

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAYNÁ FALQUIEVICZ DE LIMA

Determinação do Envolvimento das Globinas Truncadas Codificadas Pelos Genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 no Processo de Fixação Biológica de Nitrogênio.

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TAYNÁ FALQUIEVICZ DE LIMA

**Determinação do Envolvimento das Globinas Truncadas Codificadas Pelos Genes
Hsero_1880 e *Hsero_2855* de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 no Processo de
Fixação Biológica de Nitrogênio.**

Dissertação apresentada como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica) pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rose Adele Monteiro
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maria Berenice R. Steffens e Dr^o Marcelo Bueno Batista

CURITIBA

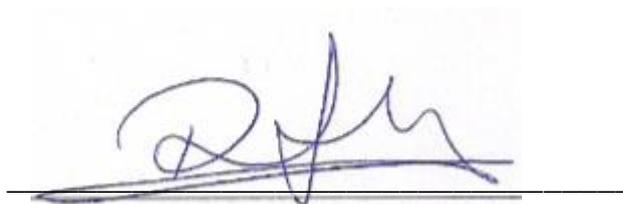
2016

TERMO DE APROVAÇÃO

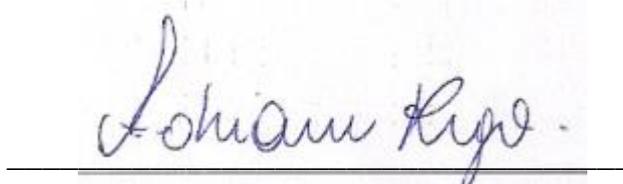
TAYNÁ FALQUIEVICZ DE LIMA

Determinação do Envolvimento das Globinas Truncadas Codificadas Pelos Genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 no Processo de Fixação Biológica de Nitrogênio

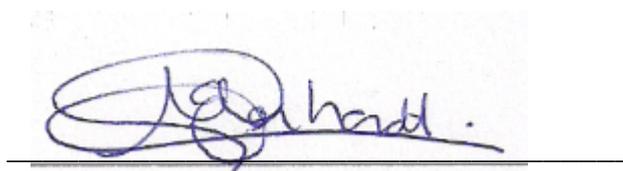
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof.ª Dr.ª Rose Adele Monteiro – Orientadora
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.ª Dr.ª Fabiane Moraes do Rego
Departamento de Farmácia, UFPR



Dr.ª Edileusa Marques Gerhardt
Departamento de Bioquímica, UFPR

Curitiba, 29 de setembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr.^a Rose Adele Monteiro, pela orientação, pelo vasto conhecimento compartilhado, pela amizade e por todo o apoio dispensado.

À professora Dr.^a Maria Berenice Reynaud Steffens, pela coorientação, pelas sugestões, ideias e ensinamentos.

Ao Dr. Marcelo Bueno Batista por toda a dedicação, paciência e apoio incansável que me dispensou.

À Dr.^a Anelis Marin pelo auxílio nos experimentos, por todo o conhecimento e dicas compartilhadas.

Ao meu professor e amigo Dr. Luiz Alberto Peregrino Ferreira, que mesmo estando longe, sempre se fez presente, me incentivando e me apoiando ao longo dos anos.

Aos demais professores, técnicos e alunos do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio pelas discussões, ensinamentos e dicas.

Aos meus pais, Deocar Antunes de Lima e Lúcia Falquievicz de Lima e ao meu irmão, Felipe Falquievicz de Lima, por serem os alicerces da minha vida, por toda compreensão e amor que não me deixaram desistir. Sem eles, não seria possível chegar até aqui!

À toda a minha família pelo carinho e incentivo.

A todos os meus amigos, em especial Edson Yu Sin Kim, LÍlian Juliana Lissner e Alexandre Taube, pelos bons momentos de descontração, por todo o apoio que renovaram as minhas forças e me deram ânimo para continuar.

À coordenação da pós-graduação em Ciências Bioquímica – UFPR e às agências financiadoras CAPES e CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria fixadora de nitrogênio, Gram negativa, pertencente à classe β do filo Proteobacteria, encontrada associada a várias plantas de interesse econômico como milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), trigo (*Triticum aestivum*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), entre outras. No genoma de *H. seropedicae* SmR1 foram anotados cinco genes possivelmente codificadores de globinas do tipo hemoglobinas truncadas (*Hsero_0935*, *Hsero_1880*, *Hsero_2698*, *Hsero_2855* e *Hsero_2872*), sendo que dois deles (*Hsero_2855* e *Hsero_2872*) estão dentro do *cluster nif*. A família das hemoglobinas truncadas (trHb) é constituída de pequenas hemoproteínas ligadoras de oxigênio, distribuídas em bactérias, plantas e eucariotos unicelulares, em concentração intracelular de nano a micromolar e, geralmente, contém 20 a 40 resíduos de aminoácidos a menos que as hemoglobinas de vertebrados. São classificadas em três grupos: I (N ou trHbN), II (O ou trHbO) e III (P ou trHbP), e recentemente sugeriram a existência de um pequeno grupo nomeado como IV (Q ou trHbQ). Alguns organismos que possuem trHbs apresentam propriedades patogênicas, realizam fotossíntese, fixam nitrogênio ou possuem capacidades metabólicas distintas. A análise *in silico* demonstrou que as globinas *Hsero_1880* e *Hsero_2855* pertencem ao grupo II das trHb e podem atuar no metabolismo de óxido nítrico. A ausência dos produtos dos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* não influencia o perfil de crescimento de *H. seropedicae*, uma vez que os mutantes apresentaram tempo de duplicação semelhante ao da estirpe selvagem. Os genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* tem, aparentemente, efeito no metabolismo de nitrogênio, uma vez que a atividade de nitrogenase dos mutantes nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* foram de, aproximadamente, 50% e 30% da atividade da estirpe selvagem em 24 horas, respectivamente. O gene *Hsero_2855* é expresso no início na colonização da planta. O gene *Hsero_1880* é ativado em baixas concentrações de oxigênio, sugerindo que este pode ser ativado nas condições de fixação de nitrogênio e também pode estar relacionado com adaptação a baixas concentrações de O₂. A concentração de nitrogênio, independente da fonte utilizada como amônio, glutamato e nitrato, não influencia na ativação do gene *Hsero_1880*.

Palavras chave: *H. seropedicae*, globina truncada, fixação biológica do nitrogênio

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is a Gram-negative nitrogen-fixing bacterium belonging to the class β of the Proteobacteria phylum, it is associated with several plants of economic value such as corn (*Zea mays*), rice (*Oryza sativa*), sorghum (*Sorghum bicolor*), wheat (*Triticum Aestivum*), sugarcane (*Saccharum officinarum*), among others. In the *H. seropedicae* SmR1 genome, five genes possibly encoder of the truncated hemoglobins (*Hsero_0935*, *Hsero_1880*, *Hsero_2698*, *Hsero_2855* and *Hsero_2872*) were annotated, two of them (*Hsero_2855* and *Hsero_2872*) are inside the *nif* cluster. The family of truncated hemoglobins (trHb) consists of small oxygen-binding heme proteins, distributed in bacteria, plants and unicelular eukaryotes, in intracellular nano-to-micromolar concentration and generally contains 20 to 40 amino less than the vertebrate hemoglobins. They are classified into three groups: I (N or trHbN), II (O or trHbO) and III (P or trHbP), and recently a forth small group named IV (Q or trHbQ) was created. Some organisms that have trHbs present pathogenic properties, perform photosynthesis, fix nitrogen or have different metabolic capacities. The *in silico* analysis demonstrated that the globins *Hsero_1880* and *Hsero_2855* belong to the group II of the trHb and can act in the metabolism of nitric oxide. The absence of the products of the *Hsero_1880* and *Hsero_2855* genes does not influence the growth profile of *H. seropedicae*, since the mutants had duplication time similar to that of the wild strain. The *Hsero_1880* and *Hsero_2855* genes apparently have an effect on nitrogen metabolism, since the nitrogenase activity of the mutants in the *Hsero_1880* and *Hsero_2855* genes was approximately 50% and 30% of the wild type activity in 24 hours, respectively. The *Hsero_2855* gene is expressed early in plant colonization. The *Hsero_1880* gene is activated at low oxygen concentrations, suggesting that it can be activated under nitrogen fixation conditions and may also be related to adaptation to low O₂ concentrations. The concentration of nitrogen, regardless of the source used as ammonium, glutamate and nitrate, does not influence the activation of the *Hsero_1880* gene.

Key words: *H. seropedicae*, truncated globin, biological nitrogen fixation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do grupamento heme.	20
Figura 2. Estrutura de uma globina contendo todas as oito hélices e sítio de ligação do heme.	21
Figura 3. Sobreposição estrutural entre uma globina truncada de <i>Chlamydomonas eugametos</i> e uma mioglobina de baleia cachalote.....	25
Figura 4. Predição da estrutura da proteína Hsero_1880 de <i>H. seropedicae</i> SmR1	27
Figura 5. Predição da estrutura da proteína Hsero_2855 de <i>H. seropedicae</i> SmR1.	27
Figura 6. Gráfico do crescimento exponencial e equação da reta para cálculo do tempo de duplicação de <i>H. seropedicae</i> SmR1 selvagem.	39
Figura 7. Gráfico do crescimento exponencial e equação da reta para cálculo do tempo de duplicação de <i>H. seropedicae</i> SmR1 mutante no gene <i>Hsero_1880</i>	39
Figura 8. Gráfico do crescimento exponencial e equação da reta para cálculo do tempo de duplicação de <i>H. seropedicae</i> SmR1 mutante no gene <i>Hsero_2855</i>	40
Figura 9. Esquema da estratégia de mutagênese	43
Figura 10. Organização estrutural da região do gene <i>Hsero_1880</i> no genoma de <i>H. seropedicae</i>	44
Figura 11. Organização estrutural da região do gene <i>Hsero_2855</i> no genoma de <i>H. seropedicae</i>	44
Figura 12. Vizinhança gênica do gene <i>Hsero_1880</i> em <i>H. seropedicae</i> em relação a genes com funções correspondentes em algumas β -Proteobactérias.....	45
Figura 13. Vizinhança gênica do gene <i>Hsero_2855</i> em <i>H. seropedicae</i> em relação a genes com funções correspondentes em algumas β -Proteobactérias.....	46
Figura 14. Alinhamento das sequências de aminoácidos de Hsero_1880 e Hsero_2855 com membros da família TrHbII.....	50
Figura 15. Esquema geral da região do gene <i>Hsero_1880</i> utilizada para a construção dos plasmídeos contendo deleção neste gene.....	51
Figura 16. Esquema geral da região do gene <i>Hsero_2855</i> utilizada para a construção dos plasmídeos contendo deleção neste gene.....	51
Figura 17. Esquema da estratégia utilizada para obtenção dos vetores contendo os genes <i>Hsero_1880</i> (pTZ1880AB del) e <i>Hsero_2855</i> (pTZ2855AB del) deletados.....	52
Figura 18. Análise de restrição do pTZ1880AB del.....	53
Figura 19. Análise de Restrição do pTZ2855AB del	53

Figura 20. Análise de restrição do pk18/Hsero_1880AB e pk18/Hsero_2855AB.....	54
Figura 21. Confirmação das estirpes mutantes para os genes <i>Hsero_1880</i> e <i>Hsero_2855</i>	56
Figura 22. Validação das estirpes de <i>H. seropedicae</i> SmR1 selvagem, <i>H seropedicae</i> com deleção no gene <i>Hsero_1880</i> , <i>H. seropedicae</i> contendo vetor suicida pK18mobsacB (pk1880) nos meios Nfb-MalatoHPN+Sm80 e Nfb-MalatoHPN+Sm80+Km500.	57
Figura 23. Validação das estirpes de <i>H. seropedicae</i> SmR1 selvagem, <i>H seropedice</i> com deleção no gene <i>Hsero_1880</i> , <i>H. seropedicae</i> contendo vetor suicida pK18mobsacB (pk1880) nos meios Nfb-MalatoHPN+Sm80+sacarose e Nfb-MalatoHPN+Sm80+Km500+sacarose.	58
Figura 24. Validação das estirpes de <i>H seropedicae</i> SmR1 com deleção no gene <i>Hsero_2855</i> , <i>H. seropedicae</i> contendo vetor suicida pK18mobsacB (pK2855) nos meios Nfb-MalatoHPN+Sm80 e Nfb-MalatoHPN+Sm80+Km500.	58
Figura 25. Validação das estirpes de <i>H seropedice</i> SmR1 com deleção no gene <i>Hsero_2855</i> , <i>H. seropedicae</i> contendo vetor suicida pK18mobsacB (pK2855) nos meios Nfb-MalatoHPN+Sm80+sacarose e Nfb-MalatoHPN+Sm80+Km500+sacarose.....	59
Figura 26. Perfil de crescimento das estirpes de <i>H. seropedicae</i> mutantes nos genes <i>Hsero_1880</i> (TFL1880) e <i>Hsero_2855</i> (TFL2855) em comparação com a estirpe <i>H. seropedicae</i> SMR1 selvagem	60
Figura 27. Atividade da nitrogenase do <i>H. seropedicae</i> SmR1 e das estirpes mutantes TFL1880 (1880del) e TFL2855 (2855del)..	61
Figura 28. Expressão dos genes <i>Hsero_2855</i> e <i>Hsero_2872</i> de <i>H. seropedicae</i> SmR1 durante a colonização da rizosfera.....	63
Figura 29. Região promotora amplificada do gene <i>Hsero_1880</i>	63
Figura 30. Região promotora amplificada do gene <i>Hsero_2855</i>	64
Figura 31. Região promotora amplificada do gene <i>Hsero_2854</i>	64
Figura 32. Esquema da estratégia utilizada para a clonagem da região promotora do gene <i>Hsero_1880</i> nos vetores pMP220 e pPW452, dando origem aos plasmídeos pMP1880 e pPW1880	65
Figura 33. Confirmação da clonagem da região promotora dos genes <i>Hsero_1880</i> e <i>Hsero_2854</i> nos vetores pMP 220 e pPW 452.....	66
Figura 34. Confirmação da clonagem da região promotora do gene <i>Hsero_2855</i> nos vetores pMP 220 e pPW 452	66

Figura 35. Determinação da expressão do provável promotor do gene <i>Hsero_1880</i> , através da determinação da atividade de β -galactosidase em diferentes concentrações de oxigênio	67
Figura 36. Determinação da expressão do provável promotor do gene <i>Hsero_1880</i> , através da determinação da atividade de β -galactosidase a 2% do oxigênio e em diferentes concentrações de amônio.....	68
Figura 37. Determinação da expressão do provável promotor do gene <i>Hsero_1880</i> , através da determinação da atividade de β -galactosidase a 2% do oxigênio e em diferentes fontes de nitrogênio (amônio- NH_4Cl , glutamato - Glu, Nitrato - NO_3) em concentrações de 1 e 5mM.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do meio NFb-Malato.....	31
Tabela 2. Composição do meio LB (Luria Bertani)	32
Tabela 3. Relação dos antibióticos utilizados.....	33
Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados	34
Tabela 5. Porcentagem de identidade da proteína Hsero_1880 com outras proteínas disponíveis no banco de dados	46
Tabela 6. Porcentagem de identidade da proteína Hsero_2855 com outras proteínas disponíveis no banco de dados do NCBI.....	48
Tabela 7. Tempo de duplicação das estipes de <i>H. seropedicae</i> SMR1 e dos mutantes TFL1880 e TFL2855	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estirpes de <i>Escherichia coli</i>	29
Quadro 2. Estirpes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	29
Quadro 3. Plasmídeos.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – adenosina trifosfato

Arg – arginina

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs – 5'-trifosfato de 2'desoxinucleotídeos

DO595 – densidade ótica a 595 nanômetros

EDTA – ácido etilendiamino-tetra-acético

EBP – proteína que se liga a um sítio ativador (Enhancer Binding Protein)

FAD – flavina adenina dinucleotídeo

FBN – fixação biológica do nitrogênio

FHbs – flavohemoglobina

FNR – fumarato e nitrato redutase

GSC – globinas sensor acopladas

Gly – glicina

Glu – glutamato

His – histidina

IHF – fator de integração do hospedeiro (Integration Host Factor)

kDa – quilo Daltons

kV – quilo Volts

Leu – leucina

ONPG – o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo

ORF – sequência potencialmente codificadora de proteína

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

Phe – fenilalanina

RNA – ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecilsulfato de sódio

TRIS – Tris(hidroximetil)-aminometano

Trp – triptofano

Tyr – tirosina

trHb – globinas truncadas

UV – radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Revisão Bibliográfica.....	16
2.1. Herbaspirillum seropedicae	16
2.2. Fixação Biológica do Nitrogênio	16
2.3. Regulação da Fixação Biológica de Nitrogênio em H. seropedicae.....	18
2.4. Globinas	20
2.5. Hemoglobinas Truncadas	23
3. Objetivos	28
3.1. Objetivos Específicos	28
4. Materiais e Métodos	29
4.1. Bactérias e plasmídeos.....	29
4.2. Meios de Cultura.....	31
4.3. Condições de cultivo e estoque de microorganismos	32
4.4. Antibióticos.....	33
4.5. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR.....	33
4.6. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	35
4.7. Purificação de plasmídeos em pequena escala	35
4.8. Clivagem de DNA com enzimas de restrição	36
4.9. Preparo dos vetores de clonagem.....	36
4.10. Ligação de fragmentos de DNA a vetores	36
4.11. Transformação bacteriana	36
4.11.1. Preparo de células competentes utilizando MgCl ₂ e CaCl ₂	36
4.11.2. Transformação por Choque Térmico	37
4.12. Transferência de plasmídeos por conjugação.....	37
4.13. Sequenciamento de DNA	38

4.14.	Curva de crescimento e tempo de duplicação.....	38
4.15.	Determinação de atividade de β -galactosidase.....	40
4.16.	Determinação da atividade da nitrogenase.....	41
4.17.	Dosagem de proteínas	41
4.18.	Estratégia de mutagênese dos genes Hsero_1880 e Hsero_2855.....	42
5.	Resultados e Discussão	44
5.1.	Organização estrutural da região dos genes Hsero_1880 e Hsero_2855 do Herbaspirillum seropedicae no genoma e análise in silico das proteínas	44
5.2.	Obtenção dos plasmídeos mutagênicos H. seropedicae nos genes Hsero_1880 e Hsero_2855.....	50
5.3.	Construção das estirpes mutantes de H. seropedicae nos gene Hsero_1880 e Hsero_2855.....	54
5.4.	Validação das estirpes mutantes H. seropedicae nos genes Hsero_1880 e Hsero_2855.....	56
5.5.	Caracterização fisiológica das estirpes mutantes para os genes Hsero_1880 e Hsero_2855 de H. seropedicae	59
5.5.1.	Perfil de crescimento das estirpes mutantes TFL1880 e TFL2855	59
5.5.2.	Determinação da atividade de nitrogenase das estirpes mutantes de H. seropedicae nos genes Hsero _1880 e Hsero_2855 de H. seropedicae.....	61
5.5.3.	Determinação do padrão de expressão dos genes Hsero_1880, Hsero_2855 e Hsero_2854.....	63
6.	Conclusão.....	70
7.	Referencias.....	71

1. Introdução

O nitrogênio é um elemento indispensável ao crescimento vegetal e limitante para a produção agrícola. Os processos que levam à perda desse elemento em agroecossistemas são a desnitrificação, volatilização da amônia, queimadas e lixiviação de nitratos para as camadas mais profundas do solo. Para repor o nitrogênio perdido são utilizados fertilizantes nitrogenados, mas também, tem sido explorada a fixação biológica do nitrogênio (FBN), que é realizada por bactérias associadas às plantas de interesse agrícola (DIXON; KAHN, 2004).

O uso extensivo de fertilizantes nitrogenados na agricultura representa um problema econômico, social, ambiental e de saúde pública. Entre os efeitos do uso de fertilizantes nitrogenados pode-se destacar a emissão de óxidos nitrosos tóxicos, a eutrofização de lagos e rios e a acidificação do solo. O nitrogênio fixado fornecido pela FBN é menos propenso à lixiviação, volatilização e desnitrificação, uma vez que é utilizado *in situ* e, portanto, é um processo biológico importante que contribui para uma agricultura sustentável (DIXON; KAHN, 2004; OLDROYD; DIXON, 2014).

De acordo com a Associação Nacional para a Difusão de Adubos (ANDA, 2010), a dependência brasileira de fertilizantes nitrogenados deve aumentar de 71% do consumo em 2009 para 82% em 2020, caso nenhuma providência seja tomada. Conforme projeções da ANDA, o consumo de fertilizantes nitrogenados pela agricultura brasileira deve aumentar de 3,7 milhões de toneladas em 2009 para 6 milhões de toneladas em 2020. Para atender à demanda do consumo interno nacional, foram importados 73% dos fertilizantes nitrogenados em 2008, conforme a Associação Internacional da Indústria de Fertilizantes (IFA, 2009). O Brasil não será autossuficiente na produção de matéria-prima para a elaboração de fertilizantes nitrogenados, portanto, o país deve investir na formulação e na implantação de estratégias para reduzir a dependência da importação de insumos de outros países, e para diminuir a agressão ao meio ambiente provocado pelo uso desses fertilizantes (CELLA; ROSSI, 2010).

A inoculação da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* em arroz fornece pelo menos 15% do nitrogênio necessário a planta, demonstrado em experimentos em campo (BALDANI; BALDANI; DOBEREINER, 2000). O valor médio da tonelada de uréia, um fertilizante nitrogenado químico muito utilizado, é de aproximadamente 400 dólares. De acordo com relatórios do ano de 2009 da USDA (*United States Department of Agriculture*), Ministério da Agricultura e Comissão Europeia de Agricultura e

Desenvolvimento Rural, são necessários 80 Kg de uréia por hectare por safra para o cultivo de trigo, milho e arroz, sendo que a área global cultivada com essas plantas é de cerca de 700 milhões de hectares. Assim, a substituição de 15% da uréia pelo uso de bactérias fixadoras de nitrogênio, como *H. seropedicae* poderia economizar 3,4 bilhões de dólares por safra. O uso e aprimoramento de técnicas biotecnológicas na produção de biofertilizantes para a agricultura trariam um enorme benefício econômico e ambiental (BALSANELLI, 2013).

O crescimento vegetal é estimulado por inoculantes efetivos, não somente pela fixação do nitrogênio, mas também pela produção de fitohormônios, controle direto e indireto de patógenos e pelo aumento da biodisponibilidade de minerais (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). O microorganismo *H. seropedicae* tem grande potencial genético para prover muitos destes benefícios (PEDROSA *et al.*, 2011) e, portanto, é alvo de estudos de caracterização funcional e estrutural de genes envolvidos na FBN. É fundamental a elucidação do seu metabolismo nitrogenado para a obtenção de estirpes modificadas mais eficientes para aplicação como biofertilizante.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *Herbaspirillum seropedicae*

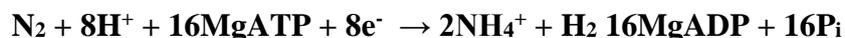
Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria Gram negativa, geralmente vibrióide, pertencente à classe β do filo Proteobacteria. É um microorganismo diazotrófico e endofítico, encontrado associado com várias plantas de interesse econômico como milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), trigo (*Triticum aestivum*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), bananeiras (*Musa sp.*), palmeiras (*Euterpe edulis*) e abacaxizeiros (*Ananas comosus*) (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI *et al.*, 1992; CRUZ *et al.*, 2001). É capaz de fixar nitrogênio sob condições microaeróbicas. As condições ideais de crescimento desse microorganismo abrangem a faixa de temperatura de 30° a 40°C e a faixa de pH de 5,3 a 8,0. Possui metabolismo típico respiratório, não fermenta açúcares e como fontes preferenciais de carbono utiliza ácidos orgânicos como malato, fumarato, succinato, piruvato, citrato e trans-aconitato (BALDANI *et al.*, 1986). Produz fitohormônios que estimulam o crescimento vegetal, como o ácido indolacético, giberilinas e citoquininas (OLIVARES *et al.*, 1997; REIS *et al.*, 2000).

A associação de plantas com *H. seropedicae* é benéfica e traz vantagens para a planta, como por exemplo a colonização de *H. seropedicae* em variedades de arroz tolerante a alumínio aumentou significativamente o crescimento vegetal e o acúmulo de nitrogênio. Estas plantas apresentaram uma maior exsudação de ácidos carboxílicos, favorecendo o crescimento de *H. seropedicae* (GYANESHWAR *et al.*, 2002). Observou-se aumento de pelo menos 30% do nitrogênio acumulado pela planta quando diferentes estirpes de *H. seropedicae* foram inoculadas em sementes de arroz (BALDANI *et al.*, 1995). O uso de estirpes de *H. seropedicae* imunomarcadas ou com genes repórteres revelou que a bactéria expressa os genes *nif* ao colonizar raízes e partes aéreas de arroz, indicando que este endófito é capaz de fixar nitrogênio quando está colonizando o arroz (JAMES; GYANESHWAR; MATHAN, 2002; RONCATO-MACARI *et al.*, 2003).

