

MICHELLE ZIBETTI TADRA SFEIR

**MUTAGÊNESE ALEATÓRIA E IDENTIFICAÇÃO
DE GENES REGULADOS POR NARINGENINA EM**
Herbaspirillum seropedicae

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dr^a Rose Adele Monteiro
Co-orientador: Dr. Emanuel M. de Souza

CURITIBA
2008

Orietadores: Prof^ª. Dr^ª. Rose Adele Monteiro
Prof. Dr Emanuel Maltempi de Souza

Ao meu marido por todo seu apoio.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a Rose Adele Monteiro pela orientação e amizade. Agradeço por todas suas idéias e confiança, além de todo seu carinho e atenção.

Ao professor Dr. Emanuel Maltempi de Souza, pela orientação e oportunidade de trabalhar no grupo. Suas idéias e seu senso crítico foram fundamentais para a realização deste trabalho de dissertação.

Gostaria de agradecer aos meus dois orientadores, Rose Adele e Emanuel, por toda a paciência e auxílio em todas as reuniões e em todas as conversas paralelas pelos corredores, que foram essenciais não somente para esta dissertação, mas também para este início de formação científica.

Ao professor Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio, pelo seu apoio e grande exemplo profissional.

À professora Dr^a Roseli Wassem pelo seu apoio e por toda atenção dispensada nas discussões além das muitas referências bibliográficas.

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

Ao pessoal do anexo, Giovani, Arnaldo, Talita, Eduardo, Bruno, Letícia, Stefania, Marcelo Batista, Fernanda e Rafael (pela incomodação) pela atenção, por toda a alegria do dia-a-dia e amizade dispensadas.

Aos colegas da 279, Larissa C., Larissa T., Giovana, Juliana Osaki. E aos Marcos (Aurélio e Antônio), por todas as conversas.

Aos colegas da 275, Juliana Inaba, Ana Cláudia, Gustavo, Márcia e Michelle. E aos demais colegas da 271/272, Luciano, Viviane, Lílian, Fernanda Pacheco e Daniela.

As minhas “irmãs científicas” Anelis e Tuca, por suas amizades, risadas e ajuda em todos os momentos.

Ao Valter pelas cantorias e claro por todo seu auxílio (indispensável), amizade, carinho e compreensão nas horas desesperadoras.

Ao Helissom por toda sua paciência em todos os momentos, pela sua ajuda e também pela sua colaboração nas discussões dos resultados e ainda na formação de uma visão científica.

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

À Roseli Prado em especial, por toda paciência, auxílio (na preparação de litros de meio de cultura), apoio, amizade e carinho.

À minha família, por todo apoio e incentivo. Aos meus pais pelo apoio e carinho. Aos meus irmãos, pela admiração e seu apoio. Ao meu tio Pedro, a Tere e aos meus padrinhos Beti e Wolney. Ao meu avô, que infelizmente faleceu em 2007, mas acredito que está sempre do meu lado.

À coordenação de Pós-Graduação em Bioquímica e a todas as Instituições Financiadoras, particularmente a CAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu super marido por toda sua paciência, acredito que isto resume tudo o que ele faz e passa por mim, mas também gostaria de agradecer por todo seu infinito apoio e seu dedicado e incondicional amor.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 FLAVONÓIDES	01
1.1.1 Efeito dos flavonóides na interação planta bactéria	04
1.2 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	07
1.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL	08
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	11
3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO	11
3.3 ANTIBIÓTICOS	14
3.4 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEO	14
3.5 CONSTRUÇÃO DE MUTANTES ALEATÓRIOS DE <i>H. seropedicae</i> UTILIZANDO PLASMÍDEO pTnMod-OGmKmlacZ	15
3.6 CONJUGAÇÃO	15
3.7 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO	16
3.7.1 Preparo de células competentes de <i>E. coli</i> para eletroporação	16
3.7.2 Eletroporação bacteriana	16

3.8	ARMAZENAMENTO DE BACTÉRIAS.....	16
3.9	IDENTIFICAÇÃO DE MUTANTES EM GENES REGULADOS POR NARINGENINA	17
3.9.1	Triagem em meio sólido de mutantes em genes regulados por naringenina	17
3.9.2	Triagem em meio líquido de mutantes em genes regulados por naringenina ..	18
3.9.2.1	Determinação da atividade de β -galactosidase em bloco de 96 poços.....	18
3.9.2.2	Determinação da atividade de B-galactosidase em tubo	19
3.10	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA	19
3.10.1	Determinação da concentração de proteína em bloco de 96 poços	19
3.11	PURIFICAÇÃO DE DNA CROMOSSOMAL DE <i>H. seropedicae</i>	20
3.12	CLIVAGEM DO DNA COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO.....	20
3.13	ELETROFORESE DE DNA.....	20
3.14	CLONAGEM DOS GENES MUTAGENIZADOS DE <i>H. seropedicae</i>	21
3.15	SEQÜENCIAMENTO DE DNA	21
3.15.1	Reação de seqüenciamento.....	21
3.16	COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS COM O BANCO DA DADOS GENOPAR E NCBI	22
3.17	AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES MUTANTES NA PRESENÇA DE SDS E POLIMIXINA.....	22
3.18	PERFIL DE LPS (LIPOPOLISSACARÍDEOS) DAS ESTIRPES MUTANTES .	22
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	CONSTRUÇÃO DE MUTANTES ALEATÓRIOS DE <i>H.seropedicae</i>	24
4.2	IDENTIFICAÇÃO DE MUTANTES EM GENES REGULADOS POR NARINGENINA	25

