma, Ed.) p. 471-491. CRC Press, Boca Raton, FL, 1992.

REDMOND, J.W.; BATLEY, M.; DJORDJEVIC, M.A.; INNES, R.W.; KUEMPEL, P.L.; ROLFE, B.G. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. **Nature**, v. 323, p. 632-635, 1986.

ROLFE, B.G. Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. **Biofactors**, v. 1, p. 3-10, 1988.

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

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

SCHWAB, S. Caracterização parcial dos elementos em *cis* responsáveis pela regulação da expressão do operon *glnAntrBC* de *Herbaspirillum seropedicae*. **Tese de dissertação de mestrado ao Curso de pós-Graduação em Bioquímica – UFPR.** P. 35-40, 2002.

SCHWAB, S. Identification of NH_4^+ regulated genes of *Herbaspirillum seropedicae* by random insertional mutagenesis. **Trabalho não publicado.**

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