2.2. Fixação Biológica do Nitrogênio

Os organismos capazes de fixar nitrogênio, bactérias e arqueas, são denominados diazotrofos (YOUNG, 1992).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) consiste no processo de redução do N₂ em amônio (NH₄⁺), uma forma de nitrogênio que pode ser incorporado às biomoléculas. A reação pode ser representada da seguinte forma: (BURRIS, 1991)



O processo é catalisado pelo complexo enzimático nitrogenase e demanda grande quantidade de energia, que é obtida por hidrólise de MgATP a MgADP + Pi.

A nitrogenase é um complexo enzimático constituído por duas metaloproteínas. A primeira é a dinitrogenase redutase ou proteína ferro (proteína-Fe), que faz a doação de elétron para a segunda proteína, a dinitrogenase ou proteína ferro-molibdênio (proteína-FeMo), que apresenta o sítio catalítico da enzima (SEEFELDT; HOFFMAN; DEAN, 2009). Essas metaloproteínas reunidas na presença de ATP e de uma fonte de baixo potencial de redução catalisam a redução de N₂ a amônio (POSTGATE, 1998).

As proteínas-Fe são dímeros (α_2) de subunidades idênticas (homodiméricas), codificadas pelo gene *nifH*, com peso molecular variando entre 57 e 72 kDa, sendo que todas contêm um agrupamento 4Fe-4S por dímero. As duas subunidades α da proteína-Fe são relacionadas entre si por um eixo de simetria bilateral que atravessa o grupamento 4Fe-4S. A proteína ferro-molibdênio é um tetrâmero, com peso molecular médio de 220 kDa, correspondente às 4 subunidades ($\alpha_2\beta_2$) organizadas de forma heterodiméricas. A subunidade α é codificada pelo gene *nifD* e tem massa molecular de 50kDa, a subunidade β é codificada pelo gene *nifK* e tem massa molecular de 60 kDa. A proteína-FeMo geralmente apresenta alto conteúdo de metais: 24-36 Fe, 24-32 S e 1-2 Mo por mol (220 kDa), sendo que dois tipos de centros estão envolvidos na reação redox do processo de redução de N₂: os centros P que podem se organizar como quatro agrupamentos 4Fe-4S e dois idênticos cofatores de FeMo (FeMoco), também conhecidos como centros M (TEIXEIRA; MARIN; BALDANI, 1998). A nitrogenase também pode reduzir outros substratos além do nitrogênio, os quais possuem tripla ligação terminal carbono-carbono ou carbono-nitrogênio, como o acetileno, ácido cianídrico, óxido nitroso, cianetos e isocianetos (EADY; POSTGATE, 1974; NUNES; RAIMONDI; NIEDWIESKI, 2003). Além dos genes estruturais *nifHDK*, a biossíntese e atividade da nitrogenase dependem de produtos codificados por outros genes *nif*, essenciais para o transporte de elétrons, regulação da transcrição e maturação dos componentes da nitrogenase (MERRICK, 1992).

Em *H. seropedicae*, os genes *nifHDK*, que codificam o complexo nitrogenase, fazem parte de um agrupamento de genes *nif* (genes de fixação de nitrogênio) composto por 46 genes. Neste *cluster* estão os demais genes *nif*, e alguns genes envolvidos direta ou indiretamente no metabolismo do nitrogênio (PEDROSA; MONTEIRO; WASSEM, 2011; CHUBATSU *et al.*, 2011). A FBN catalisada pela nitrogenase demanda 16 moléculas de ATP para cada molécula de N₂. Sendo assim, apresenta um alto custo energético e, portanto, é um processo finamente regulado, tanto em nível de atividade das enzimas como da transcrição dos genes *nif* em resposta a condições de nitrogênio e oxigênio do meio (POSTGATE, 1982; DIXON; KAHN, 2004).

2.3. Regulação da Fixação Biológica de Nitrogênio em *H. seropedicae*

A regulação da fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* envolve o sistema Ntr e a proteína NifA (CHUBATSU *et al.*, 2011).

Os componentes do sistema Ntr em *H. seropedicae* são codificados pelos genes *glnA*, *ntrB*, *ntrC*, *glnK*, *glnB*, *glnD* e *amtB* (CHUBATSU *et al.*, 2011). O operon *glnAntrBC* contém em sua região promotora dois sítios para ligação de NtrC, e a transcrição das proteínas NtrB e NtrC ocorre a partir de duas regiões promotoras, uma dependente de σ^{54} e outra de σ^{70} . A expressão de *glnA* é dependente de NtrC, em condições limitantes de nitrogênio e é parcialmente reprimida em altas concentrações de amônio, sugerindo funcionalidade do promotor σ^{70} nestas condições. A proteína NtrB possui duas atividades que dependem dos níveis de nitrogênio e carbono celular: histidina quinase (fosforila NtrC) e fosfatase (desfosforila NtrC) (ATKINSON *et al.*, 1994; JIANG e NINFA, 1999). Sob condições limitantes de amônio, NtrB liga ATP e catalisa sua autofosforilação em um resíduo de histidina conservado. O grupamento fosforil é então transferido para um resíduo de aspartato da proteína NtrC. A proteína NtrC, quando fosforilada, age como um ativador transcricional de genes envolvidos na fixação e assimilação de nitrogênio. Em altas concentrações de amônio a proteína NtrB apresenta atividade de fosfatase, desfosforilando e inativando a proteína NtrC (NINFA *et al.*, 1993).

H. seropedice possui duas proteínas do tipo PII: GlnB e GlnK. A proteína GlnB tem expressão constitutiva, enquanto que a expressão da proteína GlnK é aumentada sob condições limitantes de nitrogênio e é dependente de NtrC (BENELLI *et al.*, 1997; NOINDORF *et al.*, 2006; NOINDORF, 2002). A identidade entre as proteínas GlnK e

GlnB é de 78% e ambas podem ser uridililadas. A uridililação no resíduo Tyr-51 é conservada nas duas proteínas e é dependente de ATP e 2-oxoglutarato, sendo inibida na presença de glutamina (BENELLI *et al.*, 2001; BONATTO *et al.*, 2007).

O gene *amtB* de *H. seropedicae* é co-transcrito com *glnK* e *nlmA* formando o operon *nlmA-glnK-amtB*. A expressão deste operon é aumentada em condições de fixação de nitrogênio e é dependente de NtrC (NOINDORF *et al.*, 2006).

A proteína NifA, uma proteína da família das EBP (Enhancer Binding Protein), é ativadora de transcrição dos genes *nif* e atua em conjunto com a RNA polimerase dependente do fator σ^{54} (CHUBATSU *et al.*, 2011). Esse mecanismo de ativação foi encontrado em todas as proteobactérias diazotróficas (DIXON e KAHN, 2004). Em *H. seropedicae* o gene *nifA* consiste de uma unidade transcricional independente que codifica para a proteína NifA. A proteína NifA, sendo responsável pela ativação da transcrição dos genes *nif*, está envolvida no controle transcricional da nitrogenase. Tanto a expressão, quanto a atividade desta proteína são reguladas e o sistema de regulação geral de nitrogênio Ntr também está envolvido nesta regulação (SOUZA *et al.*, 1999). Na região promotora do gene *nifA* de *H. seropedicae* foram encontrados sítios para ligação da própria proteína NifA e para a NtrC (SOUZA *et al.*, 2000). Foram identificadas ainda uma seqüência homóloga à seqüência consenso “anaerobox” (sítio de ligação para FNR), localizada após o início de tradução, e um sítio de ligação do fator de integração do hospedeiro (IHF), localizado a jusante do sítio de ligação para a proteína NtrC (SOUZA *et al.*, 2000).

A ativação do promotor *nifA* pela proteína NtrC *in vitro* é estimulada por IHF, uma proteína que promove o dobramento do DNA. Em contraste, a ativação do promotor pela NifA é prejudicada por IHF, que previne a auto-ativação continuada do promotor *nifA* pela proteína NifA. Assim, IHF atua positivamente na ativação dependente de NtrC, e negativamente na ativação dependente de NifA do promotor *nifA* de *H. seropedicae* (WASSEM *et al.*, 2000).

Os níveis de nitrogênio e oxigênio intracelular regulam a atividade de NifA e o mecanismo dessa regulação varia de acordo com o organismo (MERRICK & EDWARDS, 1995). NifA é controlada negativamente pelos níveis de oxigênio e íons amônio e é dependente de ferro (SOUZA *et al.*, 1999). A sensibilidade ao oxigênio e ao ferro parece estar relacionada ao domínio Central+C-terminal desta proteína (SOUZA *et al.*, 1999; MONTEIRO *et al.*, 1999) e a regulação por nitrogênio envolve o domínio N-terminal de NifA, que aparentemente, responde aos níveis de amônio ou glutamina

através da interação com a proteína GlnK (NOINDORF *et al.*, 2011). A proteína NifA é inativa e mais suscetível à degradação em estirpe de *E. coli* mutante para o gene *fnr*, sugerindo que a sensibilidade ao oxigênio para a atividade da proteína NifA envolve, de alguma forma, a proteína FNR (MONTEIRO *et al.*, 2003). Os genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3*, que codificam para as proteínas FNR, sensíveis ao oxigênio, mostraram não ser essenciais à fixação biológica de nitrogênio. No entanto, experimentos de determinação da expressão gênica mostraram que FNR reprime a expressão dos genes *nifA* e *nifB* de *H. seropedicae*. Os genes *fnr* podem estar envolvidos em um fino mecanismo de regulação de genes requeridos para a fixação de nitrogênio, em concentrações ótimas de oxigênio (BATISTA, 2011).

2.4. Globinas

As globinas compõem uma diversificada superfamília de proteínas e são compostas por uma parte protéica (apoproteína) e por uma parte prostética (grupo heme). As globinas apresentam uma cor vermelha característica, devido à presença do grupo prostético heme, o qual é constituído por uma parte orgânica, a protoporfirina IX, e por um átomo de ferro central (Figura 1). Este grupo prostético é quimicamente ativo e participa de vários processos biológicos, conferindo às globinas a capacidade de ligação a moléculas como O₂, NO e CO (SUZUKI; IMAI, 1998).

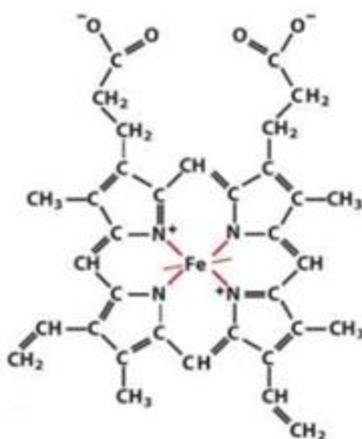


Figura 1. Estrutura do grupamento heme. O heme consiste de uma estrutura orgânica cíclica, a protoporfirina, à qual um átomo de ferro se liga em seu estado ferroso (Fe²⁺). O átomo de ferro possui seis ligações por coordenação, quatro no plano da protoporfirina à qual estão ligadas e duas perpendiculares a ela (NELSON; COX, 2008).

O enovelamento característico das globinas consiste basicamente em um arranjo de seis/oito α -hélices, formando uma estrutura do tipo sanduíche α -hélice 3/3 (Figura 2). Tal padrão de enovelamento é predominantemente constituído por estruturas secundárias em α -hélices sobrepostas, às quais o grupo heme se encontra ligado de forma não covalente, por interações hidrofóbicas (WAJCMAN; KIGER; MARDEN, 2009). As hélices são nomeadas de A a H, e os resíduos de aminoácidos são numerados sequencialmente dentro de cada α -hélice. A maioria das globinas é composta de 140 a 150 resíduos de aminoácidos, dos quais somente três resíduos são altamente conservados: E7-His (Histidina número sete da hélice E), CD1-Phe e F8-His, que fazem parte da cavidade na qual se insere o grupo heme. Os resíduos CD1-Phe e F8-His (histidina proximal) são estritamente conservados nas globinas, enquanto o resíduo E7-His (histidina distal) pode ser substituído. O resíduo F8-His liga-se ao átomo de ferro do grupo heme prendendo-o à parte proteica (VINOGRADOV *et al.*, 1993). Um subgrupo especial de globinas, conhecidas com globinas truncadas, apresentam deleções em algumas regiões da estrutura resultando em um enovelamento diferente, do tipo sanduíche α -hélice 2/2 (PESCE *et al.*, 2007).

As globinas evoluíram de um ancestral comum em torno de 3,5 bilhões de anos atrás, dividindo-se em três subgrupos básicos: globinas de um único domínio (incluem hemoglobinas, mioglobinas e globinas truncadas), flavohemoglobinas (FHbs) e globinas-sensor acopladas (GSC). Bactérias possuem todos os três tipos de globinas, enquanto que arqueas não dispõem de FHbs, e por fim, eucariotos não dispõem de globinas-sensor acopladas (VINOGRADOV, 2006).

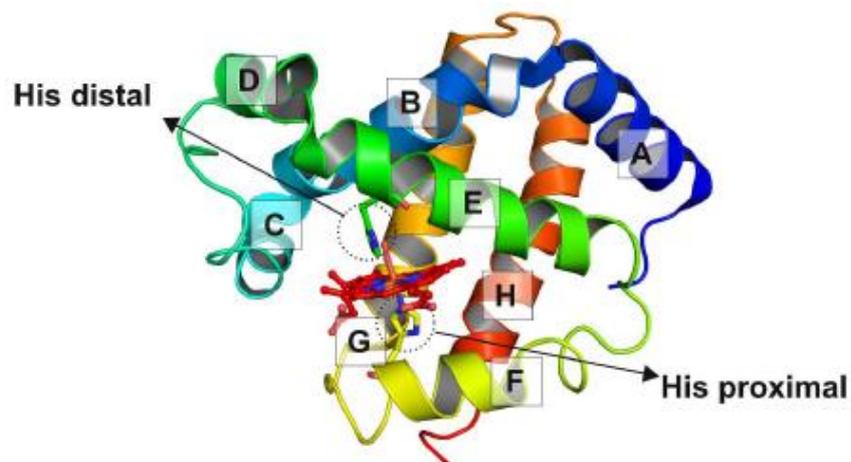


Figura 2. Estrutura de uma globina contendo todas as oito hélices e sítio de ligação do heme. O sítio de ligação do heme é usualmente um ambiente químico hidrofóbico, salvo pela presença das histidinas, proximal e distal (BACHEGA, 2013).

Globinas contendo um único domínio são majoritariamente conhecidas por desempenharem o papel de carreadoras de oxigênio (embora algumas também atuem em outras vias, como no metabolismo do óxido nítrico). Em leguminosas, são encontradas subclasses de globinas denominadas leghemoglobinas, as quais são responsáveis por armazenar o oxigênio que será posteriormente utilizado pela maquinaria simbiótica de fixação de nitrogênio (APPLEBY, 1984).

As proteínas do subgrupo das FHbs são compostas de dois domínios, que podem fazer parte ou não de uma mesma cadeia. O primeiro domínio é o do tipo globina, e no caso de proteínas que apresentam os dois domínios em uma mesma cadeia, este se encontra na porção N-terminal. O segundo domínio pertence à família das proteínas ferredoxina NADP-redutases, cujo enovelamento não tem relação com o apresentado pelas globinas. As FHbs com domínios fusionados possuem um tamanho médio de 400 aminoácidos. As FHbs atuam como potentes dioxigenases no metabolismo do óxido nítrico, com atividade vinte vezes maior do que a desempenhada pela mioglobina dos vertebrados para essa função (POOLE; HUGHES, 2000; MUKAI *et al.*, 2001).

O subgrupo das GSC abrange globinas fusionadas a outros domínios, o que resultam em tamanhos variados (300 a 700 resíduos de aminoácidos). A região N-terminal apresenta o enovelamento característico de globinas (semelhante a mioglobina) e a região C-terminal apresenta um domínio homólogo ao domínio sinalizador citoplasmático de quimiorreceptores bacterianos. Sua possível função seria ligar-se ao oxigênio diatômico ou outros ligantes gasosos e transmitir o sinal através de um domínio sinalizador (PESCE *et al.*, 2009).

Uma variedade de ligantes gasosos podem se ligar ao grupamento heme de globinas, mais notadamente O₂ e NO. A ligação reversível do O₂ está associada com a principal função das globinas nos organismos: transporte de O₂. A ligação de NO pela globina oxigenada é essencialmente para a detoxificação do NO que ocorre via atividade da NO deoxigenase. Várias funções têm sido descritas para globinas, inclusive atividade de haloperoxidase, reação com radicais livres, ligação e transporte de sulfetos e lipídios e sensor de oxigênio (BORROTO; SÁNCHEZ; PETER, 2015).

2.5. Hemoglobinas Truncadas

A família das hemoglobinas truncadas (trHb ou 2/2Hb), é constituída de pequenas hemeproteínas ligadoras de oxigênio, distribuídas em bactérias, plantas e eucariotos unicelulares, formando um grupo distinto dentro da super família das hemoglobinas. As trHbs ocorrem em concentração intracelular de nano a micromolar e, geralmente, contem 20 a 40 resíduos de aminoácidos a menos que as hemoglobinas de vertebrados, as quais são pouco relacionadas devido à baixa similaridade entre as sequências. Estruturalmente, são caracterizadas pela ausência da hélice A (ou pelo seu encurtamento), diminuição da região entre as hélices C-E, e a substituição da hélice F por um segmento polipeptídico extenso (pré-F), seguido de uma volta, que compreende o resíduo F8 (His) responsável pela coordenação ao ferro do grupo heme (Figura 3). Análises filogenéticas permitiram classificar as trHb em três grupos: I (N ou trHbN), II (O ou trHbO) e III (P ou trHbP). As características estruturais específicas, cavidade heme, dobramentos das hélices e a matriz protéica distinguem cada grupo (WITTENBERG et al., 2002; KUMAR; NAG; BASAK, 2013; PESCE; BOLOGNESI; NARDINI, 2013). No entanto, Bustamante e colaboradores (2016) demonstraram com base em 1107 sequências de hemoglobinas truncadas disponíveis atualmente que 24% das sequencias pertencem ao grupo I, 45% ao grupo II, 27% ao grupo III e, sugeriram a existência de um pequeno grupo (4%) de sequências que pertencem a um grupo nomeado como IV (ou Q, trHbQ) (BUSTAMANTE *et al.*, 2016).

O resíduo estritamente conservado em todos os grupos é o resíduo F8 (His), que coordena o grupo heme, cuja ligação é também suportada pelos resíduos básicos E10, E4, EF6, F4 e H16 que compõem o ambiente hidrofóbico do grupamento heme. Dois motivos GG (Gly-Gly), o primeiro entre as hélices A e B e o segundo no final da hélice E (a partir de EF1) são conservados nos grupos N, O e Q, mas são altamente variáveis no grupo P. A alta conservação do resíduo B16 (Asp) que marca o fim da hélice B é importante para a dobra típica das trHbs. Considerando os resíduos que permitem a caracterização específica de cada grupo, as posições estruturais das hélices E7, com uma His definindo o canal E7 e a hélice E15, regida por um Trp no grupo P, permite diferenciar o grupo P de O e N, e devem ser considerados características específicas desse grupo. O grupo O mostra um estiramento básico característico (His-Pro-Arg-Leu-Arg-X-Arg) localizado no anel EF e na primeira volta da hélice F. As características principais identificadas do novo grupo Q são os motivos GG, Trp ou Phe na hélice G8 e um resíduo His na hélice E7 quase 100% conservado e, as características específicas do grupo Q são um resíduo de Glu

estritamente conservado na E17, um motivo Arg-X-Arg bastante distinto perto da posição G8 e um terminal C conservado incluindo uma Ser altamente conservada na posição estrutural H22 (BUSTAMANTE *et al.*, 2016).

Já foram relatadas várias sequências e estruturas 3D das hemoglobinas do grupo O. Até o momento, seis estruturas cristalinas foram descritas desse grupo de proteínas: *Mycobacterium tuberculosis* (Mt-2/2HbO, PDB ID 1IDR) (MILANI *et al.*, 2003), *Thermobifida fusca* (Tf-2/2HbO, PDB ID 2BMM) (MOREA;BOFFI, 2005), *Bacillus subtilis* (Bs-2/2HbO, PDB ID 1UX8) (GIANGIACOMO *et al.*, 2005), *Geobacillus stearothermophilus* (Gs-2/2HbO, PDB ID 2BKM) (ILARI *et ai*, 2007), *Agrobacterium tumefaciens* (At-2/2HbO, PDB ID 2XYK) (PESCE *et al.*, 2011) e a primeira trHb de planta *Arabidopsis thaliana* (Ath-2/2HbO, AtGLB3 ou AHb3, PDB ID 4C0N) (REEDER; HOUGH,2014).

O grupo O possui algumas características que o difere dos demais grupos de globinas: presença de resíduos distais heme específicos nas hélices B10, CD1, E7, E11 e G8, locais que estão relacionados com a ligação do grupamento heme (GIORDANO *et al.*,2015.)

Alguns organismos que possuem trHbs apresentam propriedades patogênicas, realizam fotossíntese, fixam nitrogênio ou possuem capacidades metabólicas distintas. Presume-se que as poucas trHbs que foram caracterizadas em detalhes suficientes estejam envolvidas nestas categorias (MILANI *et al.*, 2005). Por exemplo, a trHb do grupo I da cianobactéria *Nostoc* sp. parece estar envolvida na proteção de seu aparato de fixação de nitrogênio do dano oxidativo pela eliminação do oxigênio (HILL *et al.*, 1996), e *Mycobacterium tuberculosis* possui uma trHb do grupo I que está associada a patogenicidade desse microrganismo e atua como NO-dioxigenase, metabolizando óxido nítrico gerado pelos macrófagos, e também possui uma trHb do grupo II que apresenta atividade de peroxidase com formação de intermediários férricos (VINOGRADOV; MOENS, 2008).

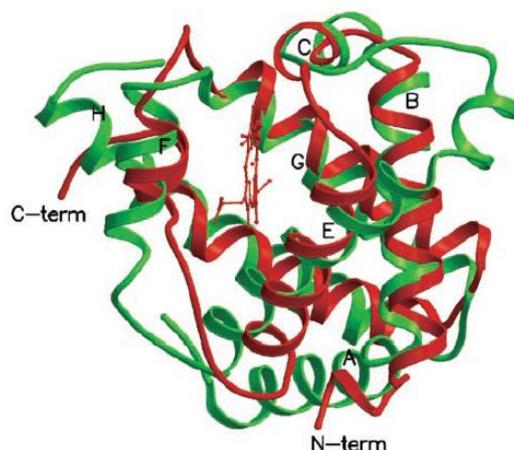


Figura 3. Sobreposição estrutural entre uma globina truncada de *Chlamydomonas eugametos* (vermelho) e uma mioglobina de baleia cachalote (verde) (WITTENBERG et al, 2002).

No genoma de *H. seropedicae* SmR1 foram anotados cinco genes possivelmente codificadores de globinas do tipo hemoglobinas truncadas (*Hsero_0935*, *Hsero_1880*, *Hsero_2698*, *Hsero_2855* e *Hsero_2872*), sendo que dois deles (*Hsero_2855* e *Hsero_2872*) estão dentro do *cluster nif* (Programa Genopar).