4.2.1	Identificação de mutantes em genes regulados por naringenina crescidos em 2 mmol/L DE NH ₄ Cl.....	26
4.2.2	Identificação de mutantes em genes regulados por naringenina crescidos em 20 mmol/L DE NH ₄ Cl.....	28
4.3	IDENTIFICAÇÃO DOS GENES REGULADOS POR NARINGENINA	33
4.3.1	Estirpe 31B12	36
4.3.2	Estirpe 37 A5	37
4.3.3	Estirpe 9B3	37
4.3.4	Estirpes 9D4 e 9F3	38
4.3.5	Estirpe T1E11	41
4.3.6	Estirpe 9E3	42
4.3.7	Estirpe T1A8	42
4.3.8	Estirpes 13C9, 37C5, 39G2 E T2B10	45
4.7	ENSAIOS DE CRESCIMENTO DAS 22 ESTIRPES MUTANTES REGULADAS POR NARINGENINA (20 MMOL/L DE NH ₄ CL) NA PRESENÇA DE SDS E POLIMIXINA B.	47
4.8	PADRÃO ELETROFORETICO DE LPS DAS 22 ESTIRPES MUTANTES REGULADAS POR NARINGENINA (20 MMOL/L DE NH ₄ CL) ..	48
4.9	IDENTIFICAÇÃO DE PROVÁVEIS ELEMENTOS DE REGULAÇÃO NAS SEQÜÊNCIAS A MONTANTE DOS GENES ALVOS DE INSERÇÃO REGULADOS POR NARINGENINA	50
5.	CONCLUSÕES.....	57
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - VIA DE SÍNTESE DE FENILPROPANÓIDES	02
FIGURA 02 - ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDE	02
FIGURA 03 - CLASSES DE FLAVONÓIDES.....	03
FIGURA 04 - MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pTnMod-OGmKmlacZ	25
FIGURA 05 - DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE β-GALACTOSIDASE EM PLACA, DE ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i>, NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE NARINGENINA CRESCIDAS EM 2 mmol/L DE NH₄Cl.....	27
FIGURA 06 - ATIVIDADE ESPECÍFICA DE β-GALACTOSIDASE NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE NARINGENINA DE ESTIRPES MUTANTES CRESCIDAS EM 2 mmol/L DE NH₄Cl	28
FIGURA 07- EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE β-GALACTOSIDASE EM PLACA, DAS ESTIRPES MUTANTES DE <i>H. seropedicae</i>, NA PRESENÇA DE NARINGENINA E NH₄Cl 20 mmol/L	29
FIGURA 08 - ATIVIDADE ESPECÍFICA DE β-GALACTOSIDASE EXPRESSAS DIFERENCIALMENTE NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE NARINGENINA COM 20 mmol/L E 2 mmol/L DE NH₄Cl.....	32
FIGURA 09 - RESTRIÇÃO DE DNA GENÔMICO DAS ESTIRPES MUTANTES .	33
FIGURA 10 - PERFIL DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS SELECIONADOS....	34
FIGURA 11 - LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON TnMod-OGmKmlacZ NO GENOMA DE HS 31B12	36

FIGURA 12 - LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON	
TnMod-OGmK <i>mlacZ</i> NO GENOMA DE HS 37 A5	37
FIGURA 13 - LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON	
TnMod-OGmK <i>mlacZ</i> NO GENOMA DE HS 9B3	38
FIGURA 14 - LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON	
TnMod-OGmK <i>mlacZ</i> NOS GENOMAS DE HS 9D4 E HS 9F3	39
FIGURA 15 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS	
DOS PRODUTOS DOS GENES 9D4 E 9F3	40
FIGURA 16 - LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON	
TnMod-OGmK <i>mlacZ</i> NO GENOMA DE HS T1E11	41
FIGURA 17 - LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON	
TnMod-OGmK <i>mlacZ</i> NO GENOMA DE HS 9E3	42
FIGURA 18 - LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON	
TnMod-OGmK <i>mlacZ</i> NO GENOMA DE HS T1A8.....	44
FIGURA 19 - ATIVIDADE ESPECÍFICA DE β-GALACTOSIDASE DA	
ESTIRPE MUTANTE T1A8 NA PRESEÇA DE TRIPTOFANO	
E AIA.....	44
FIGURA 20 - LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON	
TnMod-OGmK <i>mlacZ</i> NOS GENOMAS DE HS 13C9, HS 37C5,	
HS 39G2 e HS T2B10	46
FIGURA 21 - ANÁLISE DO PADRÃO DE LPS DAS ESTIRPES MUTANTES	49
FIGURA 16 - SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DAS REGIÕES A	
MONTANTE DOS GENES ALVOS DE INSERÇÃO	

REGULADOS POR NARINGENINA CONTENDO PROVÁVEIS	
ELEMENTOS REGULATÓRIOS.....	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	11
TABELA 02 - <i>Escherichia coli</i>	11
TABELA 03 - PLASMÍDEOS	11
TABELA 04 -ANTIBIÓTICOS	14
TABELA 05 -ATIVIDADE ESPECÍFICA DE β -GALACTOSIDASE DAS 22 ESTIRPES MUTANTES COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA PRESENÇA DE 20 mmol/L DE NH ₄ Cl	31
TABELA 06 -IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE <i>H. seropedicae</i> REGULADOS POR NARINGENINA	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – adenosina difosfato