A proteína *Hsero_1880* foi caracterizada utilizando ressonância magnética nuclear (NMR) por Razzera e colaboradores (2008), que propuseram um modelo estrutural para o ligante heme. O gene *Hsero_2872* foi clonado e a proteína *Hsero_2872* foi caracterizada funcionalmente por Novello (2012). Os resultados obtidos mostraram que o promotor do gene é funcional e sua expressão é aumentada em resposta a diminuição dos níveis de amônio, a expressão do promotor do gene *Hsero_2872* depende da expressão concomitante do gene *nifA*. A expressão de *Hsero_2872* aparentemente tem efeito no metabolismo do nitrogênio uma vez que a atividade de nitrogenase da estirpe mutante com deleção do gene *Hsero_2872* foi somente 50% da atividade de nitrogenase da estirpe selvagem SmR1. A atividade de β galactosidase da estirpe mutante *Hsero_2872*, contendo as fusões transcricionais dos promotores de *NifA* e *NifB* com o gene repórter *lacZ*, foi menor que da estirpe selvagem SmR1, sugerindo a necessidade do gene *Hsero_2872* para atividade da proteína *NifA*. As análises feitas por Novello (2012) mostraram que a proteína *Hsero_2872* possui similaridade com as hemoglobinas truncadas do grupo III, porém não foi possível determinar precisamente sua classificação. O alinhamento de aminoácidos da globina *Hsero_2872* com outras duas globinas de *H. seropedicae* mostrou 26% de identidade e 43% de similaridade com *Hsero_2855* e 29% de identidade e 45% de similaridade com *Hsero_1880*. *Hsero_2855* e *Hsero_1880*

possuem 47% de identidade e 68% de similaridade, e os aminoácidos conservados His-F8, Trp-G8, Phe-B9, Tyr-B10 bem como os dois pares do motivo Gly-Gly das hemoglobinas truncadas grupo II também foram observados. Estes resíduos Gly-Gly estão relacionados à construção da estrutura compacta das hemoglobinas truncadas por participarem da formação de voltas estruturais nos grupos I e II. A análise do alinhamento das três globinas de *H. seropedicae* mostrou 15% de identidade e confirmou a presença de resíduos de aminoácidos conservados His-F8, Trp-G8 e motivo Gly-Gly na região E-F no gene *Hsero_2872* e na globina putativa *Hsero_2855*. Pode-se observar, também, a conservação dos resíduos His-CD1, Phe-E14 e Tyr no segmento pré-F, que são importantes para a regulação da ligação com o grupo heme na globina *Hsero_1880* (NOVELLO, 2012). De acordo com os modelos estruturais demonstrados por Oliveira (2014), as proteínas *Hsero_0935* e *Hsero_2698* foram classificadas como pertencentes ao grupo I e as proteínas *Hsero_1880* (Figura 4), *Hsero_2855* (Figura 5) e *Hsero_2872* como pertencentes ao grupo II das trHbs. A proteína *Hsero_2872* em *H. seropedicae* SmR1 mostrou-se menos conservada, aparentando não possuir o resíduo de Histidina na hélice F8, responsável pela coordenação do átomo de ferro no grupo heme, indicando uma provável mutação (His-Gly), entretanto, devido a sua maior semelhança estrutural com trHbs do grupo II, a presença do motivo Gly-Gly e da hélice pré-F no modelo gerado, foi classificada como sendo do grupo II das trHbs, ao contrário do descrito por Novello (2012), que indicou haver uma semelhança maior entre a proteína *Hsero_2872* e as trHbs do grupo III. A análise do genoma de *H. seropedicae* SmR1 através dos dados de transcriptomas por RNA-Seq indicou que o gene *Hsero_2698* está em operon com o gene *Hsero_2699* (BARBOSA, 2014). As proteínas *Hsero_0935*, *Hsero_1880*, *Hsero_2698* e *Hsero_2855* não foram caracterizadas quanto à função até o momento.

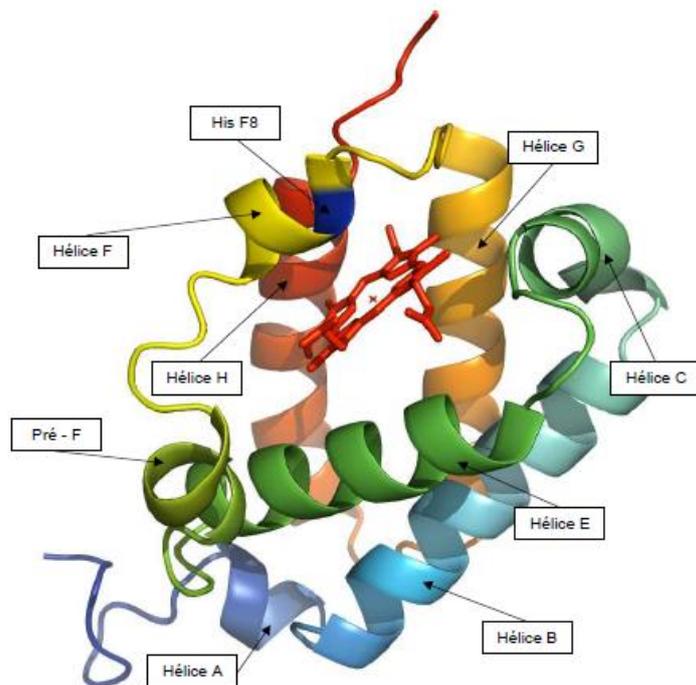


Figura 4. Predição da estrutura da proteína Hsero_1880 de *H. seropedicae* SmR1 com o grupo heme proposta por Oliveira (2014). A região N-terminal (azul) e a C-terminal (vermelho), hélices e a posição da histidina F8 estão destacadas na imagem.

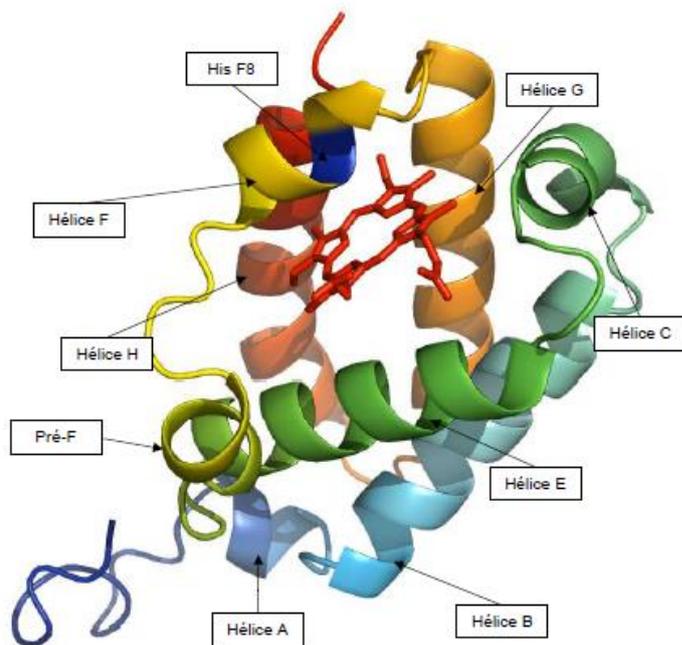


Figura 5. Predição da estrutura da proteína Hsero_2855 de *H. seropedicae* SmR1 com o grupo heme proposta por Oliveira (2014). A região N-terminal (azul) e a C-terminal (vermelho), hélices e a posição da histidina F8 estão destacadas na imagem.

3. Objetivos

Caracterizar os genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* de *H. seropedicae* SmR1 em relação a seus aspectos estruturais e funcionais.

3.1. Objetivos Específicos

Construção de estirpes mutantes nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* e determinar o fenótipo;

Construção de fusões transcricionais com genes repórter;

Investigar uma possível participação dos genes no metabolismo de nitrogênio;

Determinação do efeito do oxigênio e nitrogênio no padrão de expressão desses genes.

4. Materiais e Métodos

4.1. Bactérias e plasmídeos

As estirpes de *E. coli* e *H. seropedicae* utilizadas estão listadas nos quadros 1 e 2 respectivamente. Os plasmídeos estão listados no quadro 3.

Quadro 1. Estirpes de *Escherichia coli*

Estirpe	Característica	Aplicação	Fonte
TOP 10	<i>hsdR</i> , <i>lacZ</i> ΔM15, <i>recA1</i> , <i>mcrA</i> , <i>endA1</i>	Clonagens e manutenção de plasmídeos	Invitrogen
S17.1	SmR, Tra+	Estirpe doadora para conjugação bi-parental	SIMOM; PRIEFER; PUHLER, 1983

Quadro 2. Estirpes de *Herbaspirillum seropedicae*

Estirpe	Característica	Fonte
SmR1	Estirpe selvagem, SmR, Nif+	MACHADO <i>et al.</i> , 1996
TFL1880	SmR1 contendo deleção de aproximadamente 354 pares de base na região central do gene Hsero_1880	Este trabalho
TFL2855	SmR1 contendo deleção de aproximadamente 369 pares de base na região central do gene Hsero_2855	Este trabalho

Quadro 3. Plasmídeos

Plasmídeo	Característica	Fonte
pK18mobsacB	<i>sacB</i> , <i>lacZ</i> , Km ^R	SCHAFFER, 1994

pPW452	<i>Tc^R</i> , vetor fusão transcricional com gene <i>lacZ</i>	WOODLEY <i>et al.</i> , 1996
pTZ57R/T	AmP ^R , 3'-T p/ ligação de fragmentos de DNA amplificados pela <i>Taq</i>	Fermentas Inc.
pMP220	<i>Tc^R</i> , vetor fusão transcricional com gene <i>lacZ</i> , com sítio policlonagem do pPW452 invertido	SPAINK <i>et al.</i> , 1987.
pTZ1880A	Produto de PCR com 518 pb contendo região codificadora inicial do gene <i>Hsero_1880</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZ1880B	Produto de PCR com 634 pb contendo região codificadora final do gene <i>Hsero_1880</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZ1880ABdel	Fragmento BamHI e XhoI do pTZ1880A ligado com o pTZ1880B linearizado com as mesmas enzimas	Este trabalho
pTZ2855A	Produto de PCR com 652 pb contendo região codificadora inicial do gene <i>Hsero_2855</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZ2855B	Produto de PCR com 612 pb contendo região codificadora final do gene <i>Hsero_2855</i> ligado ao vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZ2855ABdel	Fragmento BamHI e HindIII do pTZ2855A ligado pTZ2855B linearizado com as mesmas enzimas	Este trabalho
pk1880	Fragmento BamHI e HindIII do pTZ1880ABdel ligado ao pK18mobsacB	Este trabalho
pk2855	Fragmento EcoRI e HindIII do pTZ2855ABdel ligado ao pK18mobsacB	Este trabalho
pMP1880	Região promotora do gene <i>Hsero_1880</i> ligada ao vetor pMP220	Este trabalho
pMP2855	Região promotora do gene <i>Hsero_2855</i> ligada ao vetor pMP220	Este trabalho

pMP2854	Região promotora do gene <i>Hsero_2854</i> ligada ao vetor pMP220	Este trabalho
pPW1880	Região promotora do gene <i>Hsero_1880</i> ligada ao vetor pPW452	Este trabalho
pPW2855	Região promotora do gene <i>Hsero_2855</i> ligada ao vetor pPW452	Este trabalho
pPW2854	Região promotora do gene <i>Hsero_2854</i> ligada ao vetor pPW452	Este trabalho

4.2. Meios de Cultura

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio líquido NFb-Malato (PEDROSA e YATES, 1984) a 30°C, sob agitação de 120 rpm. As culturas em meio sólido ou semissólido foram crescidas em NFb-Malato sem agitação e incubadas em estufa a 30°C. O meio NFb-Malato tem a composição apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Composição do meio NFb-Malato

Elemento	Gramas/Litro
MgSO ₄ . 7H ₂ O	2,0. 10 ⁻¹
NaCl	1,0. 10 ⁻¹
CaCl ₂	2,0. 10 ⁻²
Ácido nitrilo-triacético	5,6. 10 ⁻²
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2,0. 10 ⁻²
Ácido málico	5,0
Biotina	1,0. 10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	2,0. 10 ⁻³
MnSO ₄ . H ₂ O	2,35. 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	2,8. 10 ⁻³
CuSO ₄ . 5H ₂ O	8,0. 10 ⁻⁵
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	2,4. 10 ⁻⁴

No momento do uso foram adicionados ao meio NFb-Malato 50 mL/L ou 10 mL/L de solução esterilizada de fosfatos (159,4 g/L de KH_2PO_4 e 17,8 g/L de K_2HPO_4). Estes meios foram denominados respectivamente de NFb-MalatoHP e NFb-MalatoLP.

Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH_4Cl 20 mmol/L. As soluções de fosfatos e cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio no momento do uso. O meio NFb-MalatoHP e NFb-MalatoLP com adição de 20 mmol/L de NH_4Cl foram denominados NFb-MalatoHPN e NFb-MalatoLPN respectivamente.

Os meios sólido e semissólido foram obtidos adicionando-se ágar nas concentrações de 15 g/L e 1,5 g/L, ao meio líquido, respectivamente.

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) (SAMBROOK et al., 1989) sob agitação de 150 rpm ou em meio sólido LA, a 37°C. O meio LB tem a composição listada na tabela 2.

Tabela 2. Composição do meio LB (Luria Bertani)

Elemento	Gramas/Litro
Extrato de levedura	5
Cloreto de sódio	10
Triptona	10

Adicionando-se ágar na concentração de 15 g/L ao meio líquido, obtém o meio sólido, denominado meio LA

4.3. Condições de cultivo e estoque de microrganismos

As culturas de *H. seropedicae* foram incubadas a 30°C em meio NFb-MalatoHP com diferentes concentrações de NH_4Cl e também com os antibióticos necessários a seleção. As culturas cultivadas em meio líquido foram incubadas em agitador rotatório a 120 rpm, em frascos de 25, 40 ou 60 mL, mantendo-se uma proporção de 1/3 ou 1/4 entre o volume do meio de cultura e o volume total do frasco. As culturas cultivadas em meio semissólido foram incubadas em estufa a 30°C, em frascos de 10 mL, contendo 4 mL de meio de cultura.

As culturas de *E. coli* foram incubadas a 37°C em meio LB na presença de antibióticos para a seleção. As culturas cultivadas em meio líquido foram incubadas em

agitador rotatório a 180 rpm, em frascos de 25, 40 ou 60 mL, mantendo-se uma proporção de 1/3 ou 1/4 entre o volume do meio de cultura e o volume total do frasco.

Culturas estoque de *E. coli* foram mantidas em solução de glicerol 50% a -20°C. Já as culturas estoque de *H. seropedicae* foram mantidas a temperatura ambiente em meio NFb-MalatoHPN semissólido, contendo os antibióticos adequados.

4.4. Antibióticos

As concentrações e os antibióticos utilizados na seleção e cultivo das estirpes bacterianas estão apresentadas na tabela 3. As soluções estoque foram preparadas como descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Os antibióticos foram adicionados aos meios no momento de uso. Para preparo de meios sólido e semissólido, estes, depois de fundidos, foram resfriados até temperatura de aproximadamente 55°C e então os antibióticos foram adicionados.

Tabela 3. Relação dos antibióticos utilizados

Antibióticos utilizados	Concentração inicial	Concentração final <i>E. coli</i>	Concentração final <i>H. seropedicae</i>
Ác. Nalidíxico	10 mg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL
Ampicilina	250 mg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL
Canamicina	100 mg/mL	50 µg/mL	500 µg/mL
Estreptomicina	80 mg/mL	80 µg/mL	80 µg/mL
Tetraciclina	10 mg/mL	10 µg/mL	10 µg/mL

4.5. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR

A amplificação dos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* de *H. seropedicae* foi realizada pelo método de reação em cadeia da polimerase ou PCR, utilizando como molde DNA genômico de *H. seropedicae* SmR1, em termociclador Mastercycler Gradient da Eppendorf. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram sintetizados quimicamente

e estão listados na tabela 4. Foram inseridos sítios de restrição para enzimas de acordo com o vetor em que os fragmentos amplificados foram clonados.

Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados

Primer	Sítio Restrição	Sequência (5'->3')	Tm	Amplicon (pb)
1880-AF	BamHI	ATAGGATCCTGCGCCAGATCC	58.8°C	518
1880-AR	XhoI	AAGATACTCGAGATGAATGTTGGGGTCTTC	59.5°C	
1880-BF	XhoI	ATTCATCTCGAGTATCTTAAGCCCGAGTAA	58.5°C	634
1880-BR	HindIII	TATAAGCTTACGTTGCTCCAGCGT	58.3°C	
1880-CDF	Nenhum	GCTGGCGCACTATGTCTTCA	57.8°C	WT: 767
1880-CDR	Nenhum	CAGCATCTCTTCGACCTCGG	57.5°C	Del: 413
1880-PF	PstI	TATCTGCAGGTTCCCTTTCACGCT	59.9°C	496
1880-PR	BglII	AATAGATCTGCCGCCGATGAGTTC	58.9°C	
2855-AF	BamHI	ATAGGATCCACGGGCCTTGTCACG	62.7°C	652
2855-AR	XhoI	AAGATACTCGAGATGAATCGCAGACTTCGA	60.3°C	
2855-BF	XhoI	ATTCATCTCGAGTATCTTTGCAACCAATAAGGA	59.3°C	612
2855-BR	HindIII	TATAAGCTTACGTCATACCGGGCG	58.3°C	
2855-CDF	Nenhum	ATCGTAGTGGTGTGCGACAG	57.1°C	WT: 781
2855-CDR	Nenhum	CAGGCTGGCCTGGTATTTGA	57.5°C	Del: 412
2854-H-PF	EcoRI	GACGAATTCTGGACTTGCCGATGC	60.4°C	611
2854-H-PR	BglII	AATAGATCTCGCGCTGGCTGTCTA	59.6°C	
2855-PF	EcoRI	GACGAATTCTCGGTGTAGACAGCC	59.2°C	517
2855-PR	BglII	AATAGATCTGCCGATTGGCCAGCG	61.5°C	

O sistema de reação de amplificação para um volume final de 20 µL foi composto de: 0,2 U de enzima Taq DNA polimerase (Fermentas Int. Inc.), tampão para Taq [(NH₄)₂SO₄] na concentração de 1x o volume final de reação, 1-5 ng/mL de DNA genômico de *H. seropedicae*, 0,5 pmol/L de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,2 mol/L de dNTPs e 1,5 mmol/L de MgCl₂. As condições de reação foram: 1 ciclo de 95°C por 1 minuto, 30 ciclos de 95°C por 45 segundos, temperatura de anelamento (variável para cada dupla de iniciadores) por 30 segundos, 72°C por 45 segundos, seguidas de 1 ciclo de 72°C por 15 minutos. A verificação da amplificação foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1%, como descrito no item 4.6.

4.6. Eletroforese de DNA em gel de agarose

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose horizontal como descrito por Sambrook e colaboradores (1989). O tampão utilizado foi TAE 1X (Tampão Tris Acetato EDTA – Tris 40 mmol/L, ácido acético 20 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 8,0). As amostras de DNA foram misturadas a 5 µl de Fsuds (azul de bromofenol 0.8%, ficol 10%, xileno cianol 0.4%, SDS 1%, EDTA 1,8 mmol/L, pH 8,0) para posterior aplicação nos poços do gel. Após a corrida eletroforética a 50 - 75 V, o gel foi transferido para um recipiente contendo solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL). O gel foi incubado nesta solução por cerca de 20 minutos, transferido para um recipiente contendo água, onde foi brevemente lavado. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta (312 nm) em transiluminador EC3 System – UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CAUSA). O registro das imagens foi feito em papel térmico Sony (Video printer Grafic UP860CE).

4.7. Purificação de plasmídeos em pequena escala

O método utilizado para purificação de plasmídeos foi o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Foi utilizado 1,5 mL de cultura bacteriana contendo o plasmídeo de interesse, a qual foi centrifugada a 13.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. O sedimento de células foi ressuspensão em 150 µL de GET (glucose 50 mmol/L, Tris.HCl 25 mmol/L pH 8.0 e EDTA 10mmol/L), e então lisado pela adição de 150µL de solução de lise (SDS 1% e NaOH 0,18 mol/L) com homogeneização suave. Em seguida, foi adicionado 150 µL de Kcaf (acetato de potássio 3 mol/L pH 4,8 e ácido fórmico 1,8 mol/L) e incubado por 15 minutos no gelo, para precipitação do DNA cromossomal, proteínas e fragmentos celulares. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado e tratado com 100 µl da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O DNA plasmidial foi precipitado com a adição de 3 volumes de etanol 96%, a mistura foi homogeneizada vigorosamente e então centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, e então foi colocado para secar na bomba de vácuo, na estufa ou a temperatura ambiente. Após a secagem, foi dissolvido em 30 µL de água ultrapura e o rendimento da purificação foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose.

4.8. Clivagem de DNA com enzimas de restrição

A digestão de DNA com enzimas de restrição foi feita seguindo as recomendações especificadas nos catálogos dos fabricantes INVITROGEN ou FERMENTAS.

4.9. Preparo dos vetores de clonagem

Os vetores utilizados foram clivados com as enzimas de restrição adequadas. Após a restrição, as enzimas foram desnaturadas por extração com um volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). O vetor foi precipitado com etanol absoluto, lavado com etanol 70%, seco a vácuo ou a temperatura ambiente e dissolvido em água ultrapura estéril (SAMBROOK *et al.*, 1989).

4.10. Ligação de fragmentos de DNA a vetores

O vetor linearizado foi ligado ao inserto numa razão molar de aproximadamente 1:3. Para a ligação foram adicionados tampão de ligação e 0,5 U de T4 DNA ligase e o sistema foi incubado a aproximadamente 20°C durante a noite.

4.11. Transformação bacteriana

4.11.1. Preparo de células competentes utilizando MgCl₂ e CaCl₂

Para o preparo, células de *E. coli* TOP10 ou S17.1 provenientes de uma cultura saturada, previamente crescida em meio LB durante a noite, foram diluídas no mínimo 100 vezes em 200 mL de meio LB fresco em um frasco do tipo erlenmeyer de 1 L e cultivado a 30°C e 120 rpm por aproximadamente 4 horas até que a cultura de células tivesse uma D.O.₅₉₅ entre 0,2 – 0,4.

As células foram transferidas para 4 tubos Falcon de 50 mL incubadas por 15 minutos em banho de gelo, coletadas por centrifugação (2.500 x g por 8 minutos, a 0°C) e o sedimento de células foi ressuspensão em 15 mL de uma solução de MgCl₂ (100 mM).

Esta suspensão foi centrifugada (2.500 x g por 8 minutos, a 0°C), ressuspensa em 25 mL de uma solução de CaCl₂ (100 mM) e então incubadas por 30 minutos em banho de gelo.

Após esta incubação, as células foram coletadas a 2.500 x g por 8 minutos e a 0°C, todo o sobrenadante foi descartado e finalmente as células foram ressuspensas em 200 µL de uma solução de CaCl₂ (100 mM) preparada em Glicerol 50%. As células ressuspensas foram aliqotadas em volume de 100 µL em microtubos previamente gelados. Antes da utilização, as células foram congeladas a -80°C, mesma temperatura de armazenamento, por no mínimo 30 minutos.

4.11.2. Transformação por Choque Térmico

Plasmídeos íntegros ou ligações foram misturados a uma suspensão de 100 µL de células competentes na proporção de 1:100 e incubadas em banho de gelo por 30 minutos. Após este tempo, a mistura foi levada a banho-maria a 42°C por 30 segundos e incubada novamente em gelo por 2 minutos. Após o choque térmico, as células foram recuperadas em 400 µL de meio LB por 1 hora a 37°C e em seguida plaqueadas em meio LA com antibiótico adequado.

4.12. Transferência de plasmídeos por conjugação

Os plasmídeos recombinantes a serem transferidos para a estirpe SmR1 de *H. seropedicae* foram primeiramente transformados em *E. coli* S17.1 (*tra+*).

As estirpes de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas nos meios NFb-MalatoHPN e LB, respectivamente, sem antibióticos. Em seguida, foram feitas misturas da cultura de *H. seropedicae* com cultura de *E. coli* em duas proporções distintas. Em um microtubo foram misturados 50 µL da cultura de *H. seropedicae* com 5 µL da cultura de *E. coli*, e em outro misturou-se 100 µL da cultura de *H. seropedicae* com 2 µL da cultura de *E. coli*. As suspensões de células de ambas misturas foram colocadas em pólos distintos na placa, como uma gota em meio LA/NFb-MalatoHPN (1:3) e incubadas a 30°C por 24 horas. A massa de células foi raspada, suspensa em 1 mL de NFb-Malato e então 200µL foram plaqueados em meio NFb-malatoLP sólido acrescido de 20 mmol/L de NH₄Cl e contendo os antibióticos adequados.

4.13. Sequenciamento de DNA

O DNA dupla fita para sequenciamento foi obtido basicamente como descrito no Item 4.5. A reação de sequenciamento foi feita utilizando dideoxynucleotídeos terminadores de cadeia marcados com fluoróforos (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977). Nesta reação foram utilizados aproximadamente 0,5 µg do DNA purificado (Item 4.7), 0,5 µL do *primer* 1 pmol, 3,0 µL de tampão save money, 1 µL de Big Dye, o volume final da reação foi de 10 µL. A reação foi feita utilizando termociclador da Eppendorf e os parâmetros utilizados foram: 1 ciclo de 1 minuto a 95°C e 35 ciclos de 20 segundos a 94°C e 1,5 minutos a 60°C. O produto da reação de amplificação, acrescido de 10 µL de água ultra pura, foi precipitado com 2 µL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 66 µL de etanol absoluto e submetido a centrifugação na temperatura ambiente a 13.000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo por uma hora e meia e então dissolvido em 10 µL de Formamide Loading Dye (Applied Biosystems), desnaturado por 2 minutos a 96°C e submetido à eletroforese em um sequenciador automático de DNA da 3500 XL (ThermoFisher). As sequências obtidas no formato FASTA foram submetidas ao NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>).