AIA – ácido indolacético

APS – persulfato de amônio

ATP – adenosina trifosfato

BSA – albumina de soro bovino

C- carbono

COG – *Clusters of Orthologous Groups*

DNA – ácido desoxiribonucleico

dNTP – desoxinucleosídeos trifosfato

D.O._n – densidade óptica a *n* nanômetros

DTT – ditioneitol ou *threo* 1,4-dimercapto-2,3-butanodiol

EDTA – ácido etilendiamino-tetra-acético

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay* ou enzima-imuno ensaio

EPS – exopolissacarídeos

kb – quilo pares de bases

LPS - lipopolissacarídeos

LRC- rachaduras das raízes laterais

NAD – nicotinamida dinucleotídeo

NTP – nucleotídeo trifosfato

ONP – *o*-nitrofenol

ONPG – *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo

ORF – “*open reading frame*” ou seqüência codificadora de proteína

p. - probabilidade

pb – pares de bases

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

RNA – ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

t – tempo

TEMED – N,N,N',N'-tetrametilenodiamina

TRIS – tris(hidroximetil)-aminometano

TTSS – sistema de secreção do Tipo III

UDP – uracila difosfato

UV- ultravioleta

V – volume

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

[prot] – concentração de proteína em mg/mL

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica e endofítica, encontrada associada ao milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), e também à algumas espécies tropicais como a bananeira (*Musa spp*) e o abacaxizeiro (*Ananas comosus*). A interação *H. seropedicae*-planta pode trazer mútuos benefícios, como estimular o desenvolvimento da planta e contribuir com nitrogênio fixado. Neste trabalho estirpes mutantes foram construídos pela inserção aleatória no cromossomo da estirpe selvagem SMRI, de um transposon artificial (plasposon) (pTnMod-OGmKmlacZ) contendo um gene marcador *lacZ* e um gene que confere resistência à canamicina. Foram obtidos doze mil mutantes aleatórios de *H. seropedicae* SmR1. O gene *lacZ* não possui promotor, assim a expressão da β -galactosidase depende da presença do promotor a montante do ponto de inserção, o que permite a análise da expressão do gene mutagenizado em diferentes condições de crescimento. Os mutantes obtidos foram analisados quanto a expressão diferencial na presença do flavonóide naringenina. De cinco mil estirpes analisadas na presença ou ausência de naringenina e NH_4Cl (20mmol/L) como fonte de nitrogênio vinte duas estirpes apresentaram expressão diferencial. Destas vinte e duas estirpes doze tiveram os genes mutados identificados e analisados. Os genes mutados que apresentaram expressão diferencial foram identificados por seqüenciamento e comparação com o banco de dados do Programa Genoma do Paraná (GENOPAR). Dez genes regulados negativamente na presença do flavonóide e dois regulados positivamente foram seqüenciados. A comparação com o banco de dados Genopar mostrou que o produto dos genes identificados pode estar relacionado com: o metabolismo de EPS e LPS, a estrutura da membrana externa, sistemas de secreção de proteínas e também com a síntese de alguns compostos, como o ácido indolacético. Estes genes regulados pelo do flavonóide naringenina podem estar relacionados diretamente com a colonização de plantas por *H. seropedicae*.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is a diazotrophic bacterium belonging to β subdivision of the Proteobacteria. This bacterium is found in endophytic association with maize (*Zea mays*), rice (*Oriza sativa*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and sugar cane (*Saccharum officinarum*). Such associations must involved molecular communication between the host plant and bacteria, resulting in modification in the gene expression patterns of both partners. To identify *H. seropedicae* genes regulated in response to plant signals, a collection of random insertion mutants were constructed by introducing an artificial transposon (plasposon) (pTnMod-OGmKmlacZ) carrying a promoter-less *lacZ* gene and the kanamycin resistance gene. Twelve hundreds *H. seropedicae* strain SmR1 random mutant strains were obtained. Since the gene *lacZ* does not have a promoter, beta-galactosidase activity of the mutant strains is dependent on the promoter activity of the insertionally mutagenized gene. The mutant strains were isolated and screened for differential expression in the presence or absence of naringenin. Twenty two *H. seropedicae* genes are regulated by naringenin when the bacteria was grown in 20mmol/L NH_4Cl . These genes are being identified by similarity search in Paraná Genome Program (GENOPAR) DNA databases. Twelve genes with differential expression were sequenced. Ten were negatively regulated in flavonoid presence and two positively regulated. The products of the *H. seropedicae* genes regulated by naringenin seem to be involved in different cellular processes like: EPS and LPS metabolism, membrane components, secreted proteins and biosynthesis of compounds like indolacetic acid. These genes regulated by naringenin could be involved in the *H. seropedicae*:plant interaction.

1.INTRODUÇÃO

1.1 FLAVONÓIDES

Raízes de plantas exsudam uma enorme variedade de pequenas moléculas que atuam na interação das plantas com a rizosfera. Estas interações incluem interação raiz-raiz, raiz-insetos e raiz-microrganismos, sendo esta última a mais dinâmica e complexa. Alguns dos compostos que atuam nesta interação são os flavonóides (BAIS *et al.*, 2006).

Os flavonóides são pigmentos hidrossolúveis presentes nos vacúolos e representam o maior grupo de compostos fenólicos vegetais. Mais de 4.000 diferentes flavonóides foram encontrados exsudados tanto da parte aérea quanto das raízes e provavelmente são os metabólitos secundários das plantas mais intensivamente bem estudados (HUNGRIA, 1994; LEPINIEC *et al.*, 2006).

Os flavonóides são produtos da via biossintética de fenilpropanóides sintetizados a partir de fenilalanina e malonil-CoA. Chalcona sintase (CHS) é a enzima chave do metabolismo de fenilpropanóides facilitando a reação. O primeiro passo da via dos flavonóides é a síntese de um derivado de chalcona, 4,2',4',6-tetrahidroxiclacona, que a partir deste irá gerar uma variedade de flavonóides e produtos derivados (Figura 01) (REDDY *et al.*, 2007).