4.14. Curva de crescimento e tempo de duplicação

As estirpes de interesse foram cultivadas basicamente como descrito no item 4.3, em frascos de 40 mL contendo 5 mL de meio NFb-MalatoHPN. Para a realização do experimento em diferentes concentrações de oxigênio e nitrogênio, estirpes de *H. seropedicae* foram pré-inoculadas em meio NFb-MalatoHPN, e, após alcançarem a saturação foram reinoculadas nos meios numa D.O₅₉₅ inicial de 0,1, contendo diferentes concentrações de NH₄Cl (ou outra fonte de nitrogênio) ou diferentes concentrações de O₂, obtida através de troca gasosa. Os frascos com culturas em meio NFb-MalatoHP foram vedados com rolhas de borracha (suba-seal) e então foi realizado troca gasosa com um gás inerte e depois foi injetado a concentração de oxigênio desejada através de uma seringa. A densidade ótica das culturas, para o início dos ensaios, foi ajustada para 0,010 e o crescimento foi acompanhado de hora em hora por até 12 horas. A cada hora, alíquotas de 200 µL das culturas em crescimento foram transferidas para placas do tipo ELISA

(Greiner Bio One) e então submetidas a leitura de sua turbidez a um comprimento de onda de 595 nm em leitor de microplacas (ELX 800 BIO-TEK Instruments).

O tempo de duplicação ou geração (G) da estirpe selvagem e dos mutantes foi calculado através das equações de reta, obtidas pelos gráficos plotados tomando-se o \ln ($\log 2,7$) da densidade ótica das culturas versus tempo de cultivo, nos pontos em que o crescimento bacteriano é exponencial. O tempo de duplicação ou geração é o inverso do coeficiente de crescimento, o qual corresponde ao coeficiente angular do gráfico (a), ou seja, $G=1/a$.

Os gráficos e equações de retas obtidos a partir das curvas de crescimento da estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1 e os mutantes estão representados nas figuras 6, 7 e 8.

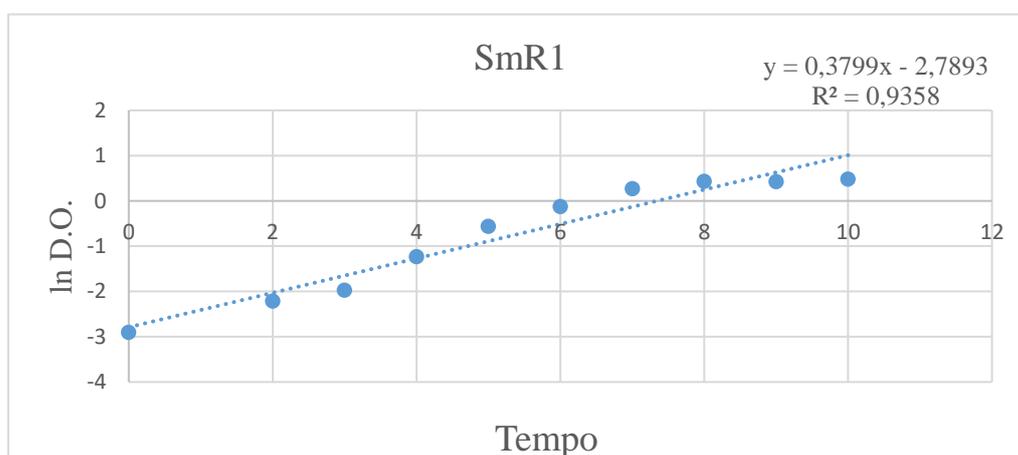


Figura 6. Gráfico do crescimento exponencial e equação da reta para cálculo do tempo de duplicação de *H. seropedicae* SmR1 selvagem.

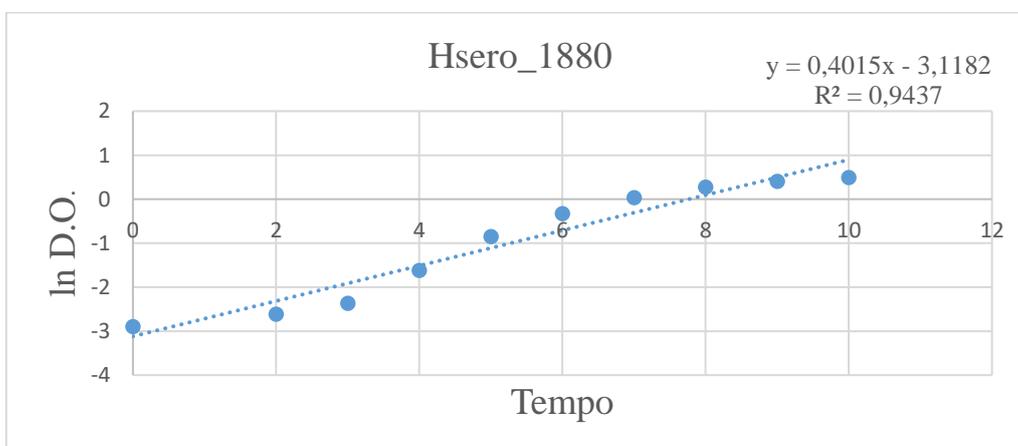


Figura 7. Gráfico do crescimento exponencial e equação da reta para cálculo do tempo de duplicação de *H. seropedicae* SmR1 mutante no gene *Hsero_1880*.

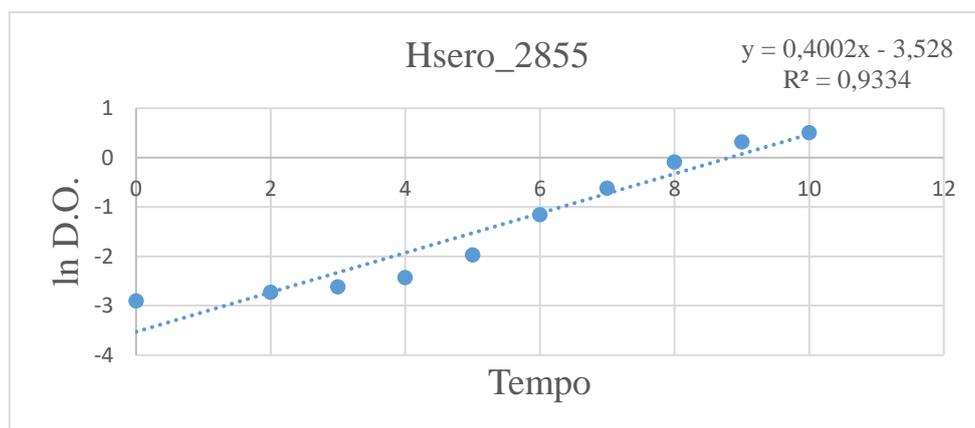


Figura 8. Gráfico do crescimento exponencial e equação da reta para cálculo do tempo de duplicação de *H. seropedicae* SmR1 mutante no gene *Hsero_2855*.

4.15. Determinação de atividade de β -galactosidase

A determinação de atividade de β -galactosidase para avaliar a funcionalidade de um provável promotor do gene *Hsero_1880* e *Hsero_2855* de *H. seropedicae* foi feito segundo Miller (1990). Estirpes de *E. coli* ou *H. seropedicae* foram pré-inoculadas em meio LB e NFb-MalatoHP (20 mmol/L de NH_4Cl), respectivamente. Após alcançarem a saturação foram reinoculadas nos respectivos meios numa D.O_{595} inicial de 0,1. Alíquotas foram coletadas em diferentes tempos e determinada a D.O_{595} . Alíquotas de 100 μL coletadas foram misturadas a 900 μL de tampão Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mol/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 mol/L, KCl 10 mol/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mmol/L, β -mercaptoetanol 50 mmol/L e SDS 0,0027% pH 7,0) em microtubos de 2,0 mL. À mistura foram adicionados 25 μL de clorofórmio e o sistema de reação foi agitado em vórtex por aproximadamente 15 segundos para lise das células. A mistura foi incubada por 5 minutos a 30°C e a reação foi iniciada pela adição de 200 μL de ONPG (*o*-nitrofenil β -D-galactosídeo 4 mg/mL preparado em tampão Z com adição de β -mercaptoetanol 50 mmol/L e SDS 0,0027%). A reação foi interrompida pela adição de 500 μL de Na_2CO_3 1 mol/L em diversos tempos. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13.400 rpm e o sobrenadante foi levado para determinação da absorbância em 415 nm e 550 nm.

Para a realização do experimento em diferentes concentrações de oxigênio e nitrogênio, estirpes de *H. seropedicae* foram pré-inoculadas em meio NFb-MalatoHPN, e, após alcançarem a saturação foram reinoculadas nos meios numa D.O_{595} inicial de 0,1,

contendo diferentes concentrações de NH_4Cl (ou outra fonte de nitrogênio) ou diferentes concentrações de O_2 , obtida através de troca gasosa, conforme descrito no item 4,14. Após esse procedimento, as culturas foram incubadas por no mínimo 5 horas em estufa a 30°C a 120 rpm.

4.16. Determinação da atividade da nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi determinada pelo método de redução do acetileno a etileno (KLASSEN *et al.*, 1997). Os frascos com culturas em meio NFb-MalatoHP semissólido suplementado com 0,5 mmol/L de glutamato foram vedados com rolhas de borracha (suba-seal) e então foi injetado acetileno gasoso (10% do volume da fase gasosa do frasco). A cultura foi incubada a 30°C por 1 hora. Após este período, foi coletada uma amostra de 0,5 mL da fase gasosa para análise por cromatografia gasosa do etileno formado. Foi utilizado cromatógrafo Varian Star 3400 CX equipado com uma coluna de Porapak N e detector de ionização de chama. A temperatura da coluna foi mantida em 120°C e do detector em 200°C . O gás de arraste foi o nitrogênio super seco. Etileno padrão (100 ppm) foi fornecido pela White Martins S.A.

Depois da coleta da fase gasosa dos frascos para a cromatografia gasosa, a fase semissólida foi vigorosamente homogeneizada em vórtex e então congelada para a realização do ensaio de determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (Item 4.17). A atividade da nitrogenase foi expressa como nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína da cultura.

4.17. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita utilizando-se o método de Bradford (1976). Foram lisados 50 μL de cultura bacteriana, proveniente do ensaio de nitrogenase, com a adição de 50 μL de NaOH 0,2 mol/L e incubação por 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. Depois deste tempo de incubação, 30 μL do produto de lise foram transferidos para poços de uma placa de Elisa onde finalmente foi adicionado um volume de 170 μL de reativo de Bradford (Comassie Brilliant Blue G-250 100 mg/L, etanol 95% e ácido fosfórico 85%). Após a homogeneização, a absorbância a 595 nm foi determinada em um leitor de microplacas. Cada ensaio de determinação da concentração de proteínas foi

realizado em duplicata e a curva padrão foi feita utilizando-se BSA (albumina de soro bovina) em diferentes concentrações (0,6 µg/µL - 20 µg/µL) preparado com o mesmo tampão das proteínas a serem quantificadas. A determinação da concentração de proteínas foi utilizada para o cálculo da atividade do complexo enzimático da nitrogenase.

4.18. Estratégia de mutagênese dos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855*

Para a construção das estirpes mutantes nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* foram feitas deleções de 354 pares de bases da região central do gene *Hsero_1880* e 369 pb do gene *Hsero_2855*. Regiões a montante e a jusante dos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855*, com 1152 pb e 1164 pb respectivamente, foram amplificadas, ligadas e então, clonadas em vetor utilizado para mutagênese (pk18mobsacB), juntamente com um marcador de seleção negativa, o gene *sacB* (GAY *et al.*, 1983).

O objetivo da inclusão destas regiões foi aumentar o grau de homologia entre o vetor construído e o genoma de *H. seropedicae*, favorecendo a recombinação homóloga. O gene *sacB* foi utilizado como marcador de seleção negativa para isolamento de transformantes que tenham integrado o gene mutado em seu genoma e perdido o restante do vetor. A expressão do gene *sacB* é letal para *H. seropedicae* na presença de sacarose no meio de cultura, uma vez que a levano-sucrase codificada por este gene de *B. subtilis* catalisa a formação de polímeros de frutose no envelope celular, que são em seguida liberadas para o meio de cultura. Em bactérias gram-negativas onde o envelope celular compreende uma membrana externa e um espaço periplasmático, a expressão do gene *sacB*, na presença de sacarose, leva ao acúmulo de polímeros de frutose no espaço periplasmático, resultando na lise da célula bacteriana (STEINMETZ *et al.*, 1983).

No cassete contendo o gene *sacB* também está incluído um gene de resistência a canamicina (cassete *nptI-sacR-sacB*), o qual foi obtido a partir do vetor pMH1701 (HYNES *et al.*, 1989). Este gene auxilia na seleção das bactérias que tenham tido a integração do vetor ao DNA cromossomal.

Em síntese, depois da construção e transformação do vetor, as estirpes bacterianas resistentes ao antibiótico foram selecionadas em placas com meio adequado, mas sem sacarose em um primeiro momento. Nesse quadro, dois eventos genéticos eram teoricamente esperados: (a) a recombinação homóloga simples entre o gene deletado e o gene selvagem, levando a inserção do vetor inteiro no locus gênico alvo; (b) a

recombinação inespecífica levando a inserção do vetor inteiro em um locus gênico não homólogo.

A ocorrência do primeiro evento genético citado foi confirmada através da detecção de duas cópias do gene alvo em uma PCR, ou seja, uma cópia selvagem e outra cópia deletada. Após a identificação deste evento, a estirpe isolada foi cultivada em meio contendo sacarose, para seleção negativa das estirpes em que o segundo evento de recombinação tenha ocorrido. Um esquema da estratégia de mutagênese está representado na figura 9 (BATISTA, 2011, com modificações).

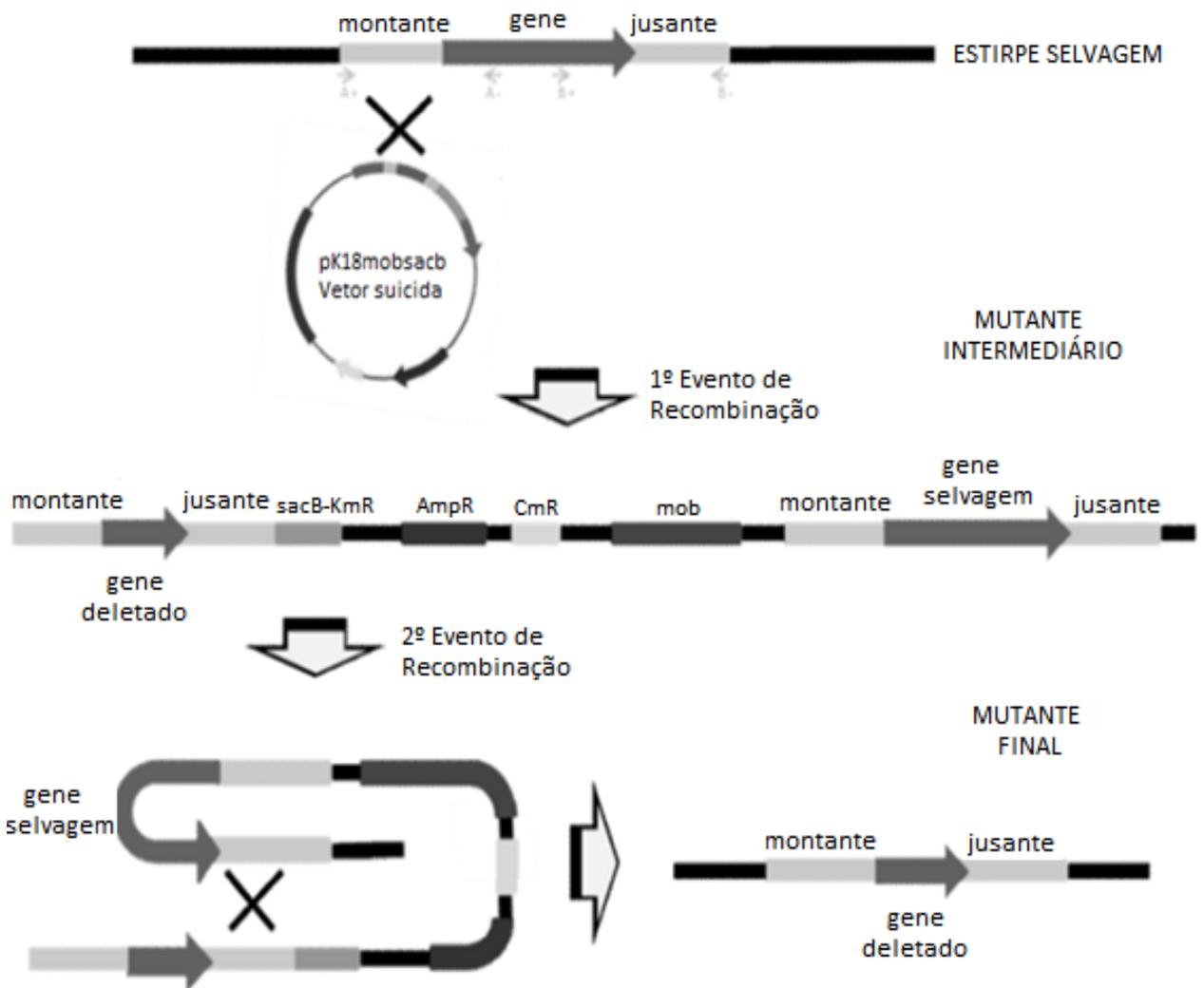


Figura 9. Esquema da estratégia de mutagênese. No “1º Evento Recombinação”, ocorre a integração do vetor suicida (pK18mobsacB) ao genoma de *H. seropedicae*. No “2º Evento Recombinação”, o vetor suicida é eliminado do genoma, permanecendo apenas a cópia do gene deletado (BATISTA, 2011, com modificações).

5. Resultados e Discussão

5.1. Organização estrutural da região dos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* do *Herbaspirillum seropedicae* no genoma e análise *in silico* das proteínas

O gene *Hsero_1880* de *H. seropedicae* SmR1 possui 402 pares de base e 133 aminoácidos e está localizado na posição 2131770..2132171 do genoma. O gene *Hsero_2855* de *H. seropedicae* SmR1 possui 405 pares de base e 134 aminoácidos e está localizado na posição 3248199..3248603 do genoma (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

A organização estrutural dos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* no genoma de *H. seropedicae*, está demonstrada nas figuras 10 e 11, respectivamente.

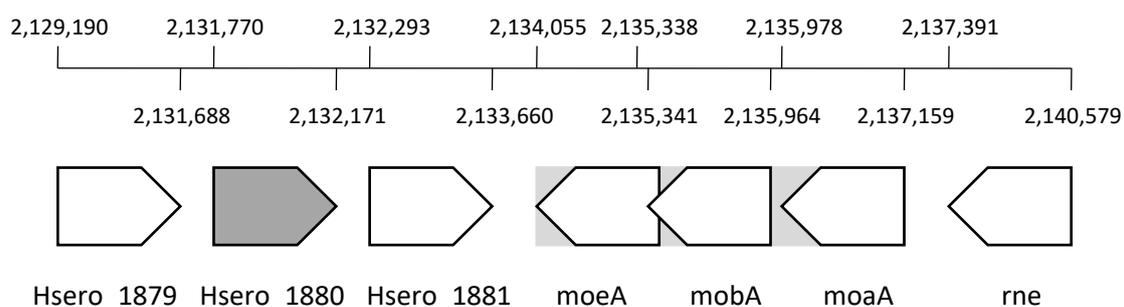


Figura 10. Organização estrutural da região do gene *Hsero_1880* no genoma de *H. seropedicae*. *Hsero_1879*: permease do tipo transportador ABC da biossíntese da lisofosfolipase L1; *Hsero_1880*: provável proteína ligadora de oxigênio; *Hsero_1881*: recombinase RmuC; *moeA*, *mobA* e *moaA*: proteínas da biossíntese do cofator de molibdenio; *rne*: Ribonuclease E; A linha preta indica as distâncias em pares de base entre cada gene no genoma e o sombreado cinza representa possíveis operons.

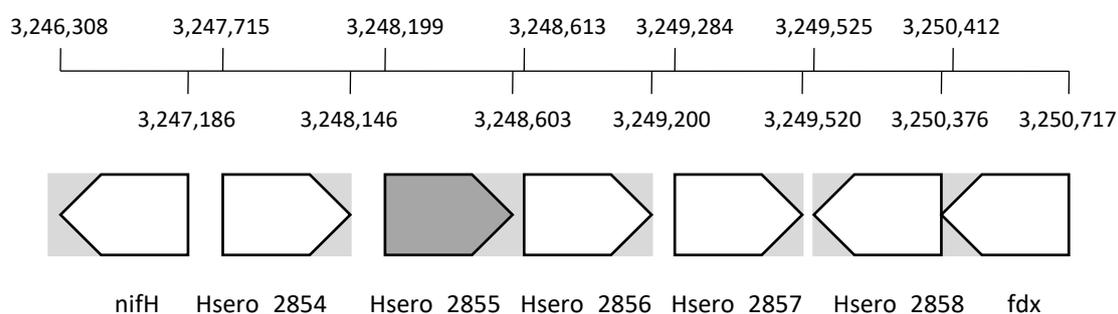


Figura 11. Organização estrutural da região do gene *Hsero_2855* no genoma de *H. seropedicae*. *nifH*: dinitrogenase redutase; *Hsero_2854*: proteína regulatória; *Hsero_2855*: proteína ligadora de oxigênio; *Hsero_2856*, *Hsero_2857* e *Hsero_2858*: proteínas hipotéticas; *fdx*: ferredoxina 2Fe-2S. A linha preta indica as distâncias em pares de base entre cada gene no genoma e o sombreado cinza representa possíveis operons.

O gene *Hsero_2855* encontra-se dentro do cluster *nif* no genoma de *H. seropedicae*. A globina expressa pelo gene *Hsero_2855* pode atuar no fornecimento de oxigênio para produção de energia sob condições de fixação de nitrogênio nos estados de vida livre e endofítica (PEDROSA *et al.*, 2011). Em relação à vizinhança gênica do gene *Hsero_2855*, analisada no banco de dados String, não foi observado conservação entre os genes ao redor dele, porém observou-se que algumas bactérias como *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia xenovorans* e *Polaromonas naphthalenivorans* possuem prováveis globinas próximas a genes que codificam proteínas relacionadas à fixação do nitrogênio (cluster *nif*) (figura 13).

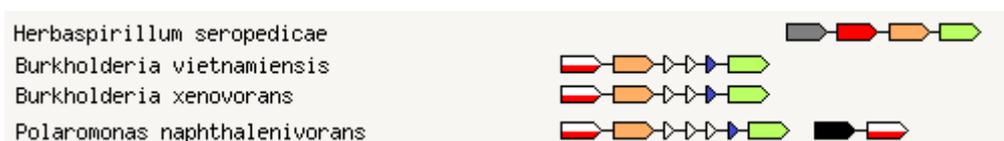


Figura 13. Vizinhança gênica do gene *Hsero_2855* em *H. seropedicae* em relação a genes com funções correspondentes em algumas β -Proteobactérias. Em cinza: gene que codifica uma proteína regulatória de dois componentes. Em laranja e preto: genes que possivelmente codificam uma proteína hipotética; em vermelho ou vermelho e branco: genes que possivelmente codificam uma globina; em verde: genes que codificam uma proteína hipotética ou proteína regulatória. Seta azul: genes que codificam proteínas relacionadas a nitrogenase.

A análise da sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *Hsero_1880* no programa BLAST (STEPHEN *et al.*, 1997), demonstrou alta porcentagem de identidade (acima de 70%) com outras proteínas também classificadas como globinas de diferentes espécies de bactérias do gênero *Herbaspirillum*, *Cupriavidus* e *Burkholderia*, entre outras, conforme demonstrado na tabela 5.

Tabela 5. Porcentagem de identidade da proteína *Hsero_1880* com outras proteínas disponíveis no banco de dados

Descrição	E value	Identidade	Acesso NCBI
oxygen-binding protein [<i>Herbaspirillum seropedicae</i>]	3e-94	100%	WP_013233882.1
MULTISPECIES:hemoglobin-like protein [<i>Herbaspirillum</i>]	1e-93	99%	WP_034339751.1
MULTISPECIES: hemoglobin-like protein [<i>Herbaspirillum</i>]	2e-93	99%	WP_044528317.1
oxygen-binding protein [<i>Herbaspirillum sp.</i> GW103]	4e-93	98%	WP_008327879.1
MULTISPECIES: globin [<i>Herbaspirillum</i>]	4e-93	99%	WP_017450778.1
oxygen-binding protein [<i>Herbaspirillum frisingense</i>]	2e-92	98%	WP_006463550.1
hemoglobin-like protein [<i>Herbaspirillum chlorophenolicum</i>]	6e-86	90%	WP_050466263.1

hemoglobin like protein [<i>Herbaspirillum</i> sp. YR522]	2e-81	88%	WP_008112544.1
hemoglobin-like protein [<i>Herbaspirillum rhizosphaerae</i>]	4e-77	80%	WP_050477196.1
hemoglobin-like protein [<i>Herbaspirillum hiltneri</i>]	1e-75	80%	WP_053197463.1
globin [<i>Herbaspirillum lusitanum</i>]	6e-75	79%	WP_016835013.1
hemoglobin-like protein [<i>Herbaspirillum autotrophicum</i>]	7e-75	77%	WP_050460795.1
hemoglobin-like protein [<i>Herbaspirillum</i> sp. CF444]	9e-75	79%	WP_034379354.1
hemoglobin-like protein [<i>Herbaspirillum</i> sp. RV1423]	6e-71	76%	WP_034297775.1
globin [<i>Herbaspirillum massiliense</i>]	4e-68	75%	WP_019140853.1
hemoglobin [<i>Cupriavidus gilardii</i> CR3]	4e-67	74%	ALD90081.1
hypothetical protein [<i>Burkholderia thailandensis</i>]	2e-66	73%	WP_009892241.1
protozoan/cyanobacterial globin family protein [<i>Burkholderia thailandensis</i> E264]	4e-66	73%	ABC36858.1
cyanoglobin [<i>Paraburkholderia bannensis</i>]	5e-66	73%	WP_027819606.1
MULTISPECIES: globin [<i>Burkholderia cepacia</i> complex]	8e-66	73%	WP_006488211.1
cyanoglobin [<i>Burkholderia</i> sp. TSV86]	9e-66	72%	WP_059569279.1
cyanoglobin [<i>Paraburkholderia kururiensis</i>]	9e-66	71%	WP_042301900.1
hemoglobin like protein [<i>Herbaspirillum</i> sp. CF444]	1e-65	80%	EJL92237.1
MULTISPECIES: protozoan/cyanoglobin [<i>Burkholderia</i>]	2e-65	73%	WP_006478237.1
cyanoglobin [<i>Burkholderia megalochromosomata</i>]	2e-65	71%	WP_062252740.1
MULTISPECIES: cyanoglobin [<i>Burkholderia cepacia</i> complex]	2e-65	72%	WP_034207992.1
cyanoglobin [<i>Paraburkholderia tropica</i>]	2e-65	72%	WP_065064526.1
cyanoglobin [<i>Burkholderia cepacia</i>]	2e-65	73%	WP_027785011.1
cyanoglobin [<i>Burkholderia</i> sp. TSV85]	2e-65	72%	WP_059513128.1
cyanoglobin [<i>Burkholderia cepacia</i>]	3e-65	72%	WP_043188898.1
cyanoglobin [<i>Paraburkholderia grimmiae</i>]	3e-65	71%	WP_035959474.1
hypothetical protein [<i>Burkholderia oklahomensis</i>]	3e-65	72%	WP_010102468.1
cyanoglobin [<i>Burkholderia</i> sp. USM B20]	4e-65	72%	WP_044844686.1
MULTISPECIES: cyanoglobin [<i>pseudomallei</i> group]	4e-65	72%	WP_059934751.1
cyanoglobin [<i>Burkholderia multivorans</i>]	4e-65	72%	WP_048805914.1
hypothetical protein [<i>Burkholderia mallei</i>]	4e-65	72%	WP_011204056.1
globin [<i>Burkholderia pseudomallei</i>]	4e-65	72%	WP_004535495.1
MULTISPECIES: globin [<i>Burkholderia cepacia</i> complex]	5e-65	72%	WP_017331548.1
Bacterial-like globin [<i>Janthinobacterium lividum</i>]	5e-65	70%	EZP37824.1
oxygen-binding protein [<i>Janthinobacterium lividum</i>]	2e-64	69%	WP_010400839.1
cyanoglobin [<i>Burkholderia pseudomultivorans</i>]	2e-64	72%	WP_060240822.1
cyanoglobin [<i>Burkholderia anthina</i>]	2e-64	72%	WP_059583648.1
cyanoglobin [<i>Burkholderia ubonensis</i>]	2e-64	72%	WP_059811248.1
globin [<i>Burkholderia ubonensis</i>]	2e-64	71%	WP_010091159.1
cyanoglobin [<i>Burkholderia ubonensis</i>]	3e-64	72%	WP_060008314.1
cyanoglobin [<i>Paraburkholderia acidipaludis</i>]	3e-64	71%	WP_027795496.1
MULTISPECIES: cyanoglobin [<i>Burkholderia cepacia</i> complex]	3e-64	71%	WP_047898635.1

cyanogloblin [<i>Burkholderia</i> sp. BDU8]	3e-64	71%	WP_066484461.1
globin [<i>Burkholderia ambifaria</i>]	4e-64	72%	WP_006754237.1
cyanogloblin [<i>Burkholderia territorii</i>]	4e-64	71%	WP_059448709.1
hemogloblin-like protein [<i>Cupriavidus nantongensis</i>]	4e-64	68%	WP_062797716.1
globin-like protein [<i>Burkholderia lata</i>]	4e-64	72%	WP_011352727.1
cyanogloblin [<i>Burkholderia fortuita</i>]	4e-64	69%	WP_061136194.1
cyanogloblin [<i>Burkholderia</i> sp. MR1]	4e-64	72%	WP_040051495.1
hemogloblin-like protein [<i>Janthinobacterium lividum</i>]	5e-64	69%	WP_034785429.1

A análise da sequência de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *Hsero_2855* no programa BLAST (STEPHEN *et al.*, 1997), demonstrou alta porcentagem de identidade (acima de 90%) com proteínas descritas como globinas em diferentes espécies do gênero *Herbaspirillum*. As demais proteínas identificadas também como globinas, de diferentes espécies de bactérias, apresentaram identidade menor que 70%, conforme demonstrado na tabela 6. Foi observado que a globina, semelhante a *Hsero_2855*, de *Herbaspirillum frisingense* GSF30 (90% de identidade) encontra-se dentro do cluster *nif* (STRAUB *et al.*, 2013), assim como a globina da bactéria *Methyloglobulus morosus* KoM1 (65% de identidade) (POEHLEIN *et al.*, 2013).

Tabela 6. Porcentagem de identidade da proteína *Hsero_2855* com outras proteínas disponíveis no banco de dados do NCBI.

Descrição	E value	Identidade	Acesso NCBI
oxygen-binding protein [<i>Herbaspirillum seropedicae</i>]	2e-93	100%	WP_013234822.1
globin [<i>Herbaspirillum</i> sp. B65]	2e-93	99%	WP_044528038.1
MULTISPECIES: globin [<i>Herbaspirillum</i>]	1e-92	99%	WP_017453289.1
globin [<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>]	4e-91	96%	WP_058895558.1
globin [<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>]	9e-91	96%	WP_061789577.1
globin [<i>Herbaspirillum frisingense</i>]	9e-83	90%	WP_051110898.1
oxygen-binding protein [<i>Herbaspirillum frisingense</i> GSF30]	1e-82	90%	EOA05110.1
hypothetical protein [<i>Methylocaldum szegediense</i>]	8e-59	69%	WP_026610011.1
hypothetical protein [<i>Methylococcaceae bacterium</i> 73a]	1e-56	62%	WP_045226864.1
hemogloblin [uncultured prokaryote]	5e-56	69%	AGE14120.1
oxygen-binding protein [<i>Methyloglobulus morosus</i> KoM1]	2e-55	65%	ESS73519.1
globin [<i>Methyloglobulus morosus</i>]	2e-55	65%	WP_036306654.1
oxygen-binding protein [<i>Burkholderiales bacterium</i> GJ-E10]	6e-55	65%	BAP89800.1
hypothetical protein [<i>Burkholderiales bacterium</i> GJ-E10]	1e-54	68%	WP_045473137.1
hypothetical protein [<i>Azoarcus toluclasticus</i>]	9e-50	61%	WP_018987770.1
hypothetical protein Tel_15360 [<i>Candidatus Tenderia electrophaga</i>]	2e-49	63%	ALP54413.1
hypothetical protein [<i>Ferrofum</i> sp. Z-31]	4e-48	58%	WP_062188247.1

MULTISPECIES: hemoglobin-like protein [<i>Chromobacterium</i>]	2e-47	63%	WP_043576746.1
hemoglobin-like protein [<i>Chromobacterium haemolyticum</i>]	8e-47	62%	WP_043592792.1
hemoglobin-like protein [<i>Chromobacterium piscinae</i>]	1e-46	62%	WP_043629037.1
hemoglobin-like protein [<i>Chromobacterium sp. C-61</i>]	1e-46	62%	WP_039755742.1
conserved globin-like protein [<i>Azoarcus sp. KH32C</i>]	3e-46	61%	WP_015437656.1
hemoglobin-like protein [<i>Chromobacterium sp. LK1</i>]	5e-46	62%	WP_048409334.1
hemoglobin-like protein [<i>Chromobacterium sp. LK11</i>]	6e-46	62%	WP_048415717.1
hemoglobin-like protein [<i>Paludibacterium yongneupense</i>]	1e-45	61%	WP_036666066.1
hemoglobin-like protein [<i>Chromobacterium haemolyticum</i>]	2e-45	61%	WP_043632769.1
hypothetical protein [<i>Thioalkalivibrio sulfidiphilus</i>]	3e-45	57%	WP_012639678.1
globin [<i>Pseudogulbenkiania sp. NH8B</i>]	5e-45	57%	WP_014085987.1
globin [<i>Sideroxydans lithotrophicus</i>]	5e-45	57%	WP_013029396.1
globin [<i>Pseudogulbenkiania ferrooxidans</i> EGD-HP2]	6e-45	60%	ERE20000.1
hemoglobin-like protein [<i>Pseudogulbenkiania ferrooxidans</i>]	7e-45	60%	WP_043147978.1
hemoglobin-like protein [<i>Chromobacterium vaccinii</i>]	8e-45	60%	WP_046166468.1
hypothetical protein [<i>Leeia oryzae</i>]	8e-45	58%	WP_018150017.1
hemoglobin-like protein [<i>Chromobacterium violaceum</i>]	9e-45	60%	WP_043615846.1
hemoglobin-like protein [<i>Chromobacterium violaceum</i>]	1e-44	60%	WP_048404768.1
globin [<i>Pseudogulbenkiania ferrooxidans</i>]	2e-44	56%	WP_008953413.1
hemoglobin-like protein [<i>Aquitalea magnusonii</i>]	2e-44	58%	WP_059284606.1

As análises de coexpressão do banco de dados String demonstraram que existe uma correlação de expressão entre as globinas (Hsero_1880 e Hsero_2855) e a proteína NO-dioxigenase (Hsero_2508) em *H. seropedicae*. Essa mesma correlação foi demonstrada entre proteínas que desempenham função semelhante em *Campilobacter jejuni* (ÁVILA-RAMIREZ *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2011) e *Arabidopsis thaliana* (MUR, *et al.*, 2012). Este fato pode estar relacionado com uma das funções que as globinas oxigenadas podem exercer: detoxificação de NO via atividade da NO-deoxigenase (BORROTO; SÁNCHEZ; PETER, 2015). No entanto são necessários dados experimentais para confirmar a coexpressão entre as globinas Hsero_1880, Hsero_2855 e a proteína NO-dioxigenase (Hsero_2508) em *H. seropedicae*.

As proteínas expressas pelos genes *Hsero_1880* e *_Hsero_2855* pertencem ao grupo II das hemoglobinas truncadas, conforme descrito por Oliveira (2014). O alinhamento entre as sequências de aminoácidos das globinas Hsero_2855 e Hsero_1880 de *H. seropedicae* apresentou 47% de identidade e 68% de similaridade.

O alinhamento das sequências de aminoácidos de Hsero_1880 e Hsero_2855 com membros da família TrHbII cujas estruturas cristalinas estão disponíveis: *Thermobifida fusca* (2BMM) (MOREA;BOFFI, 2005), *Bacillus subtilis* (1UX8) (GIANGIACOMO *et al.*, 2005), *Geobacillus stearothermophilus* (2BKM) (ILARI *et ai*, 2007), *Agrobacterium*

tumefaciens (2XYK) (PESCE *et al.*, 2011) e *Arabidopsis thaliana* (4CON) (REEDER; HOUGH,2014), demonstrou a conservação de resíduos característicos das regiões importantes para ligação do grupamento heme das globinas truncadas do grupo II (GIORDANO *et al.*,2015.) (Figura 14).

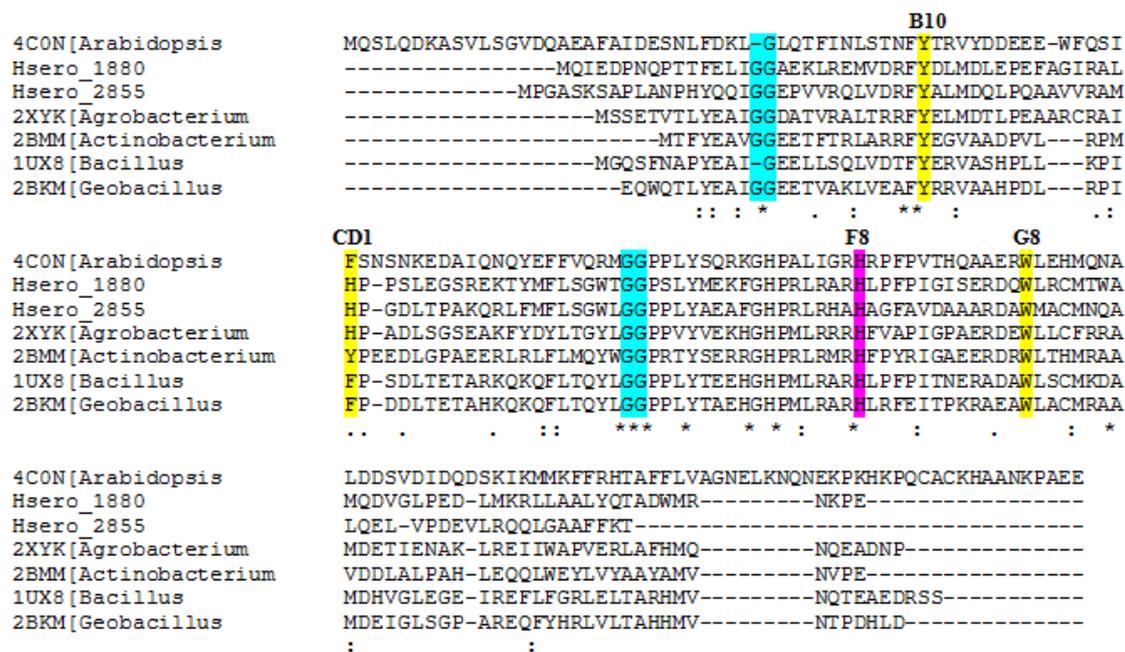


Figura 14. Alinhamento das seqüências de aminoácidos de Hsero_1880 e Hsero_2855 com membros da família TrHbII. Resíduos específicos para TrHbII (B10, CD1 e G8) estão em amarelo; HisF8, conservada na superfamília de globina, está em rosa; os motivos Gly-Gly então azul.

5.2. Obtenção dos plasmídeos mutagênicos *H. seropedicae* nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855*.

Para a obtenção das construções contendo o gene *Hsero_1880* com uma deleção central de 354 pares de bases, e o gene *Hsero_2855* com uma deleção central de 369 pares de bases, foram realizadas amplificações por reação de PCR das regiões a montante e a jusante de cada gene.

As regiões a montante e a jusante do gene *Hsero_1880* continham 518 e 634 pares de base respectivamente e, as regiões a montante e a jusante do gene *Hsero_2855* continham 652 e 612 pares de base, respectivamente.

Cada inserto amplificado foi ligado separadamente no vetor pTZ57R/T (vetor TA) (FERMENTAS) dando origem aos plasmídeos pTZ1880A, pTZ1880B (figura 15), pTZ2855A e pTZ2855B (figura 16).

As ligações resultantes foram transformadas por choque térmico em *E.coli* TOP10, conforme descrito no item 4.11.2 (CHUNG; NIEMELA; MILLER, 1989).

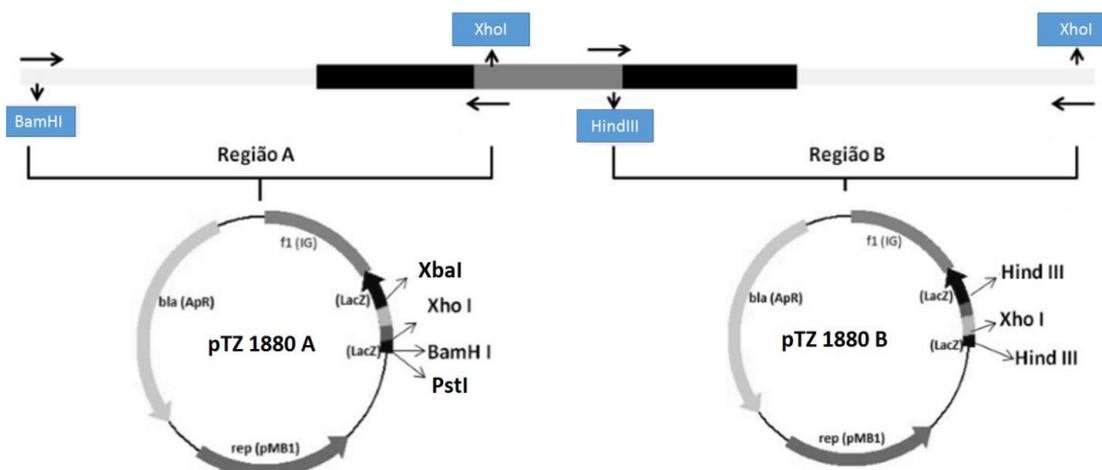


Figura 15. Esquema geral da região do gene *Hsero_1880* utilizada para a construção dos plasmídeos contendo deleção neste gene. As setas representam os oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação dos fragmentos indicados, com os sítios de restrição inseridos em tais oligonucleotídeos. As regiões codificadoras do gene estão em preto e em cinza escuro, sendo a região em cinza escuro correspondente à região central a ser deletada. A região a montante e também a jusante da região codificadora do gene está em cinza claro. Os sítios de restrição de interesse estão indicados no vetor e nos fragmentos.

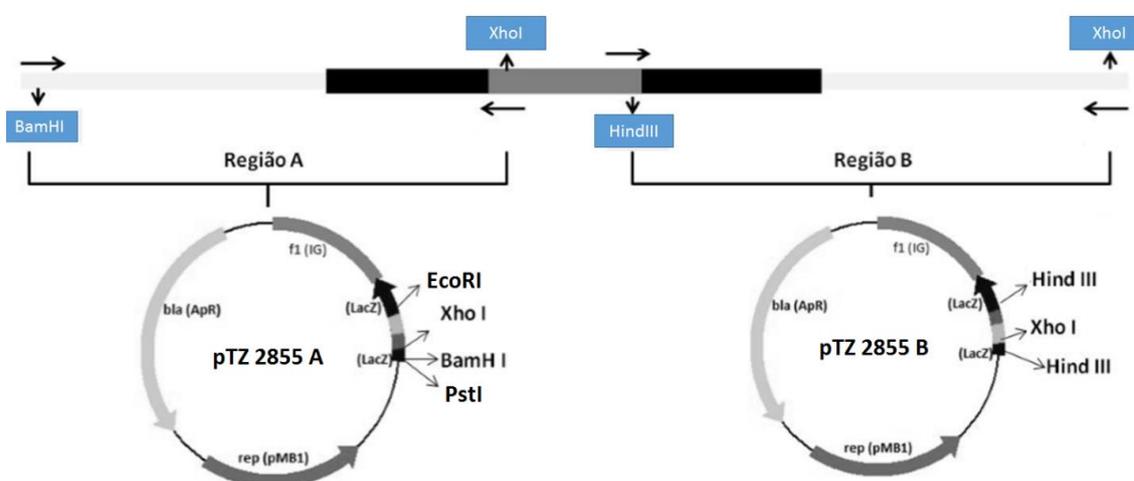


Figura 16. Esquema geral da região do gene *Hsero_2855* utilizada para a construção dos plasmídeos contendo deleção neste gene. As setas representam os oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação dos fragmentos indicados, com os sítios de restrição inseridos em tais oligonucleotídeos. As regiões codificadoras do gene estão em preto e em cinza escuro, sendo a região em cinza escuro correspondente à região central a ser deletada. A região a montante e também a jusante da região codificadora do gene está em cinza claro. Os sítios de restrição de interesse estão indicados no vetor e nos fragmentos.

Para confirmar a clonagem e orientação dos insertos nos plasmídeos pTZ1880A, pTZ1880B, pTZ2855A e pTZ2855B após a análise do mapa do plasmídeo pTZ57R/T e

dos sítios de restrição de cada inserto, foi realizada restrição com as enzimas: XbaI e PstI (pTZ1880A), Hind III (pTZ1880B); EcoRI e PstI (pTZ2855A) e HindIII (pTZ2855B). Os sítios de restrição para essas enzimas estavam presentes tanto no vetor (pTZ57R) quanto no inserto (Figura 15 e 16).

Após a confirmação de cada clone, foi feita subclonagem para a união dos fragmentos à montante (A) e à jusante (B) de cada gene de forma a obter uma construção com os genes de interesse deletados. Portanto, foi realizada a restrição com as enzimas BamHI e XhoI do pTZ1880A, que libera o fragmento A, e pTZ1880B, que não libera o fragmento B e, foi realizada a restrição com as enzimas EcoRI e XhoI do pTZ2855A, que libera fragmento A, e pTZ2855B, que não libera o fragmento. Foi feita eletroforese em gel de agarose 1% e as bandas foram recuperadas utilizando suspensão de sílica.

Em seguida, foi realizada a ligação entre o fragmento 1880A e vetor pTZ1880B e entre o fragmento 2855A e o vetor pTZ2855B em reação com enzima T4 DNA ligase, dando origem aos plasmídeos pTZ1880AB(del) e pTZ2855AB(del) (Figura 17). A ligação resultante foi transformada por choque térmico em *E.coli* TOP10.

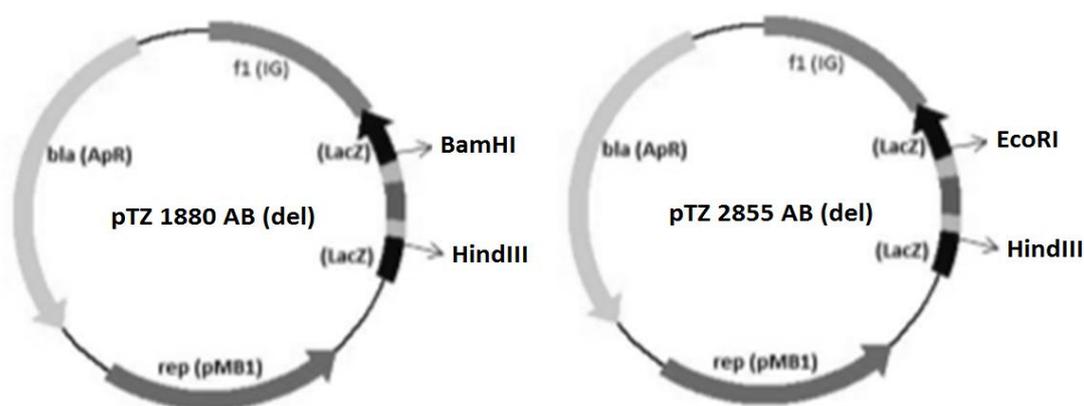


Figura 17. Esquema da estratégia utilizada para obtenção dos vetores contendo os genes *Hsero_1880* (pTZ1880AB del) e *Hsero_2855* (pTZ2855AB del) deletados. Os sítios de restrição de interesse estão indicados no vetor e nos fragmentos.

Para confirmar a subclonagem foi realizada restrições para liberar o fragmento ligado, o fragmento A e o fragmento B de cada gene conforme figuras 18 e 19.