Estruturalmente, flavonóides são compostos poliaromáticos com um esqueleto básico de 15 carbonos, que são arranjados em três anéis denominados A, B e C (Figura 02). Os flavonóides diferem entre si de acordo com o tipo de ligação nos anéis, posição e natureza dos substituintes (hidroxil, metil, glicosil) (LEPINIEC *et al.*, 2006; REDDY *et al.*, 2007; SHAW, MORRIS & HOOKER, 2006). Devido a essas variações na estrutura os flavonóides podem ser divididos em várias classes. As seis classes consideradas principais são mostradas na Figura 03 (AGUIAR, *et al.*, 2007).

FIGURA 01 – VIA DE SÍNTESE DE FENILPROPANÓIDES

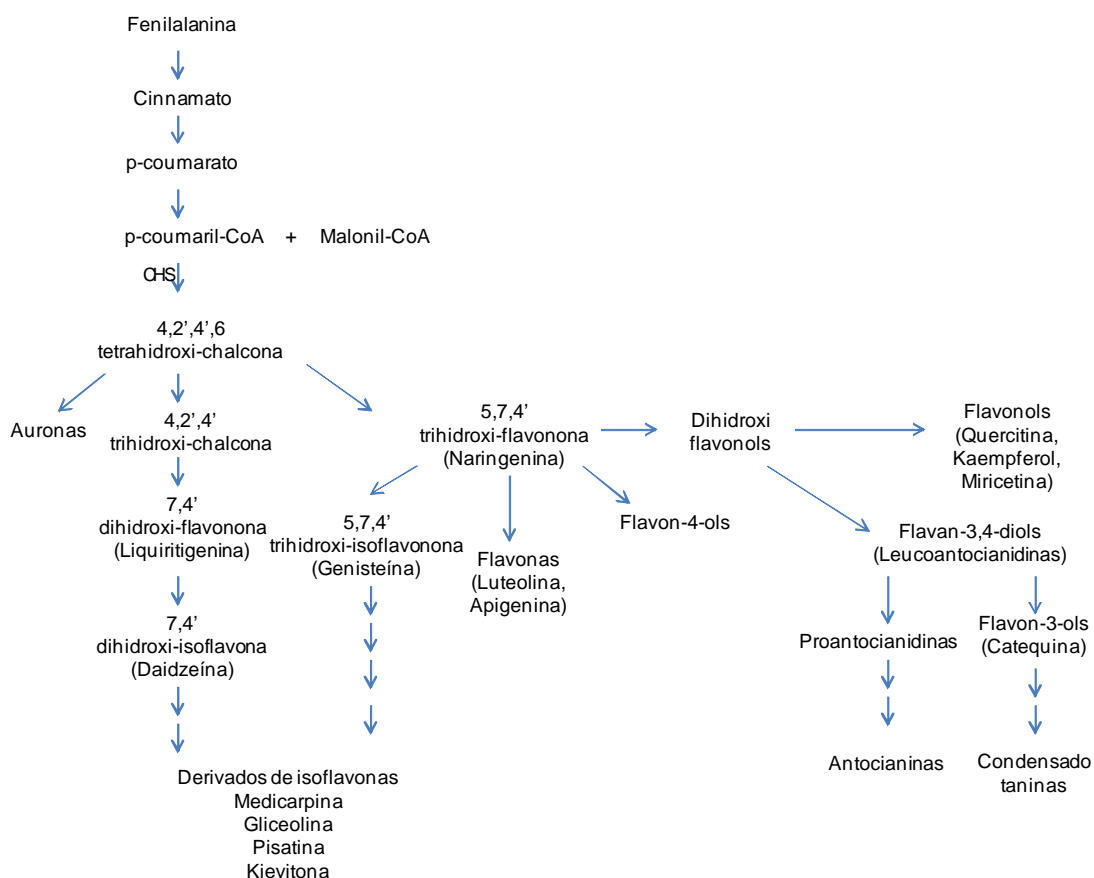
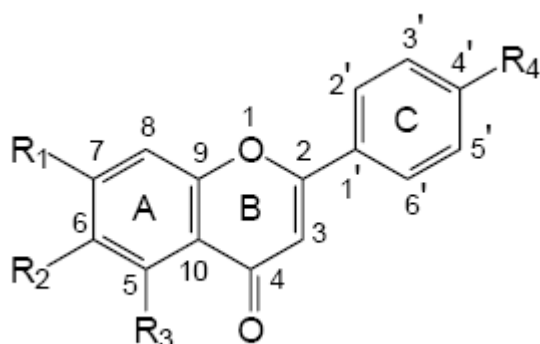


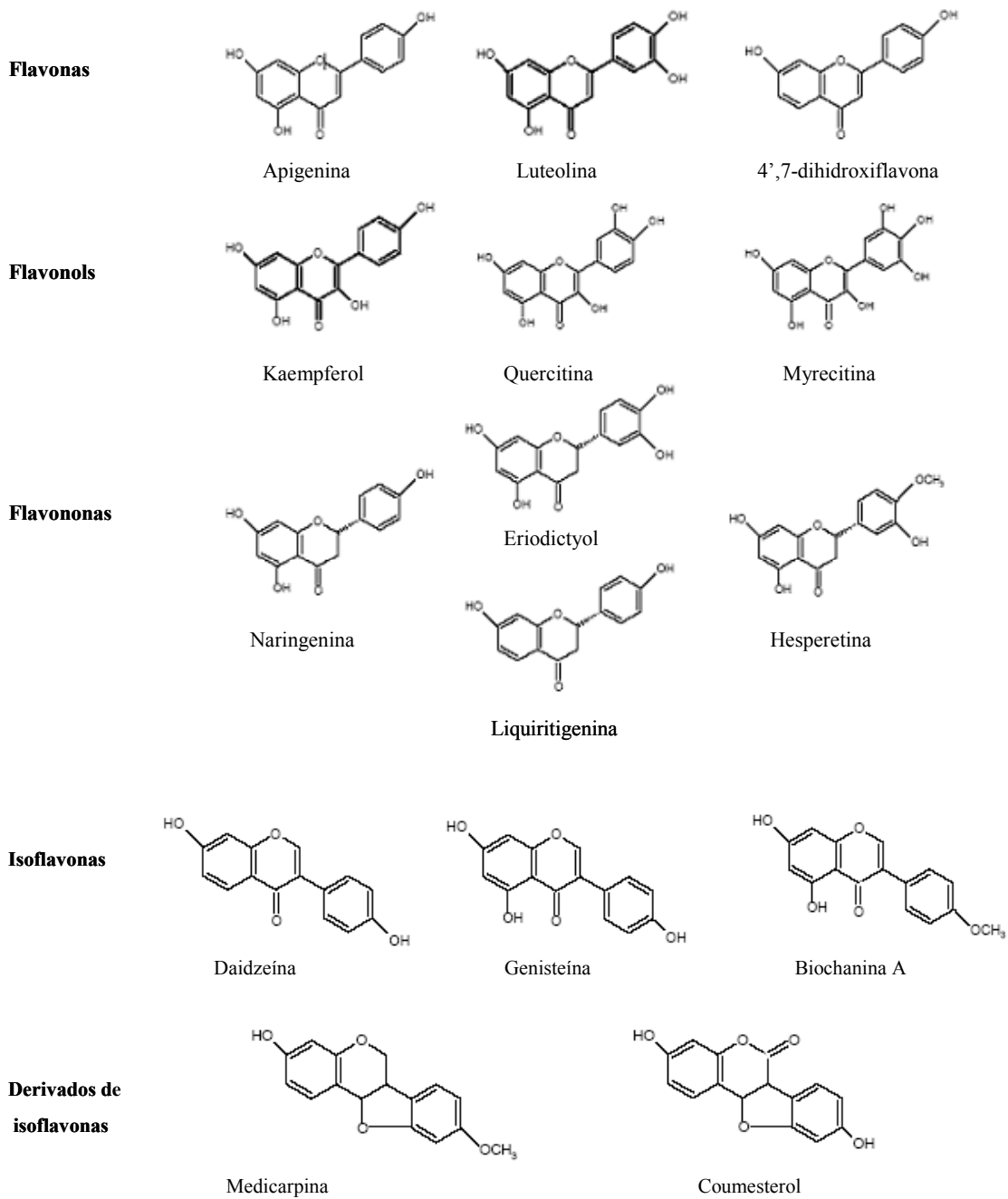
Diagrama parcial da via de síntese de fenilpropanóides mostrando os intermediários na biossíntese dos flavonóides. Fonte: Adaptado de Reddy e colaboradores, 2007.

FIGURA 02 – ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONÓIDE



Estrutura básica dos flavonóides, representando os três anéis e as regiões onde se encontram os substituintes que diferem nas classes derivadas dos flavonóides. Fonte: Aguiar *et al.*, 2007.

FIGURA 03 – CLASSES DE FLAVONÓIDES



Estrutura representativa das principais classes de flavonóides: flavononas, isoflavonas, flavonas e flavonols. Fonte: Adaptado de Reddy e colaboradores, 2007.

Os flavonóides atuam durante a reação de fotossíntese, protegendo as células das folhas contra injúrias foto-oxidativas, protetores contra a radiação UV, estão envolvidos com o desenvolvimento e reprodução das plantas, e também podem agir como substâncias quimiotáticas que são reconhecidas por polinizadores e microrganismos (HUNGRIA, 1994; HAVSTEEN, 2002; LEPINIEC *et al.*, 2006; REDDY *et al.*, 2007).

Outra função importante dos flavonóides é que eles afetam o modo como as plantas interagem com outros organismos, tais como bactérias simbióticas que vivem dentro das raízes da planta e microrganismos patogênicos. Por exemplo, os flavonóides liberados de raízes de leguminosas podem estimular ou inibir respostas genéticas específicas nas diferentes bactérias a ela associadas (SHAW, MORRIS & HOOKER, 2006).

1.1.1 Efeito dos flavonóides na interação planta bactéria

A interação planta-bactéria pode ser de três tipos: simbiótica, fitopatogênica e associativa. A interação simbiótica, exemplificada pela interação *Bradyrhizobium*-soja, caracteriza-se pelo favorecimento mútuo. Nesse caso, o microsimbionte é capaz de fixar o nitrogênio atmosférico, cujo produto pode ser utilizado pelo macrosimbionte, em troca de proteção e nutrientes. Na interação fitopatogênica, os microrganismos desenvolveram métodos específicos de ataque às células do hospedeiro em que utilizam substâncias produzidas pela planta em seu benefício e, neste caso, a diversidade de interações é maior. Nas interações associativas, o microrganismo é mais favorecido, mas não causa danos a planta associada. A bactéria pode viver no exudato, ou mesmo no interior da planta, e, como recompensa, protege a planta suprimindo patógenos ou estimula o crescimento vegetal através de produção de substâncias específicas (PÜHLER *et al.*, 2004).

Qualquer que seja o tipo de interação bactéria-planta os flavonóides parecem estar relacionados com a resposta do microrganismo em relação a planta.

Na interação simbiótica encontramos as bactérias indutoras de nódulos radiculares, pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, entre outros. Estas bactérias são capazes de se associarem em simbiose altamente organizada com a planta hospedeira de espécies de leguminosas. Este processo de nodulação é controlado pela troca de sinais entre a bactéria simbiote e a planta hospedeira (MERCANTE *et al.*, 2002).

Os flavonóides ativam a proteína NodD, que ativa a transcrição de outros genes envolvidos na síntese de lipo-quito-oligossacarídeos, chamado de fatores Nod (GOTTFERT *et al.*, 1993). Os fatores Nod são produzidos através da ação dos produtos dos genes *nod*, *noe* e *nol* (MERGAERT *et al.*, 1997). Uma grande variedade de flavonóides (chalconas, flavononas, isoflavonas e flavonols) está envolvida na indução dos genes *nod* (SHAW, MORRIS & HOOKER, 2006).