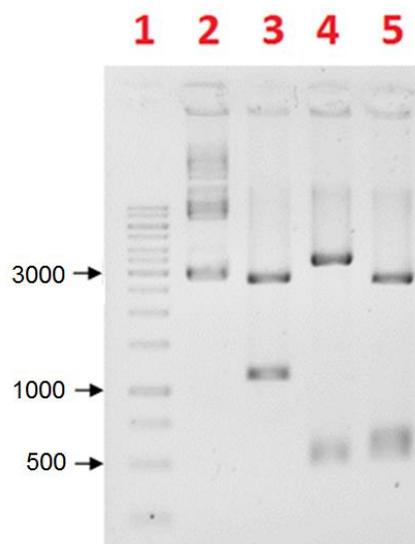


Figura 18. Análise de restrição do pTZ1880AB del. Legenda: 1. Marcador 1 Kb DNA Ladder; 2. Plasmídeo pTZ1880_AB fechado; 3. Restrição com BamHI e HindIII: libera fragmento A+B = 1152 pb; 4. Restrição com BamHI e XhoI: libera fragmento A = 518 pb; 5. Restrição com XhoI e HindIII: libera fragmento B = 634 pb.

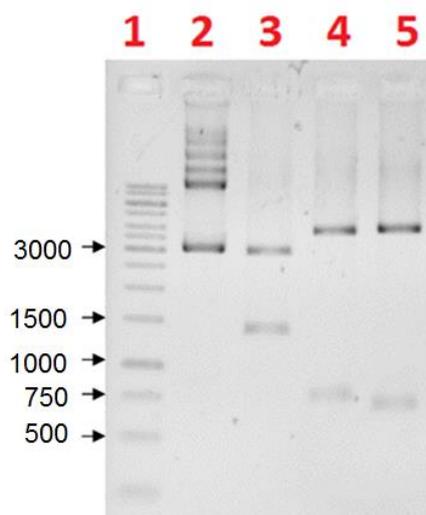


Figura 19. Análise de Restrição do pTZ2855AB del. Legenda: 1. Marcador 1Kb DNA Ladder; 2. Plasmídeo pTZ57R/THsero2855_AB fechado; 3. Restrição com EcoRI e HindIII: libera fragmento A+B = 1264 pb; 4. Restrição com EcoRI e XhoI: libera fragmento A = 652 pb; 5. Restrição com XhoI e HindIII: libera fragmento B = 612 pb.

Após o sequenciamento dos plasmídeos pTZ1880AB(del) e pTZ2855AB(del), para verificação da integridade de seus insertos, tais plasmídeos foram utilizados para a transferência da cópia deletada dos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855*, para o vetor suicida pk18mobsacB. O fragmento BamHI e HindIII proveniente do plasmídeo pTZ1880AB(del) e os fragmentos EcoRI e HindIII proveniente do plasmídeo

pTZ2855AB(del) foram subclonados no vetor pK18mobsacB, linearizado com as mesmas enzimas. Assim obteve-se os plasmídeos pK1880 e o pK2855.

A confirmação dos plasmídeos contendo as cópias dos genes deletadas, foi realizada através da análise de restrição do pK1880 com as enzimas BamHI e HindIII e do pK2588 com as enzimas EcoRI e HindIII, representada na figura 17. Os perfis de restrição dos plasmídeos pK1880 e pK2855, mostraram um padrão de duas bandas, sendo a de maior peso molecular equivalente ao vetor e a segunda, de menor peso molecular, equivalente aos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* deletados mais as regiões a montante e jusante, respectivamente, incluídas no plasmídeo (Figura 20).

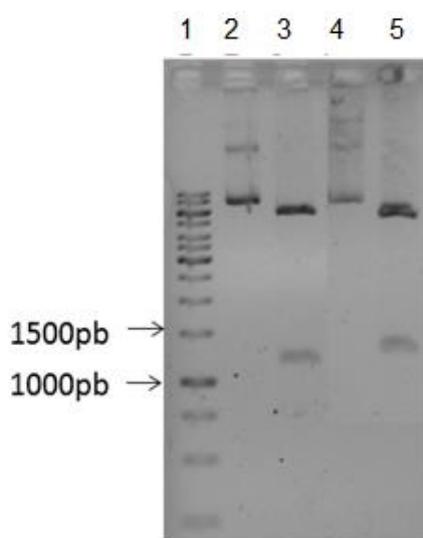


Figura 20. Análise de restrição do pk18/*Hsero_1880*AB e pk18/*Hsero_2855*AB. Construções para a deleção do gene clonadas no vetor suicida pk18mobsacB. Legenda: 1: Marcador; 2: pK18-1880 fechado; 3: Restrição (1880) com BamHI e HindIII: libera fragmento A+B = 1152 pb; 4: pk18-2855 fechado; 5: Restrição (2855) com EcoRI e HindIII: libera fragmento A+B = 1264 pb

Os plasmídeos pK1880 e pK2855 foram transferidos para *H. seropedicae* por conjugação para a construção das estirpes mutantes nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855*.

5.3. Construção das estirpes mutantes de *H. seropedicae* nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855*

Para a obtenção das estirpes mutantes nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855*, os plasmídeos mutagênicos pK1880 e pK2855 foram transformados na estirpe S17.1 de *E.*

coli, como descrito no item 4.11. Após a transformação uma colônia isolada foi usada para a conjugação com a estirpe SmR1 de *H. seropedicae*, como descrito no item 4.12.

Os transconjugantes resistentes a canamicina 500 µg/mL, foram analisados quanto à ocorrência da recombinação homóloga simples (inserção do vetor suicida ao genoma de *H. seropedicae*) através de uma reação de PCR. A eletroforese dos produtos de PCR mostrou dois fragmentos, um referente à cópia selvagem do gene e outro referente a cópia deletada do gene. Após esta confirmação, no mínimo três colônias transconjugantes para o primeiro evento de recombinação, ou seja, simples recombinantes, foram individualmente inoculadas em meio Nfb-MalatoHPN líquido sem adição de antibióticos e incubado a 30°C e 120 rpm durante a noite.

Após este período de incubação, 100 a 200 µL da cultura saturada foram plaqueados em meio Nfb-MalatoLPN contendo 10% de sacarose e estreptomicina na concentração de 80 µg/mL. Após incubação por aproximadamente 48 horas a 30°C, foram isolados transconjugantes nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* que sofreram o segundo evento de recombinação, ou seja, os que eliminaram as sequências referentes ao vetor suicida integrado ao genoma no primeiro evento de recombinação. Para confirmação de tal evento, as colônias isoladas obtidas foram submetidas à seleção quanto à sensibilidade ao antibiótico canamicina 500 µg/mL, e em seguida 10 a 200 colônias isoladas sensíveis a esse antibiótico foram analisadas por PCR, para a confirmação da ocorrência da deleção dos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* nos possíveis transconjugantes duplos recombinantes isolados.

Para a confirmação das estirpes mutantes nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* foram utilizados os pares de oligonucleotídeos listados na tabela 4 (Item 4.5). O resultado das reações de PCR, confirmando a obtenção das estirpes mutantes nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* está apresentado a seguir na figura 21.

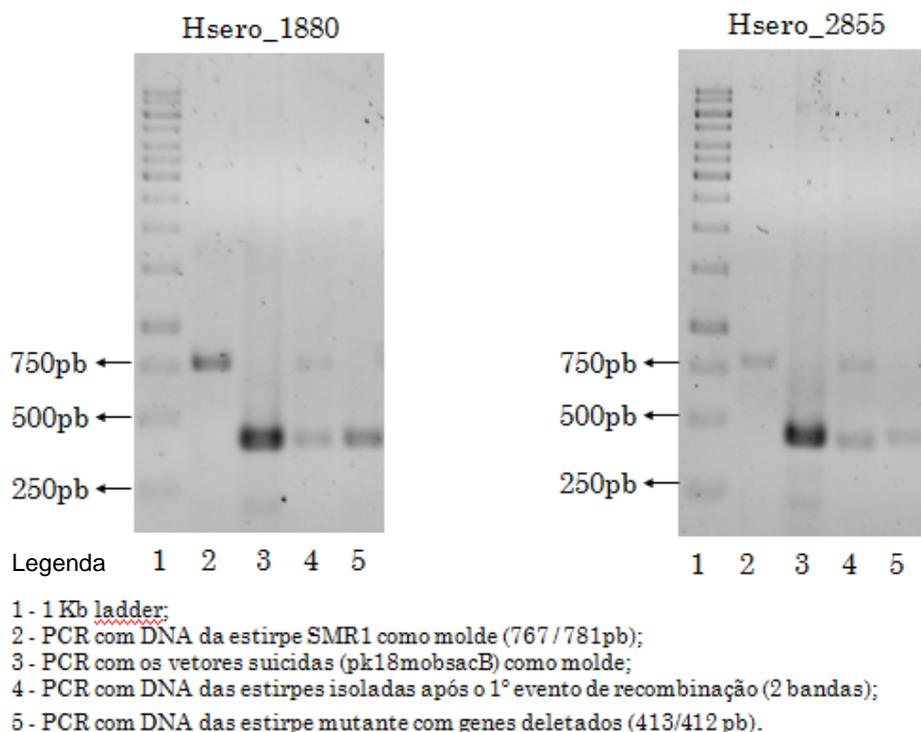


Figura 21. Confirmação das estirpes mutantes para os genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855*.

5.4. Validação das estirpes mutantes *H. seropedicae* nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855*

Para validação das estirpes mutantes de *H. seropedicae* nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* foram realizadas diluições seriadas das culturas (10^{-5} a 10^{-8}) das estirpes de *H. seropedicae* SmR1 selvagem, *H. seropedicae* contendo vetor suicida pK18mobsacB (pK1880 e pK2855) e *H. seropedicae* SmR1 com a deleção nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* (sem o plasmídeo pK18mobsacB), as quais foram testadas nas seguintes condições de crescimento:

- Meio NFb-MalatoHPN + Sm80;
- Meio NFb-MalatoHPN + Sm80 + Km500;
- Meio NFb-MalatoHPN + Sm80 + Sacarose 10%;
- Meio NFb-MalatoHPN + Sm80 + Km500 + Sacarose 10%.

As diluições das culturas foram aplicadas na forma de gotas nas placas contendo os meios citados e foram incubadas a uma temperatura de 30°C por 48 horas. Esse teste permite verificar a integração do vetor pK18mobsacB ao DNA cromossomal (1º evento de recombinação) e também observar se houve seleção negativa das estirpes quando

cultivadas em sacarose, onde ocorre a eliminação do vetor suicida e a bactéria perde o vetor ficando apenas com a mutação de deleção nos genes em estudo (2º evento de recombinação).

Conforme esperado, as estirpes de *H. seropedicae* SmR1 contendo vetor suicida pK18mobsacB (pK1880 e pK2855) cresceram nos meios Nfb-MalatoHPN contendo Sm80 e Km500, pois o *H. seropedicae* SmR1 possui resistência ao antibiótico Sm e o plasmídeo pK18mobsacB confere resistência ao Km. As estirpes pK1880 e pK2855 não cresceram nos meios Nfb-MalatoHPN contendo sacarose, pois nessa condição ocorre expressão do gene *sacB* presente no vetor pK18mobsacB, resultando na lise da célula bacteriana.

As estirpes de *H. seropedicae* SmR1 selvagem e *H. seropedicae* SmR1 com a deleção nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* (sem o plasmídeo pK18mobsacB) cresceram nos meios Nfb-MalatoHPN contendo Sm80 e Sacarose 10%, indicando a ausência do plasmídeo pK18mobsacB e confirmando o segundo evento de recombinação. As estirpes selvagens e com os genes de interesse deletados não cresceram nos meios Nfb-MalatoHPN contendo Km500, pois não possuem o vetor pK18mobsacB que confere essa resistência.

Esses testes de crescimento bacteriano em diferentes condições de cultura confirmaram a construção dos mutantes com deleções nos genes de interesse e estão demonstrados nas figuras 22, 23, 24 e 25.

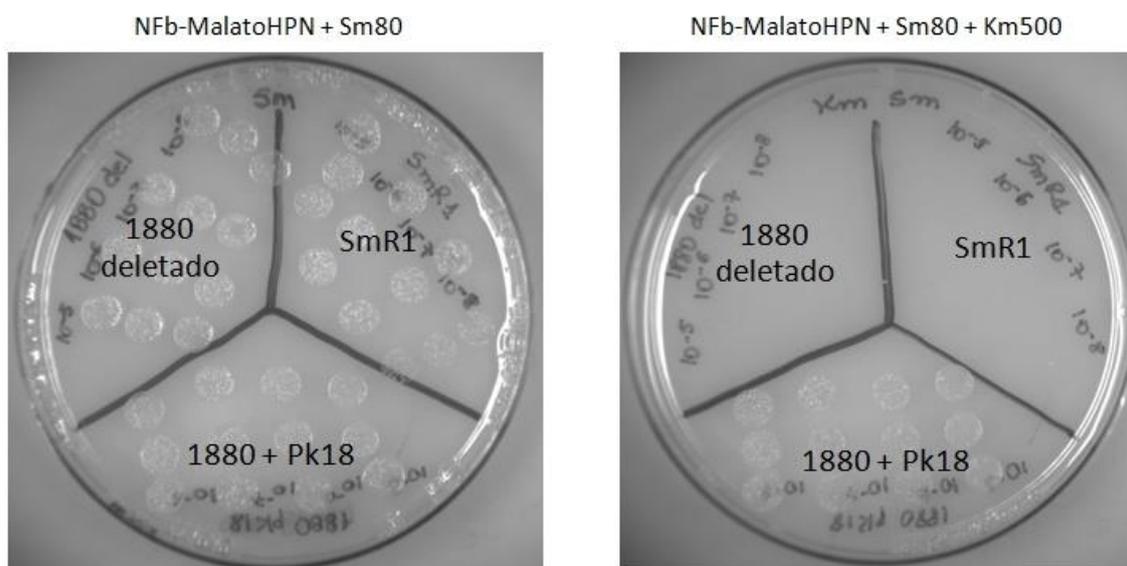
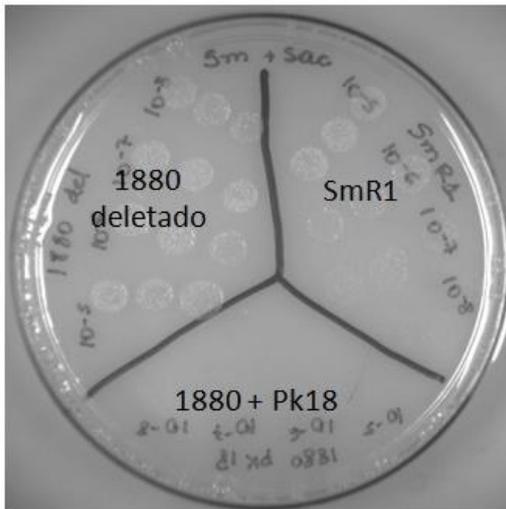


Figura 22. Validação das estirpes de *H. seropedicae* SmR1 selvagem, *H. seropedicae* com deleção no gene *Hsero_1880*, *H. seropedicae* contendo vetor suicida pK18mobsacB (pK1880) nos meios Nfb-MalatoHPN+Sm80 e Nfb-MalatoHPN+Sm80+Km500.

NFb-MalatoHPN + Sm80 + Sacarose



NFb-MalatoHPN + Sm80+ Km 500 + Sacarose

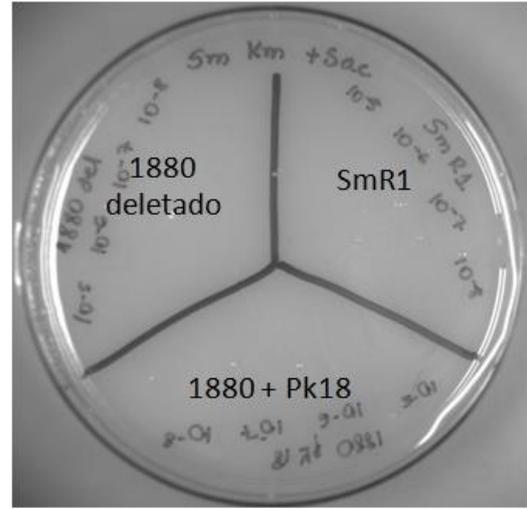
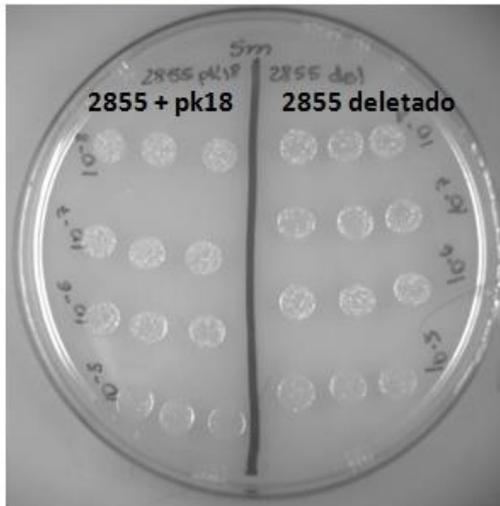


Figura 23. Validação das estirpes de *H. seropedicae* SmR1 selvagem, *H. seropedicae* com deleção no gene *Hsero_1880*, *H. seropedicae* contendo vetor suicida pK18mobsacB (pk1880) nos meios Nfb-MalatoHPN+Sm80+sacarose e Nfb-MalatoHPN+Sm80+Km500+sacarose.

NFb-MalatoHPN + Sm80



NFb-MalatoHPN + Sm80 + Km500

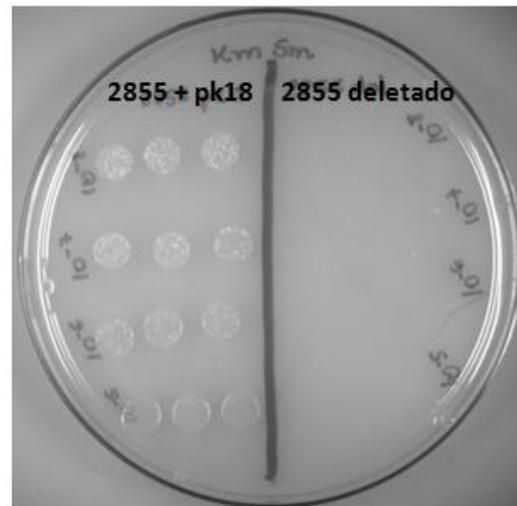


Figura 24. Validação das estirpes de *H. seropedicae* SmR1 com deleção no gene *Hsero_2855*, *H. seropedicae* contendo vetor suicida pK18mobsacB (pK2855) nos meios Nfb-MalatoHPN+Sm80 e Nfb-MalatoHPN+Sm80+Km500.

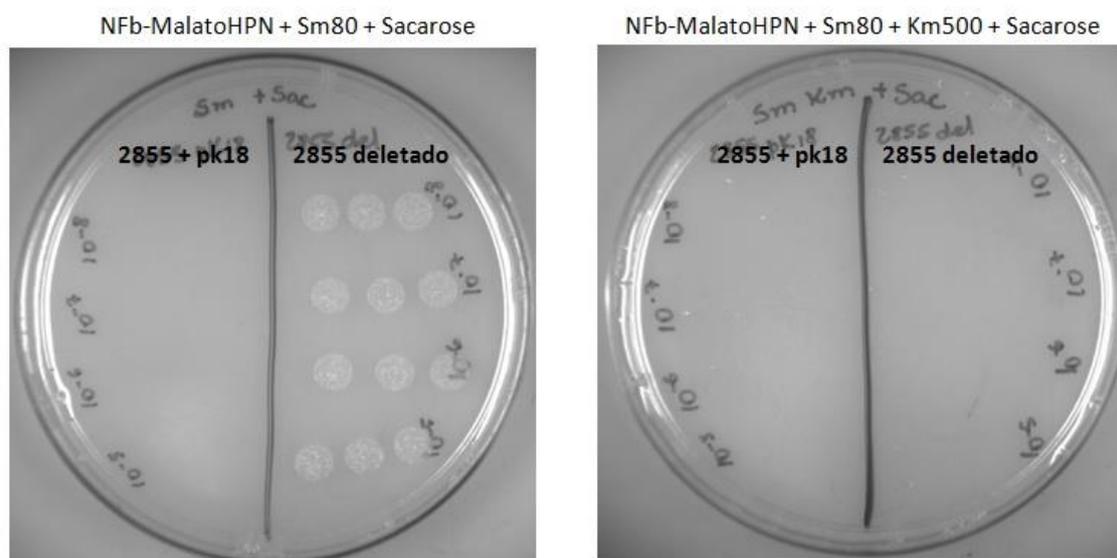


Figura 25. Validação das estirpes de *H. seropedicae* SmR1 com deleção no gene *Hsero_2855*, *H. seropedicae* contendo vetor suicida pK18mobsacB (pK2855) nos meios Nfb-MalatoHPN+Sm80+sacarose e Nfb-MalatoHPN+Sm80+Km500+sacarose.

Após confirmação das estirpes mutantes com deleção nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855*, receberam o nome de TFL1880 e TFL2855 respectivamente.

5.5. Caracterização fisiológica das estirpes mutantes para os genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* de *H. seropedicae*

5.5.1. Perfil de crescimento das estirpes mutantes TFL1880 e TFL2855

Visando a caracterização das estirpes com os genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* deletados, os perfis de crescimento das estirpes mutantes TFL1880 e TFL2855 de *H. seropedicae* foram obtidos e comparados com a estirpe SMR1 selvagem.

Na figura 26 estão demonstrados os perfis de crescimento em 20mM de NH_4Cl em meio Nfb-MalatoHPN das estirpes selvagem e mutantes TFL1880 e TFL2855. Na tabela estão demonstrados os coeficientes de crescimento e o tempo de duplicação ou geração em minutos, calculados conforme item 4.14.

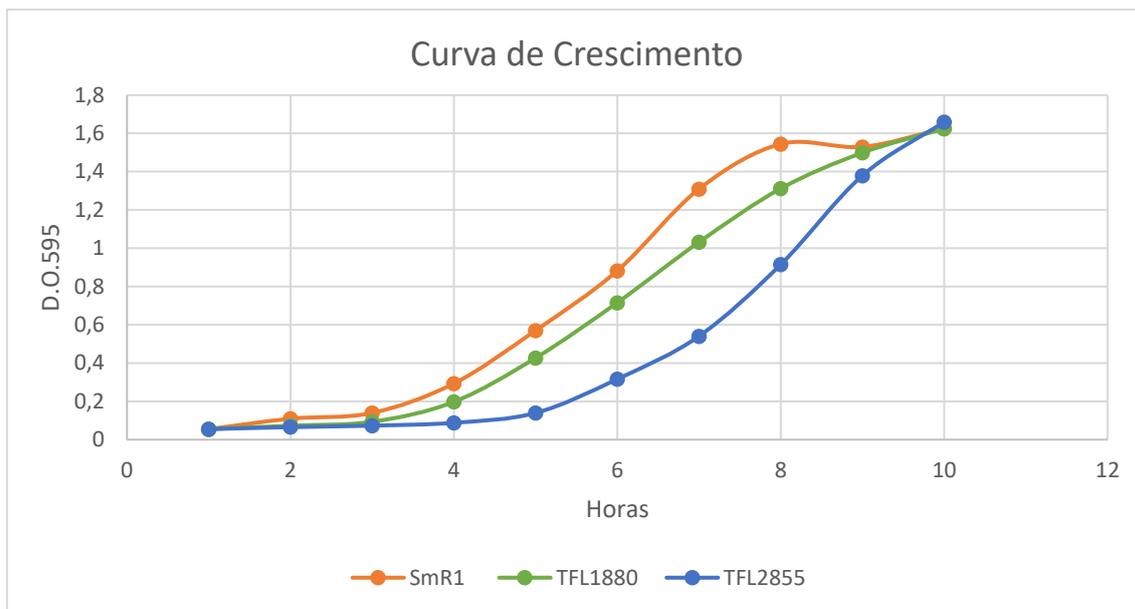


Figura 26. Perfil de crescimento das estirpes de *H. seropedicae* mutantes nos genes *Hsero_1880* (TFL1880) e *Hsero_2855* (TFL2855) em comparação com a estirpe *H. seropedicae* SMR1 selvagem. O crescimento das culturas foi acompanhado através da determinação da densidade ótica, a um comprimento de onda de 595nm, das culturas durante o tempo. A D.O.₅₉₅ para o início do ensaio era de 0,1, aproximadamente. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

Tabela 7. Tempo de duplicação das estirpes de *H. seropedicae* SMR1 e dos mutantes TFL1880 e TFL2855

Tempo de duplicação em minutos		
SmR1	TFL1880	TFL2855
22,794	24,09	24,012

Os resultados demonstrados na figura 26 e na tabela 7 sugerem que os produtos dos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* não alteram o perfil de crescimento da estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1, uma vez que o tempo de duplicação das estirpes mutantes em comparação com a estirpe selvagem é semelhante. O mesmo ocorre quando o produto do gene *Hsero_2872* (globina truncada do grupo II) está ausente, o qual também não altera o crescimento da estirpe selvagem, como demonstrado nas análises de Novello (2012).