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

Além dos genes *nod* que são essenciais para formação dos nódulos, existem outros genes que influenciam a simbiose entre a planta e o rizóbio, como é o caso dos genes que codificam para o sistema de secreção do Tipo III e também dos genes relacionados com a biosíntese de polissacarídeos extracelulares.

O sistema de secreção Tipo III (TTSS) injeta proteínas nas células hospedeiras sem a necessidade de causar nenhum processo proteolítico. As proteínas secretadas por esse sistema têm como função regular a secreção de outras proteínas, facilitar a translocação das proteínas secretadas para as células hospedeiras e alterar diretamente as funções e estruturas das células hospedeiras (GREENBERG & VINATZER, 2003). Como consequência as proteínas codificadas por esses genes permitem a colonização, crescimento patogênico e exploração da planta (LONG & STASKAWICZ, 1993).

O sistema de secreção do Tipo III foi primeiramente identificado em bactérias patogênicas de plantas e animais posteriormente, foi também encontrado em organismos associativos como *Pseudomonas fluorescens* (MARIE *et al.*, 2001; PÜHLER *et al.*, 2004). Os genes *hrp* codificam proteínas que formam o sistema de secreção do tipo III, e são responsáveis pela transferência de proteínas através da membrana bacteriana e da membrana plasmática da célula hospedeira (BUTTNER & BONAS, 2002).

Em *Rhizobium* NGR234 a expressão do sistema de secreção do Tipo III é ativado pela proteína NodD que responde a flavonóides. Os genes do TTSSs são expressos no estágio intermediário da simbiose, depois dos genes *nod*, mas antes dos genes *fix* e *nif* (estes últimos responsáveis pela fixação de nitrogênio). Isto indica que os genes TTSS não são requeridos para a fixação de nitrogênio, mas sim para a infecção pela bactéria (VIPREY *et al.*, 1998).

Os flavonóides também estão envolvidos na regulação da expressão de genes envolvidos com a síntese de exopolissacarídeos (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS) (PERRET *et al.*, 2000).

Alterações na estrutura dos EPS e LPS podem dificultar a invasão da planta hospedeira (LONG & STASKAWICZ, 1993). Moléculas complexas supostamente participam dos estágios iniciais de colonização, uma vez que compõem a estrutura que realiza o primeiro contato com o hospedeiro. Mutações nos genes envolvidos com a síntese destes compostos, *exo* (EPS) e *lps* (LPS) podem afetar o processo de infecção de várias maneiras, como, por exemplo, impedindo a formação dos cordões de infecção e resultando na formação de nódulos vazios (ARNOLD *et al.*, 1994, *apud* MERCANTE *et al.*, 2002).

Os lipopolissacarídeos (LPS) são os principais constituintes do envoltório de bactérias gram-negativas e são constituídos por três regiões: lipídeo A, núcleo de oligossacarídeos e polissacarídeo O (antígeno O). O lipídeo A contém uma região hidrofóbica ancorada a membrana e é o componente bioativo, responsável por algumas fisiopatologias associadas com infecção severa por gram-negativos em humanos e outros animais. O núcleo de oligossacarídeos consiste de uma pequena cadeia de açúcares que conecta o lipídeo A ao antígeno O, e pode ser dividido em região externa e interna. O antígeno O junta o núcleo de polissacarídeos e conecta o LPS com o ambiente. Ele consiste na repetição de unidades de polissacarídeos. A cadeia pode variar no comprimento, contendo até 40 unidades repetitivas, e na constituição de açúcares. A variação estrutural dos antígenos O contribui para a variedade de espécies e até mesmo estirpes de bactérias gram-negativas (LEROUGE & VANDERLEIDEN, 2001).

A correta estrutura de LPS é essencial para o estabelecimento da interação hospedeiro/bactéria, da infecção em patógenos ou benefícios mútuos em simbioses. A expressão de genes que regulam a variação estrutural do O-antígeno pode ser modulada em respostas a sinais enviados pelo hospedeiro, como é o caso dos flavonóides. Flavonóides, como apigenina, são capazes de regular a via de síntese de ramnose presente nos LPS em *Rhizobium* NGR234 (LEROUGE & VANDERLEIDEN, 2001; BROUGHTON *et al.*, 2006)

A associação de bactérias endofíticas com raízes de plantas não resulta na formação de estruturas vegetais facilmente detectáveis. Por causa desta falta de um fenótipo claro, devido principalmente a dispersão da bactéria por todo o corpo da planta,

os mecanismos de interação e estimulação de crescimento vegetal por estas bactérias são pouco conhecidos.

Os organismos endofíticos passam a maior parte do seu ciclo de vida dentro de tecidos de plantas sem causar dano detectável a estas (QUISPEL, 1992). Entre os microrganismos endofíticos encontramos os organismos diazotróficos endofíticos (fixadores de nitrogênio) que tem como representantes os gêneros *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia* e *Azoarcus* (BALDANI *et al.*, 1997). Estes microrganismos endofíticos podem ser classificados em dois grupos: facultativos e obrigatórios. Os facultativos são descritos como bactérias que sobrevivem no solo e também são capazes de colonizar o interior das plantas, como por exemplo, algumas estirpes de *Azospirillum*. Os endofíticos obrigatórios, por sua vez, são os que apresentam baixa sobrevivência no solo, habitando preferencialmente o interior do tecido vegetal. Exemplos destes são *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, e *Burkholderia* (BALDANI *et al.*, 1997).

Alguns estudos mostram que flavonóides como naringenina e daidzeína estimulam a colonização através das rachaduras das raízes laterais (LRC) em *H. seropedicae*, embora não tenha sido demonstrada a presença de genes responsivos aos flavonóides neste organismo (GOUGH *et al.*, 1997).

1.2 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica endofítica, gram-negativa, vibrióide, membro da subdivisão β das Proteobactérias (BALDANI *et al.*, 1986). Esta bactéria foi encontrada associada ao milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e cana de açúcar (*Saccharum officinarum*). *H. seropedicae* também foi encontrado em espécies tropicais como a bananeira (*Musa spp.*) e abacaxizeiro (*Ananas comosus*) (BALDANI *et al.*, 1986; PIMENTEL *et al.*, 1991; CRUZ *et al.*, 2001).

O início da associação entre arroz e *H. seropedicae* ocorre através da adesão da bactéria à superfície das raízes, seguida de proliferação, preferencialmente nas raízes secundárias e ferimentos da epiderme, penetração e espalhamento da bactéria através dos espaços intercelulares e feixes vasculares das partes aéreas com subsequente colonização e estabelecimento nos vasos do xilema (JAMES *et al.*, 1997). Esta

associação *Herbaspirillum*-planta pode trazer mútuos benefícios. Baldani e colaboradores (1995) inocularam diferentes estirpes de *Herbaspirillum spp.* em sementes de arroz e observaram que a estirpe Z94 contribui com até 54% do nitrogênio total acumulado pela planta; as outras estirpes também contribuíram com aproximadamente 30% do nitrogênio.

Os resultados descritos acima indicam que *H. seropedicae* tem grande potencial como biofertilizante nitrogenado, além de produzir compostos que podem estimular o desenvolvimento das plantas pela produção de fitohormônios (BASTIÁN *et al.*, 1998).

Os genes responsáveis pela interação planta-*H. seropedicae* ainda não são conhecidos mas acredita-se que expressão de genes induzidos por flavonóides pode vir a elucidar alguns dos mecanismos ainda não descritos. Genes potencialmente envolvidos na interação planta-*H. seropedicae* foram identificados no banco dados do projeto de seqüenciamento de *H. seropedicae* (Projeto GENOPAR <www.genopar.org>). Até o presente momento, foram encontrados genes envolvidos na biossíntese de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos, ácido indolacético e giberilinas, genes relacionados a comunicação molecular com o hospedeiro, genes homólogos aos de nodulação e genes do Sistema de Secreção do Tipo III.

1.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL

Os microrganismos têm a capacidade de se adaptar rapidamente a mudanças no ambiente, e os que não mostram tal característica podem ser eliminados. O fundamento para a sobrevivência bacteriana em condições de ambiente variáveis é a sua capacidade de se adaptar a diferentes situações relacionadas com as mudanças de expressão de um determinado conjunto de genes (JAIN *et al.*, 2006).

Estudos recentes mostraram que estratégias de mutagênese aleatória foram muito eficientes na identificação de genes e elucidação de suas funções. Metagênese aleatória é especialmente utilizada para espécies de bactérias com descrição genética pobre ou quando outros modelos moleculares são inadequados (DENNIS & ZYLSTRA, 1998).

A metodologia de mutagênese aleatória utilizando transposon com gene repórter sem promotor tem sido amplamente utilizada para determinar padrões de expressão diferencial de genes em bactérias. Baseando-se nesta metodologia, foi desenvolvido um procedimento para a identificação de genes de *H. seropedicae* regulados em resposta à diversas condições, que envolveu a construção de um plasmídeo mutagênico. O

procedimento permite a identificação de genes distintos regulados de acordo com a condição escolhida (SCHWAB *et al.*, 2007).

Este trabalho representa uma primeira etapa na identificação de genes do microrganismo *H. seropedicae* expressos durante a colonização celular. Os genes envolvidos neste processo ainda são desconhecidos e para identificação destes, as estirpes mutantes foram crescidas na presença do flavonóide naringenina, condição que pode mimetizar as condições encontradas durante a interação da bactéria com a planta.

2. OBJETIVOS

Identificar genes de *H. seropedicae* cuja expressão é regulada por naringenina.

Objetivos específicos:

- Construir 10.000 mutantes aleatórios de *H. seropedicae* contendo o transposon TnMod-OGmK*lacZ* utilizando o plasmídeo pTnMod-OGmK*lacZ*;
- Determinar a expressão do gene *lacZ* na presença do flavonóide naringenina em 5.000 estirpes mutantes;
- Identificar os genes mutados após clonagem e seqüenciamento da região da inserção do TnMod-OGmK*lacZ* pela comparação como banco de dados do Programa Genoma do Paraná (GENOPAR).
- Caracterizar funcionalmente os genes identificados.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 BACTÉRIAS E PLAMÍDEOS

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

TABELA 01 –*Herbaspirillum seropedicae*

Estirpe	Referência
SmR1	MACHADO <i>et al.</i> ; 1996.

TABELA 02 –*Escherichia coli*

Estirpe	Referência
S17.1	SIMON <i>et al.</i> , 1983
DH10B	GRANT <i>et al.</i> , 1990
Top10	INVITROGEN

TABELA 03 - PLASMÍDEOS

Plasmídeo	Características	Origem – Referência
pTnMod- OGmKmlacZ	Km ^R , Gm ^R , lacZ sem promotor	SCHWAB <i>et al.</i> , (2007)

3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37°C em meio Luria-Broth (LB) e Luria-Broth agar (LA) (SAMBROOK *et al.*, 1989). O meio sólido (LA) foi obtido pela adição de ágar (15g/L) ao meio líquido (LB).

O meio LB possui a seguinte composição:

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

As estirpes de *E. coli*, para preparação de células eletrocompetentes, foram cultivadas a 37°C em meio SOB. Após o choque elétrico as células foram recuperadas e meio SOC a 37°C (HANAHAN *et al.*, 1983).