5.5.2. Determinação da atividade de nitrogenase das estirpes mutantes de *H. seropedicae* nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* de *H. seropedicae*

Para verificar se as mutações nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* afetariam a fixação biológica de nitrogênio, a atividade de nitrogenase das estirpes TFL1880 e TFL2855 de *H. seropedicae* foi determinada e comparada com a estirpe parental SmR1.

A figura 27 mostra atividade da enzima nitrogenase determinada em 24 e 48 horas. A estirpe mutante no gene *Hsero_1880* apresentou atividade de nitrogenase cerca de 50% menor que a atividade da estirpe selvagem em 24 horas. A estirpe mutante no gene *Hsero_2855* apresentou atividade de nitrogenase cerca de 70% menor que a atividade da estirpe selvagem em 24 horas. Após 48 horas, houve um reestabelecimento significativo da atividade da nitrogenase da estirpe mutante *Hsero_2855* em comparação com a estirpe selvagem SmR1.

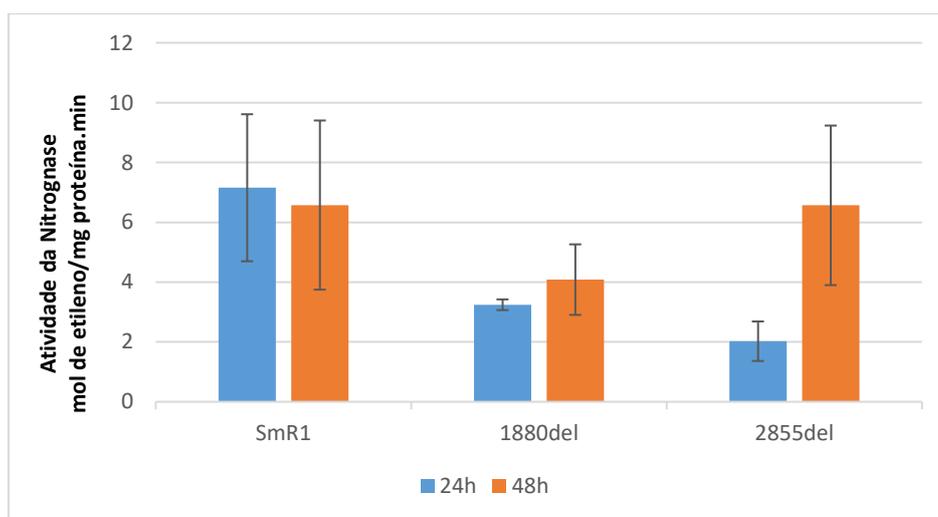


Figura 27. Atividade da nitrogenase do *H. seropedicae* SmR1 e das estirpes mutantes TFL1880 (1880del) e TFL2855 (2855del). Ensaio realizado em meio semissólido NFbHP-malato com 0,5mmol/L de glutamato nos tempos indicados. A atividade foi expressa como nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína na cultura. Gráfico representativo de 2 experimentos realizados em quintuplicata.

Os resultados demonstrados no gráfico da figura 27 sugerem que os produtos dos genes analisados são importantes para a atividade da nitrogenase em *H. seropedicae*. Os mesmos resultados foram demonstrados para a estirpe mutante no gene *Hsero_2872* (NOVELLO, 2012). Podendo sugerir que as globinas truncadas do grupo II presente em *H. seropedicae* possuem função na fixação do nitrogênio.

A estirpe Ccl3 da actinobactéria diazotrófica *Frankia* produz duas hemoglobinas truncadas, do grupo I trHbN e do grupo II trHbO. Um experimento realizado por Coats, Schwintzer e Tjepkema (2009), caracterizou a expressão da quantidade relativas das globinas em culturas sem nitrogênio (N-) (condição de fixação de nitrogênio) e suplementadas com nitrogênio (N+). As culturas N- apresentaram uma taxa constante de trHbO e trHbN por toda o tempo da cultura, com trHbO constituindo 80 a 85% da hemoglobina total produzida. Em culturas N+, ao longo do tempo, trHbN aumentou e trHbO diminuiu. A hemoglobina total como uma fração total de proteínas foi aproximadamente constante durante toda a fase de crescimento em culturas N-, enquanto que diminuiu ligeiramente em culturas N+. Esse resultado demonstra que a globina do grupo II de *Frankia* Ccl3 pode ter envolvimento na fixação de nitrogênio, assim como as globinas do grupo II de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1.

O alinhamento entre a globina truncada do grupo II de *Frankia* Ccl3 com as globinas do grupo II, Hsero_1880, Hsero_2855 e Hsero_2872, de *H. seropedicae* no programa Blastp, apresentou respectivamente, 40, 43% e 23% de identidade.

No experimento realizado por Balsanelli e colaboradores (2016), que utilizou RNA-seq para comparar perfis transcricionais de *H. seropedicae* SMR1 durante a inoculação dessa bactéria no meio de cultura NFb-MalatoHPN (MM – meio mínimo), anexada a raiz da planta (P - planctônica) e colonizando a planta (E - epifítica) recuperadas no 1º e no 3º dia após a inoculação (Figura 28), foi possível observar que houve aumento de expressão do gene *Hsero_2855* logo após a inoculação. Comparando-se o terceiro com o primeiro dia das bactérias epifíticas (E3 vs E1) verificou-se que houve repressão do gene *Hsero_2855*, e no primeiro dia (E1 vs E2) houve aumento de expressão. O gene *Hsero_2879* foi expresso nessas condições, porém não houve alteração de expressão. Com essa análise, pode-se concluir que o gene *Hsero_2855* é expresso no início da colonização da planta (BALSANELLI *et al.*, 2016).

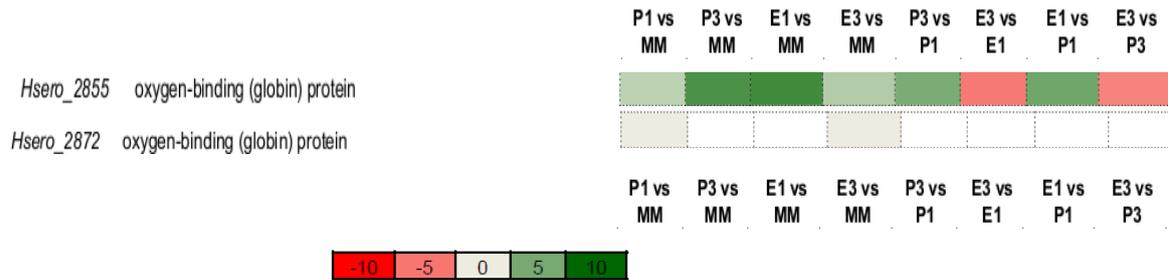


Figura 28. Expressão dos genes *Hsero_2855* e *Hsero_2872* de *H. seropedicae* SmR1 durante a colonização da rizosfera. Legenda: P1: células planctônicas 1 dia após inoculação (d.a.i.). P3: células planctônicas 3 d.a.i. E1: células epífitas de raiz 1 d.a.i. E3: células epífitas de raiz 3 d.a.i. MM: Células cultivadas em NFb-MalatoHPN.

5.5.3. Determinação do padrão de expressão dos genes *Hsero_1880*, *Hsero_2855* e *Hsero_2854*

Para a determinação do padrão de expressão dos genes *Hsero_1880*, *Hsero_2855* e *Hsero_2854*, a região promotora de cada gene previamente identificada por análise *in silico* foi amplificada por PCR, com primers contendo sítios de restrição para as enzimas PsTI e BglII para o gene *Hsero_1880* e EcoRI e BglII para *Hsero_2855* e *Hsero_2854* (Quadro 1). Então, foram clonadas nos vetores de fusão transcricional pMP202 e pPW452 para obter as fusões *pHsero_1880::lacZ*, *pHsero_2855::lacZ* e *pHsero_2854::lacZ*.

Foi amplificada uma região com 496 pb (região promotora) do gene *Hsero_1880*, contendo 445 pb da região a montante e 51 pb da região codificante, conforme a figura 29.

```

GGCGGTGGAATTCCTGTTCTCTTCACGCCTGCTCCGGCGTGCCTGGTGTGTATGCGGC
GCTGGCGGGTTTCGACGAGCGGGTGCCTGAGGCCGACTGTTGCGCGCGCTCGGCGC
CACCCGCGTGGAGCTGGCGCGCGCCAGCGTATCGAGGTAAGTGCCTGGTGGCGCCTTGGC
GGGGTTGCTGGCGGCCAGCGGTGCGGCCGCCATTGGCTGGCGCTGGCGCACTATGTCTT
CAATTCGACTGGAGCTTCAGCCCGCTGGTATGGCTGGCCGGCATGAGCCTGGGTGCGGC
CTGCTCGGCCCTGGCGGTTGGGCCGACGCGCCATGTGCTGCGCCGTCCACCTTGCA
GACCCTGCGCGAGGGCTGATACGCGCCAGGTCAAATCGCCTGCATATCGCCGCGGGCGG
CCCGCGTGGGCTGGCCGGCTGCGGTATCATGACGCTCTTATGCAAAATCGAAGACCCAA
CCAACCCACCACCTTCGAATCATCGGCGGCGCGGAGAACTGCGCGAGATGGTCGATCG
TTTCTATGACCTGATGGACCTGGAGCCGGAGTTCGCGCGCATCCGCGCCCTGCATCCGCC
CTCGCTGGAGGGTTTCGCGGAGAAGACCTACATGTTCTCTCCGGCTGGACCGCGGTCC
CAGCCTGTACATGGAGAAGTTCGGCCATCCGCGCCTGCGGGCGCGCCACCTGCCTTCC
CATCGGCATTTCCGAGCGTGACAGTGGCTGCGCTGCATGACCTGGGCCATGCAGGACGT
GGGCTGCCGGAAGACCTGATGAAACGCTGCTGGCAGCGCTCTACCAGACCGCTGACTG
GATGCGCAACAAGCCGAGTAAGCTCCCATGAACACATTCGAGATGATCCTGGCCGGCC
TGGTGGTGGCCGGCATCGTGTGTCAGGTGCTGGTGTGTTGCGTTCCGGACAGCGCGAGG
AGGTCGGCGCCGAGGTGCAAGAGATGCTGGCGCACATGCAGCAGGTCTGCAGCGCCACC

```

Figura 29. Região promotora amplificada do gene *Hsero_1880*. Em negrito está destacada a região promotora amplificada com 496 pb; em negrito e sublinhado os oligonucleotídeos iniciadores; em vermelho os códons de início (ATG) e término (TGA) tradução.

Foi amplificada uma região com 517 pb (região promotora) do gene *Hsero_2855*, sendo 477 pb da região a montante e 40 pb da região codificante do gene, conforme figura 30.

```
GCCCGGT CAGTGAT CCACTC ACGCA AGGAGCAA ACCATGCAAAT TCGGTGTAGACAGCCAG
CGCGCGGTCGACAACAAACGGGTCTTCATCGTCGACTGTGATGAAGTCAGCGGCTTGGCG
CTGCAGTTCATGCTCGCCGACGAGTGC GAAGCGCATCTGCTGGCGGATGTGGACAATGCC
TTGCGCAAGGGCCGGGATTGGCCGCCGACCTGCTCTTGTGGGCCAGGGCAATCTCGTC
AAGGAGGGCATGGAGGTGCTGGCCCAATTGCGCCAGCAACATCCGGCCTTGAAGATCGTA
GTGGTGTGCACAGCGCAATGACCGCCATGTTGCGCAAGCCCTGGCGCAAGGGGCCAAC
TCCACGCTGCTGCGCCGCTTACGCTGGAGAGCGTGGCCGCAAGGTCGATGCCCAACTG
GGCCGACGCACGCCCTTGGGCTGGGCATCGCGGTGACGGTGTGTAAGACCATGTGCCG
GACTCGCATCCCCTTGAAGTGC CGCATCGGGCTACCCCG ATGCGGGCGCATCGAAGTC
TGGCGCGCTGGCCAAATCCGCATTACCAGCAGATCGGGGGGAGCCGGTCTGCGGCAACT
GGTCGACCGTTTTCTACGCCCTGATGGACCAGTTGCCCCAGCGGGCCGTGGTACGCGCCAT
GCATCCGGGGGACC TGACCCCGGCCAAGCAGCGCCTGTTTCATGTTCCCTCCGGTTGGCT
GGGCGGCCCGCCCGTGTATGCCGAGGCCCTTCGGCCATCCGCGCCTGCGTACGCAACACGC
GGGCTTTGCCGTCGATGCTGCCGACGTCGATGCC TGGATGGCCTGCATGAAACAGGCACT
ACAAGA AACTGGTACCCGACGAGGTGTTGCGGCAGCAACTGGGTGCCGATTTTTCAAGAC
TGCCGATTTTCTGTGCAACC TAAGGAAACTTCATGAGCACTCTCGCAAATACCCCCCT
GGCCGATCTCGACAATGATGGCCGTCTGCTGAGCCCGTCTTCAAGGGCCCGACCAAACG
CAATGGACGCGTCGCCCTCCGTGGCGAAATCGCGCTCAAATACCAGGCCAGCCTGGCCGA
```

Figura 30. Região promotora amplificada do gene *Hsero_2855*. Em negrito está destacada a região promotora amplificada com 517 pb; em negrito e sublinhado os oligonucleotídeos iniciadores; em vermelho os codons de início (ATG) e término (TGA) tradução.

Foi amplificada uma região de 611 pb (região promotora) do gene *Hsero_2854*, sendo 583 pb da região a montante e 28 pb da região codificante do gene, conforme figura 31.

```
TGGGATCGCAGCCGACGATGAGGATGCGCTGCCCCATCTGGGCCAGCGCGGCCAGGGTATTTTGCAGGTT
GGTGGACTTGCCGATGCCGCCTTTGCCATAGAAGGCGATTGTCTGAGTGAGGCCATTTGATTCTCCTAG
AAATAAGCGGTGTAGCTCTGGTGTAAAGAAATTAAGGTTTCGTTCAAAGCAGTTTTGTTCATCACTTGCA
GCCGTTGGGGCGCCGCTTCGAAACTTTTATTGGTCTTCTGCTCAAGTCACGCATTCGGCAAGTCATCGTC
GGTGACACCTCTCTTTGCAAATGCCGTGCCACCATCAAAAAACGATTCCAAGCCATTGATTTAATTGGT
GAAAACAGCATTTGCGCAGCCTCTCGACCCACTTCTTCTGGTGTACAAACCGCACAAACGGCACCTG
GTCTGTAGGGAACGATACAAGCCCGCATCCCGACACAACCGTGTACCCAAACACCCTGTTGCACCCCTC
TCGGCCCGCTGGCCCGCAGCCACGGGCTTGTCAAGCAAGCAGAGGGCGGCTCGTGAT
AACGGGAACGATGTTTGCATCGGGATGAATGGCAGGGCAAAGAAGGCTGCGCCAAGCGGCCGGTCACT
GATCCACTCACGCAAGGAGCAAAC ATGCAAAATCGGTTAGACAGCCAGCGCGGTCGACAAACAAACGG
GTCTTCATCGTCGACTGTGATGAAGTCAGCGGCTTGGCGCTGCAGTTCATGCTCGCCGACGAGTGCGAAG
CGCATGCTGGCGGATGTGGACAATGCCCTTGGCAAGGGCCGGGATTGGCCGCCGACCTGCTCTTGGT
GGCCAGGGCAATCTCGTCAAGGAGGGCA TGAGGTGCTGGCCCAATTGCGCCAGCAACATCCGGCCCTG
AAGATCGTAGTGGTGTGCACAGCGCCAAATGACCGCCATGTTGCGCAAAGCCCTGGCGCAAGGGGCCAACT
CCACGCTGCTGCGCCCGCTTACGCTGGAGAGCGTGGCCGCAAGGTCGATGCCCAACTGGGCCGACGCAC
GCCCTTGGGCTGGGCATCGCGGTGACGGTGTAG TAGACCATGTGCGCGACTCGCATCCCCTTGAAGCT
GCCGCATCGGGCTACCCGATGCCGGGCGCATCGAAGTCTGCGCCGCTGGCCAATCCGCATTACCAGCAG
```

Figura 31 Região promotora amplificada do gene *Hsero_2854*. Em negrito está destacada a região promotora amplificada com 611 pb; em negrito e sublinhado os oligonucleotídeos iniciadores; em vermelho os codons de início (ATG) e término (TGA) tradução.

Foi realizada a restrição dos produtos amplificados e dos plasmídeos pMP220 e pPW452 com as respectivas enzimas de restrição para cada região promotora (figura 32). Os fragmentos e vetores respectivos foram ligados em reação com enzima T4 DNA ligase. A ligação resultante foi transformada por choque térmico em *E.coli* TOP10.

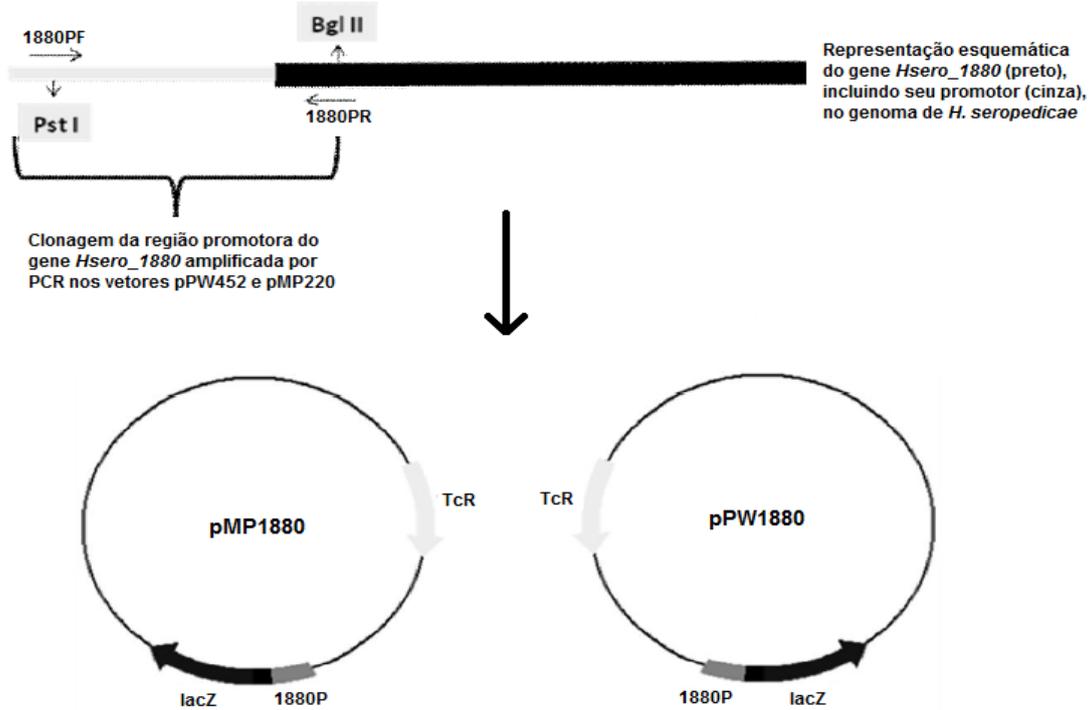


Figura 32. Esquema da estratégia utilizada para a clonagem da região promotora do gene *Hsero_1880* nos vetores pMP220 e pPW452, dando origem aos plasmídeos pMP1880 e pPW1880. Os oligonucleotídeos sintetizados para a amplificação dos fragmentos indicados estão representados como setas, juntamente com sua denominação. Os sítios de restrição inseridos nos oligonucleotídeos estão indicados. O mesmo esquema pode ser utilizado para os genes *Hsero_2854* e *Hsero_2855*, com os oligonucleotídeos e sítios de restrição específicos citados no quadro I.

A clonagem das regiões promotoras foi confirmada primeiramente por PCR utilizando os primers pMP forward e LacZrev com a enzima Phusion. Após a seleção dos clones positivos, a identidade do inserto foi confirmada por PCR utilizando os primers específicos das regiões promotoras e, a orientação do inserto foi confirmado por PCR utilizando primer forward específico da região promotora e o primer LacZrev (Figuras 33 e 34).

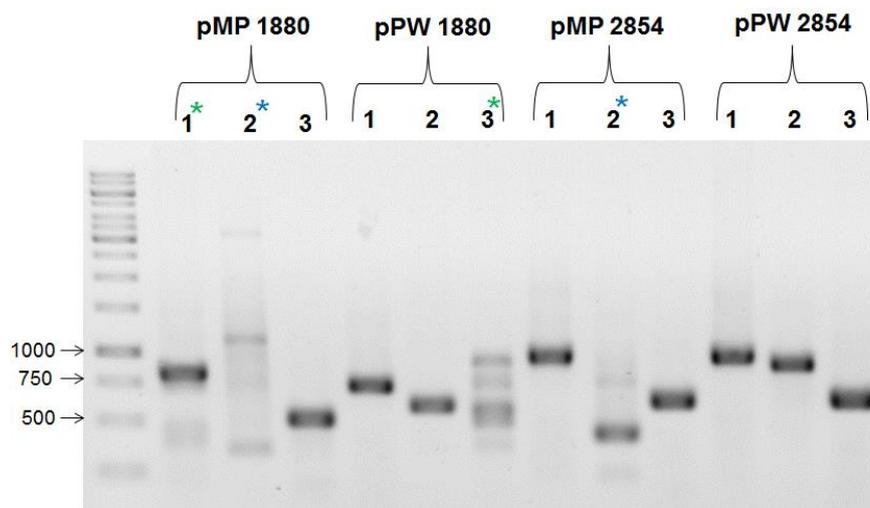


Figura 33. Confirmação da clonagem da região promotora dos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2854* nos vetores pMP 220 e pPW 452. Legenda: 1 – Primers For e Rev do Vetor; 2 – Primers For do Inseto e Rev do Vetor; 3 - Primers For e Rev do Inseto; *A banda de interesse foi identificada, apesar do aparecimento de bandas inespecíficas; O marcador utilizado foi o 1Kb DNA Ladder.

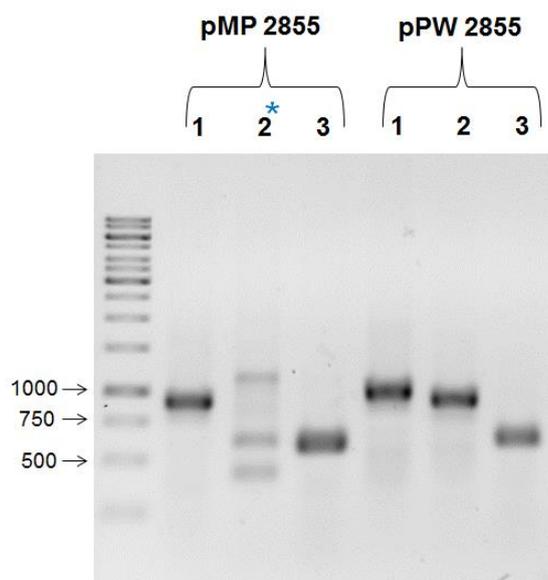


Figura 34. Confirmação da clonagem da região promotora do gene *Hsero_2855* nos vetores pMP 220 e pPW 452. Legenda: 1 – Primers For e Rev do Vetor; 2 – Primers For do Inseto e Rev do Vetor; 3 - Primers For e Rev do Inseto; * A banda de interesse foi identificada, apesar do aparecimento de bandas inespecíficas; O marcador utilizado foi o 1Kb DNA Ladder.

Apesar da confirmação da clonagem por PCR, devido a problemas experimentais, como erro na realização dos procedimentos e/ou contaminação de reagentes e materiais de uso comunitário no laboratório, não foi possível a confirmação das clonagens da região promotora dos genes *Hsero_2855* e *Hsero_2854* por sequenciamento.

Com o objetivo de determinar as condições de expressão da fusão transcricional *pHsero_1880::lacZ*, os plasmídeos pMP 220 e pPW 452 contendo as regiões promotoras foram transformados em *E. coli* S17.1. As colônias transformadas foram selecionadas em

meio LA contendo tetraciclina. As estirpes *E. coli* S17.1 transformadas foram então conjugadas com as estirpes de *H. seropedicae* SmR1. Os transconjugantes foram selecionados com os antibióticos apropriados (estreptomicina e tetraciclina) e foram cultivados em meio NFb-malato contendo 20mmol/L de NH₄Cl e 50ml/L de fosfato para *H. seropedicae*.

Os ensaios de β -galactosidase foram realizados com a fusão transcricional *pHsero_1880::lacZ* e foram feitos como descrito no item 4.13. Não foi possível realizar os testes com as fusões transcricionais *pHsero_2854::lacZ*, *pHsero_2855::lacZ*.

Para determinar as condições de expressão do gene *Hsero_1880* em diferentes condições de aeração, foi feita troca gasosa para se obter a concentração de O₂ desejada no meio para a determinação de β -galactosidase (figura 35).

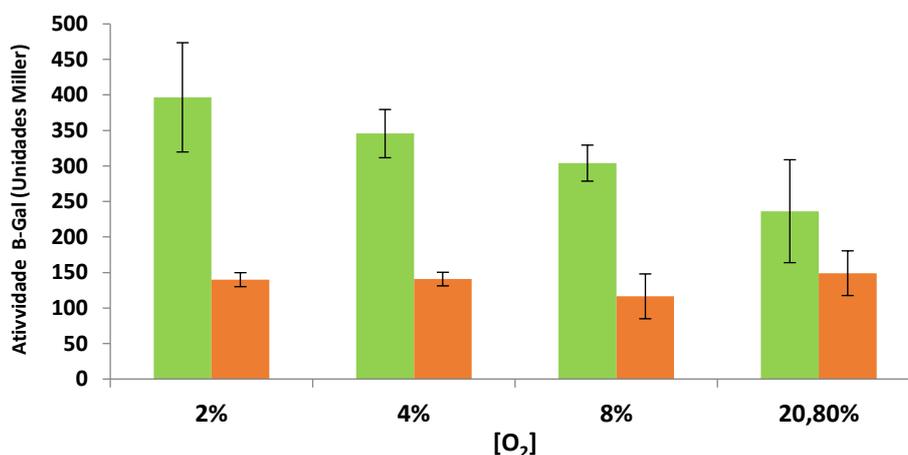


Figura 35. Determinação da expressão do provável promotor do gene *Hsero_1880*, representado em verde, através da determinação da atividade de β -galactosidase em diferentes concentrações de oxigênio. A estirpe SmR1 contendo vetor pMP220 (gene para β -galactosidase sem promotor) foi utilizada como controle negativo e está representado em laranja. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

Os resultados demonstrados no gráfico da figura 35 sugerem que o gene *Hsero_1880* é ativado em baixo oxigênio, pois demonstrou maior atividade na concentração de 2% de oxigênio, sendo essa uma condição favorável a fixação biológica de nitrogênio.

No experimento realizado com a estirpe Ccl3 da actinobactéria *Frakia* (COATS; SCHWINTZER; TJEKEMA, 2009), foi determinado os efeitos da concentração de oxigênio em cultura com nitrogênio em relação quantidade de hemoglobinas truncadas é produzida por essa bactéria. Foi observado que as culturas cultivadas em 1% de O₂

produziram cerca de 4 vezes mais trHbO do que as culturas que cresceram em 20% de O₂. Esse resultado evidencia que a trHbO de *Frankia* Ccl3 está relacionada com adaptação a baixas concentrações de O₂, o que corrobora com os resultados obtidos na expressão dos genes codificadores de globinas do grupo II (*Hsero_1880* e *Hsero_2855*) em *H. seropedicae*, uma vez que são ativadas em baixo oxigênio.

Para determinar as condições de expressão do gene *Hsero_1880* em diferentes concentrações de amônio, a atividade de β-galactosidase foi medida nas concentrações 1, 2, 4, 8 e 20 mM de NH₄Cl em 2% de oxigênio (figura 36).

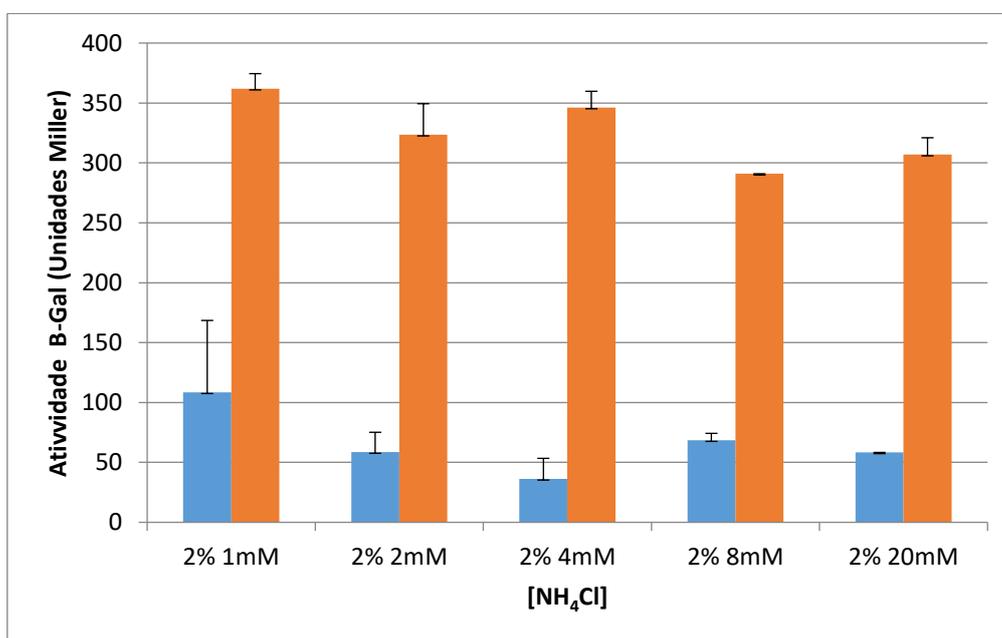


Figura 36. Determinação da expressão do provável promotor do gene *Hsero_1880*, representado em laranja, através da determinação da atividade de β-galactosidase a 2% do oxigênio e em diferentes concentrações de amônio. A estirpe SmR1 contendo vetor pMP220 (gene para β-galactosidase sem promotor) foi utilizada como controle negativo e está representado em azul. Resultado de 2 experimentos realizados em duplicata.

Os resultados demonstrados no gráfico da figura 36 permitiram verificar que a concentração de nitrogênio não influencia na expressão do gene, uma vez que não há diferença significativa na atividade de β-galactosidase entre as diferentes concentrações de NH₄Cl. O efeito observado na atividade de β-galactosidase é devido ao oxigênio.

Considerando que o gene *Hsero_1880* é ativado em baixo oxigênio, a atividade de β-galactosidase do gene foi medida a uma concentração de 2% de oxigênio e em diferentes fontes de nitrogênio: 1 mM e 5 mM de amônio (NH₄Cl), 1 mM e 5 mM de glutamato (Glu) e 1 mM e 5 mM de nitrato (NO₃⁻) (Figura 37).

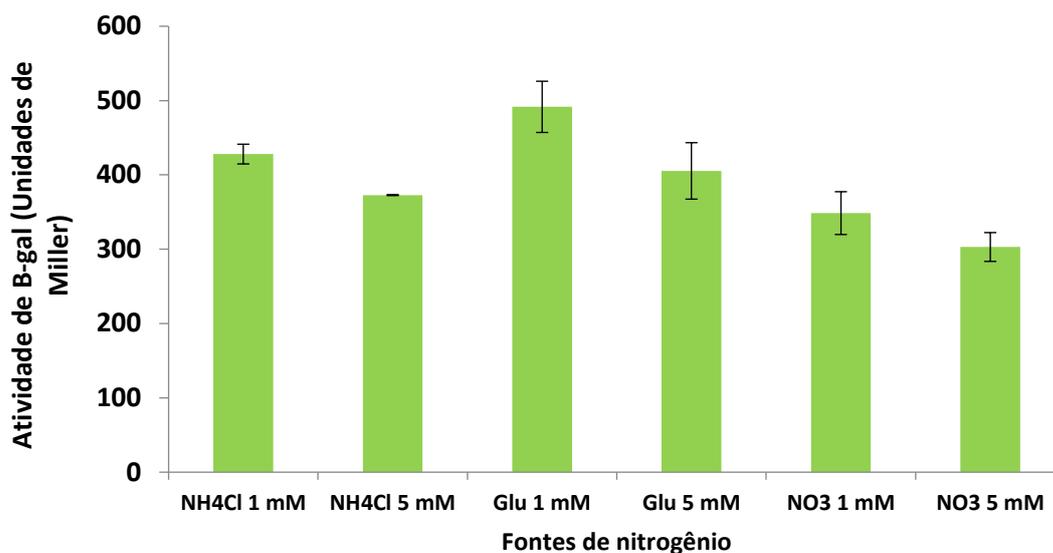


Figura 37. Determinação da expressão do provável promotor do gene *Hsero_1880* através da determinação da atividade de β -galactosidase a 2% do oxigênio e em diferentes fontes de nitrogênio (amônio- NH_4Cl , glutamato - Glu, Nitrato - NO_3) em concentrações de 1 e 5mM. Resultado de 1 experimento realizado em duplicata.

Os valores do gráfico demonstrado na figura 37 indicam que a concentração de nitrogênio proveniente de diferentes fontes como amônio, glutamato e nitrato não influencia na expressão do gene, uma vez que não há diferença significativa entre os valores, assim como observado anteriormente na figura 36. O efeito observado na atividade de β -galactosidase é devido ao oxigênio.

6. Conclusão

De acordo com análise *in silico*, as globinas Hsero_1880 e Hsero_2855 podem atuar no metabolismo de óxido nítrico, porém ainda são necessários dados experimentais.

A ausência dos produtos dos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* não influencia o perfil de crescimento de *H. seropedicae*, uma vez que os mutantes apresentaram tempo de duplicação semelhante ao da estirpe selvagem.

Os genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* tem, aparentemente, efeito no metabolismo de nitrogênio, uma vez que a atividade de nitrogenase dos mutantes nos genes *Hsero_1880* e *Hsero_2855* foram de, aproximadamente, 50% e 30% da atividade da estirpe selvagem em 24 horas, respectivamente.

O gene *Hsero_2855* é expresso no início na colonização da planta.

O gene *Hsero_1880* é ativado em baixas concentrações de oxigênio, sugerindo que o gene pode ser ativado nas condições de fixação de nitrogênio e também pode estar relacionado com adaptação a baixas concentrações de O₂.

A concentração de nitrogênio, independente da fonte utilizada como amônio, glutamato e nitrato, não influencia na ativação do gene *Hsero_1880*.

7. Referencias

APLLEBY, C. A. Leghemoglobin and Rhizobium respiration. *Annu Rev Plant Physiol* v.35, p.443-478, 1984.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS (ANDA). Disponível em: <<http://www.anda.org.br>> Acesso em: 27 jan. 2015.

ASSOCIAÇÃO INTERNACIONAL DA INDÚSTRIA DE FERTILIZANTES (IFA). Disponível em: <<http://fertilizer.org/ifa/content/view/full11423>> Acesso em: 27 jan.2015.

ATKINSON, M. R *et al.* J. Reversible Uridylylation of the *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein Regulates Its Ability to Stimulate the Dephosphorylation of the Transcription Factor Nitrogen Regulator I (NRI or NtrC). *J. Biol. Chem.*, 269: 28288-28293, 1994.

AVILA-RAMIREZ, C. *et al.* Do globins in microaerophilic *Campylobacter jejuni* confer nitrosative stress tolerance under oxygen limitation? *Antioxid Redox Signal*. 18(4):424-31, 2013.

BACHEGA, J. F. R. Estrutura cristalográfica da hemoglobina gigante de *Glossoscolex Paulistus*, um complexo de 3,6 mega Daltons. Tese (Doutorado em física). Programa de Pós-Graduação em Física. Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.167p. 2013.

BALDANI, J. I *et al.* Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 36 (1): 86–93, 1986.

BALDANI, V. L. D. *et al.* Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*. 13: 65-73, 1992.

BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L. AND DÖBEREINER, J. Selection of *Herbaspirillum spp.* strains associated with rice seedlings amended with 15 N labelled fertiliser. In: *International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics – the role of biological nitrogen fixation*. Resumos. Angra dos Reis: EMBRAPA, p.202-203, 1995.

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* 30:485-491, 2000.

BALSANELLI, E. Caracterização de fatores moleculares envolvidos na interação de *Herbaspirillum seropedicae* com gramíneas. Tese (Doutorado em Ciências Bioquímica). Programa de pós-graduação em Ciência-Bioquímica. Universidade Federal do Paraná. 160p. 2013.

BALSANELLI, E., *et al.* Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. *Environ Microbiol*, 18: 2343–2356, 2016.

BARBOSA, H. C. S. Re-anotação do genoma de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 com dados de transcriptoma por RNA-seq. Dissertação (Mestrado em Bioinformática). Programa de Pós-Graduação em Bioinformática. Universidade Federal do Paraná. 99p. 2014.

BATISTA, M. B. Construção e Caracterização de estirpes mutantes de *Herbaspirillum seropedicae* nos Genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3*. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica). Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Universidade Federal do Paraná. 118p. 2011.

BENELLI, E. M. *et al.* Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. *Can. J. Microbiol.*47: 309-314, 2001.

BENELLI, E. M. *et al.* Evidences for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. *J. Bacteriol. Washington*, 179: 4623-4626, 1997.

BHATTACHARYYA, P.N.; JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J Microbiol Biotechnol.* 28:1327-50, 2012.

BONAMORE A., *et al.* A novel thermostable hemoglobin from the actinobacterium *Thermobifida fusca*. *FEBS J* 272, 4189–4201, 2005.

BONATTO, A.C. *et al.* Purification and characterization of the Bifunctional uridylyl transferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. *Protein Expr. Purif.* 55 (2): 293-29,2007.

BORROTO, R.; SÁNCHEZ, M.; PETER, R. A bioinformatics insight to rhizobial globins: gene identification and mapping, polypeptide sequence and phenetic analysis, and protein modeling. *F1000Research*, 4, 117, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilization: the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 48-54, 1976.

BURRIS, R. H. Nitrogenases. *J. Biol. Chem.*, 266: 9339-9342, 1991.

BUSTAMANTE, J. P. *et al.* Evolutionary and Functional Relationships in the Truncated Hemoglobin Family. *PLOS Computational Biology* 12(1): e1004701, 2016.

CASPI, R. *et al.* The Meta Cyc Database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Research* 44(1): D471-80, 2014.

CELLA, D.; ROSSI, M.C.L. Análise do mercado de fertilizantes no Brasil. *Interface Tecnológica*, 7(1), 2010.

CHUBATSU, L. S. *et al.* Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant and Soil*, 356 (1-2): 197–207, 2011.

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.*, 86: 2172-2175, 1989.

COATS, V.; SCHWINTZER, C.R.; TJEPKEMA, J.D. Truncated hemoglobins in Frankia CcI3: effects of nitrogen source, oxygen concentration, and nitric oxide. *Can J Microbiol.* 55(7):867-73, 2009.

CRUZ, L.M, *et al.* 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2375-2379, 2001.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2: 621-631, 2004.

DÖBEREINER, J *et al.* Endophytic diazotrophs: the key to BNF in gramineous plants. In: *Hegazani NA, Fayez M, Monib M, eds. Nitrogen fixation with non-legumes.* Cairo: American University in Cairo Press, 1994.

EADY, R.R.; POSTGATE, J.R. Nitrogenase. *Nature*, 249: 805-810, 1974.

GAY, P. *et al.* Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *B. subtilis*: expression of the gene in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 153: 1424-1431, 1983.

GIANGIACOMO A. *et al.* The truncated oxygen-avid hemoglobin from *Bacillus subtilis*: X-ray structure and ligand binding properties. *J Biol Chem* 280, 9192–9202, 2005.

GYANESHWAR, P *et al.* *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytologist.* 154: 131-145, 2002.

HILL, D. R. *et al.* GlnN (cyanoglobin) is a peripheral membrane protein that is restricted to certain *Nostoc spp.* *Journal of bacteriology*, 178(22): 6587–98, 1996.

HYNES, M. F. *et al.* Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis sacB* gene. *Gene*. 78:111-120, 1989.

ILARI, A. *et al.* Crystal structure and ligand binding properties of the truncated hemoglobin from *Geobacillus stearothermophilus*. *Arch Biochem Biophys* 457, 85–94, 2007.

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*. 48: 785-797, 1997.

JAMES, E.K; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N. Infection and Colonization of Rice Seedlings by the Plant Growth-Promotion Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol. Plant Microbe Interac.* 15:894-906, 2002.

JIANG, P. NINFA, A.J. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. *J. Bacteriol.*, p.1906-1911, 1999.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry*. 33: 389-397, 1994.

KLASSEN, G. *et al.* Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. *Canadian Journal of Microbiology*, 43 (9): 887–891, 1997.

KUMAR, A.; NAG, M.; BASAK, S. Truncated or 2/2 hemoglobins: a new class of globins with novel structure and function. *Journal of Proteins and Proteomics*, 4(1): 45-64, 2013.

MACHADO, I.M.P. *et al.* Cloning and sequencing of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29 (12): 1599-1602, 1996.

MERRICK, M. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. *Biological nitrogen fixation*. New York: Chapman & Hall, 1992.

MERRICK, M.J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. *Microbiol Rev.*, 59: 604-622, 1995.

MILANI M. *et al.* A TyrCD1/TrpG8 hydrogen bond network and a TyrB10TyrCD1 covalent link shape the heme distal site of *Mycobacterium tuberculosis* hemoglobin O. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 5766–5771, 2003.

MILANI, M. *et al.* Structural bases for heme binding and diatomic ligand recognition in truncated hemoglobins. *Journal of inorganic biochemistry*, 99 (1): 97–109, 2005.

MILLER, J. H.; Experiments in Molecular Genetics. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 325-355, 1990.

MONTEIRO, R. A. *et al.* Expression and functional analysis of a N truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. *FEBS Lett.* 447: 283-286, 1999.

MONTEIRO, R.A.*et al.* Fnr Is Involved in Oxygen Control of *Herbaspirillum seropedicae* N Truncated NifA Protein Activity in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1527-1531, 2003.

MUKAI, M., *et al.* Flavohemoglobin, a globin with a peroxidase-like catalytic site. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (10): 7272-7, 2001.

MUR, L.A. *et al.* Haemoglobin modulates salicylate and jasmonate/ethylene-mediated resistance mechanisms against pathogens. *J Exp Bot.* 63(12):4375-87: 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th ed. W. H. Freeman, 2008.

NINFA, E. G. *et al.* Mechanism of auto phosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II (NRII or NtrB): transphosphorylation between subunits. *J. Bacteriol.*, 175: 7024-7032, 1993.

NOINDORF, L. Clonagem, sequenciamento e caracterização dos genes *glnK* e *amtB* de *Herbaspirillum seropedicae*. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímica). Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica). Universidade Federal do Paraná. 102 f. 2002.

NOINDORF, L. *et al.* Characterization of the *orf1glnkamtb* operon of *i Arch. Microbiol.*, 185: 55-62, 2006.

NOINDORF, L. *et al.* Role of PII proteins in nitrogen fixation control of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. *BMC Microbiology*, 11:8, 2011.

NOVELLO, E. E. G. Caracterização funcional de uma Globina putativa codificada pelo gene *hsero_2872* de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímica) Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica). Universidade Federal do Paraná. 113p. 2012.

NUNES, F. S., RAIMONDI, A. C., NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. *Química Nova*, 26(6), 872-879, 2003.

OLDROYD, G. E., DIXON, R. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Current Opinion in Biotechnology*, 26: 19-24, 2014.

OLIVARES, F. L. *et al.* Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist*, 135 (4): 723-737, 1997.

OLIVEIRA, F. K. Modelagem computacional das proteínas *hsero_0935*, *hsero_1880*, *hsero_2698*, *hsero_2855* e *hsero_2872* de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 utilizando o servidor I-Tasser. Dissertação (Mestrado em Bioinformática). Programa de Pós-Graduação em Bioinformática. Universidade Federal do Paraná. 102p. 2014.

PEDROSA, F. O. *et al.* Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. *J. Biotechnol.*,91: 189-195, 2001.

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

PEDROSA, F.; YATES, G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. *FEMS Microbiol. Lett.*,23: 95-101, 1984.

PERSUHN, D.C. *et al.* The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of lutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. *FEMS Microbiol.Lett.* 192: 217–221, 2000.

PESCE, A.*et al.* Protein Structure in The Truncated (2/2) Hemoglobin Family.*Life*, 59 (8-9): 535-541, 2007.

PESCE, A. *et al.* HisE11 and HisF8 provide bis-histidylhemehexa-coordination in the globin domain of *Geobacter sulfurreducens* globin-coupled sensor. *Journal of MolecularBiology*, 386(1), 246-60, 2009.

PESCE A, *et al.* Structural characterization of a group II 2/2 hemoglobin from the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *Biochim Biophys Acta* 1814, 810–816, 2011.

PESCE A, BOLOGNESI M; NARDINI M. The diversity of 2/2 (truncated) globins. *Adv Microb Physiol.* 63: 49–78, 2013.

POEHLEIN, A. *et al.* Draft Genome Sequence of the Methanotrophic Gammaproteobacterium *Methyloglobulus morosus* DSM 22980 Strain KoM1. *Genome Announc.* 1(6): e01078-13, 2013.

POOLE, R. K.; HUGHES, M. N. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Molecular Microbiology*, 36(4): 775-783, 2000.

POSTGATE, J. R. Biology Nitrogen Fixation: Fundamentals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1982.

POSTGATE, J. R. Nitrogen Fixation. (M. W. Ribbe, Ed.) *Nature*, 766 (1): 165–176, 1998.

RAZZERA, G. *et al.* Spectroscopic characterization of a truncated hemoglobin from the nitrogen-fixing bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. *J. Bio. Inorg. Chem.*, 13: 1085-1096, 2008.

REEDER, B.J.; HOUGH M.A. The structure of a class 3 nonsymbiotic plant haemoglobin from *Arabidopsis thaliana* reveals a novel N-terminal helical extension. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70, 1411–1418, 2014.

REIS, V. M. *et al.* Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Critical Revs. Plant Sci.* 19:227-247, 2000.

RONCATO-MACARI, L.D.B. *et al.* Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif gene in gramineous plants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 39-47, 2003

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

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

SCHÄFER, A. *et al.* Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145(1):69-73, 1994

SEEFELDT, L.C.; HOFFMAN, B.M.; DEAN, D.R. Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. *Annual Review of Biochemistry*. 78: 701-722, 2009.

SIMON, R.; PRIEFFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *BioTechnology*, 1: 784-791, 1983.

SMITH, B. E. Nitrogenase reveals its inner secrets. *Science*, 297:1654-1655, 2002.

SMITH, H. K . *et al.* The NO-responsive hemoglobins of *Campylobacter jejuni*: concerted responses of two globins to NO and evidence in vitro for globin regulation by the transcription factor NssR. *Nitric Oxide*. 25(2):234-41, 2011.

SOUZA, E. M. *et al.* Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. *Journal of bacteriology*, 181 (2): 681–684, 1999.

SOUZA, E.M.*et al.* Expression of the nifA gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of theNtrC and NifA binding sites of the –24/-12 promoter element. *Microbiol.*, 146: 1407-1418, 2000.

SPAINK, H. P. *et al.* Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol*, 9: 27–39, 1987.

STEPHEN, F. *et al.* “Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”. *Nuclieic Acids Res.*25:3386-3402, 1997.

STEINMETZ, M., *et al.* Analyse génétique desacB, gene de structure d'une enzymes ecrétée, lalévane-saccharase de *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol. Gen. Genet.*191:138-144, 1983.

STRAUB, D. *et al.* The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30^T identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants. *Frontiers in Microbiology*, 4, 168, 2013.

SUZUKI, T.; IMAI, K. Evolution of myoglobin. *Cell Mol. Life Sci.* 54: 979-1004, 1998.

SZKLARCZYK D. *et al.* STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 43: D447-52, 2015.

TEIXEIRA, K.R.S.; MARIN, V.A.; BALDANI, J.I. Bioquímica do processo de FBN. *Nitrogenase: Seropédica: Embrapa Agrobiologia.* 25p. 1998.

VINOGRADOV, S. N. *et al.* Adventitious variability? The aminoacid sequences of nonvertebrate globins. *Comp. Biochem. Physiol.* 106b: 1-26, 1993.

VINOGRADOV, S.N. *et al.* A phylogenomic profile of globins. *BMC Evol. Biol.* 7: 31, 2006.

VINOGRADOV, S. N.; MOENS, L. Diversity of Globin Function: Enzymatic, Transport, Storage and Sensing. *J. Biol. Chem.*, 283: 8773-8777, 2008.

WAJCMAN, H; KIGER, L.; MARDEN, M.C. Structure and function evolution in the superfamily of globins. *C R Biol.* 332(2-3): 273-282, 2009.

WASSEM, R. *et al.* Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. *Mol. Microbiol.*, 35: 756-764, 2000.

WITTENBERG, J. B. *et al.* Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants. *The Journal of biological chemistry*, 277(2): 871-4, 2002.

WOODLEY, P. *et al.* Identification of sequences important for recognition of *vnf* genes by the Vnf A transcriptional activator in *Azotobacter vinelandu*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 135: 213-221, 1996.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (eds). *Biological Nitrogen Fixation*. London: Chapman & Hall, New York, 43-86, 1992.