O meio SOB possui a seguinte composição:

Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de sódio	$5,84 \times 10^{-1}$ g/L
Cloreto de potássio	$1,86 \times 10^{-1}$ g/L
Triptona	20 g/L
pH	7,0

O meio SOC possui a seguinte composição:

Extrato de levedura	5 g/L
Glucose	3,6 g/L
Cloreto de sódio	$6,0 \times 10^{-1}$ g/L
Cloreto de potássio	$1,9 \times 10^{-1}$ g/L
Cloreto de magnésio	$9,4 \times 10^{-1}$ g/L
Sulfato de magnésio	1,2 g/L
Triptona	20 g/L

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas a 30°C sob agitação constante em meio NFbHP, utilizando malato (KLASSEN *et al.*, 1997) ou lactato (MACHADO *et al.*, 1995) como fonte de carbono e 20 mmol/L ou 2 mmol/L de NH₄Cl como fonte de nitrogênio. A sigla NFbHP refere-se a composição do meio, onde HP significa alto fosfato.

O meio NFb malato apresenta a seguinte composição:

MgSO ₄ .7H ₂ O	$2,0 \times 10^{-1}$ g/L
NaCl	$1,0 \times 10^{-1}$ g/L
CaCl ₂	$2,0 \times 10^{-2}$ g/L
Ácido nitrilo-triacético	$5,6 \times 10^{-2}$ g/L

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

O meio NFb lactato apresenta a seguinte composição:

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

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

A composição da solução de fosfatos é:

K ₂ HPO ₄ .	17,8 g/L
KH ₂ PO ₄	159,5 g/L

3.3 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados estão listados na Tabela 04.

TABELA 04 – ANTIBIÓTICOS

	Concentração utilizada na seleção de <i>H.</i> <i>seropedicae</i> (µg/mL)	Concentração utilizada para seleção de <i>E.</i> <i>coli</i> (µg/mL)
Ácido Nalidíxico (Nal)	5	10
Ampicilina (Amp)	-	250
Canamicina (Km)	500	50
Estreptomicina (Sm)	80	20
Gentamicina	160	20

As soluções de antibióticos, exceto gentamicina, foram preparadas em água destilada autoclavada e esterilizadas por filtração (Millipore 0,23 µm). A solução de gentamicina foi adquirida comercialmente. Todas as soluções de antibióticos foram mantidas a -20°C.

3.4 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

A purificação dos plasmídeos a partir das culturas bacterianas foi realizada pelo método de lise alcalina modificado (SAMBROOK et al., 1989). Um mililitro e meio de uma cultura cultivada durante aproximadamente 12 horas foi centrifugado a 13.400 rpm por 1 minuto. O sedimento de células foi ressuspensão em 150 µL de tampão GET (50 mmol/L glucose, 25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 10 mmol/L de EDTA pH 8,0). A lise foi feita utilizando 150 µL de solução de lise contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% e NaOH 180 mmol/L homogenizados vagarosamente. Em seguida 150 µL de acetato de potássio 3 mol/L foram acrescentados e após homogeneização a mistura foi mantida 15 minutos no gelo. As amostras foram então centrifugadas a 13.400 rpm por 5

minutos. O sobrenadante foi misturado com 150 µL de clorofórmio álcool-isoamílico (24:1) e a mistura centrifugada a 13.400 rpm por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol, seguido de centrifugação a 13.400 rpm por 5 minutos. O DNA plasmidial foi lavado com 1 mL de etanol 70% centrifugada a 13.400 rpm por 5 minutos, seco e dissolvido em água ultrapura.

3.5 CONSTRUÇÃO DE MUTANTES ALEATÓRIOS DE *H. seropedicae* UTILIZANDO O PLASMÍDEO pTnMod-OGmKmlacZ.

Os mutantes aleatórios foram obtidos através de inserção aleatória do transposon no genoma do microrganismo. Para isso foi utilizado o plasmídeo pTnMod-OGmKmlacZ (SCHWAB *et al.*, 2007).

O plasmídeo foi introduzido por conjugação (NOINDORF, 2006) na estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. Os mutantes foram selecionados na presença dos antibióticos canamicina e gentamicina.

3.6 CONJUGAÇÃO

A estirpe de *E. coli* S17.1 (doadora) contendo o plasmídeo pTnModOGmKmlacZ e a estirpe SmRI de *H. seropedicae* (receptora) foram cultivadas em meio próprio por 16 horas, sob temperatura adequada e agitação constante. As estirpes foram re-inoculadas numa proporção 1/50 (receptora) e 1/100 (doadora) e cultivadas em meio sem antibiótico, sendo que a receptora por 6 horas e a doadora por 3 horas, sob agitação constante e temperatura adequada.

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

3.7 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

3.7.1 Preparo de células de *E. Coli* eletrocompetentes

Duzentos mililitros de meio SOB foram inoculados com 5 mL de uma cultura saturada de *E. Coli* e incubados sob agitação a 37°C, até atingir uma D.O₆₀₀ de 0,5. Após crescimento, a cultura foi mantida no gelo durante 30 minutos e, em seguida, centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos. As células foram lavadas duas vezes com 50 mL de H₂O estéril gelada, sendo então ressuspensas em 50 mL de glicerol 10%. Após centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos, o sedimento de células foi ressuspenso em aproximadamente 0,5 mL de glicerol 15 %. A suspensão celular foi fracionada em alíquotas de 100 µL e utilizadas ou armazenada a -70°C.

3.7.2 Eletroporação

O método utilizado para transformação bacteriana foi o descrito pelo fabricante (Gibco-BRL- Invitrogen), 1 µL da mistura da ligação foi adicionada a 40 µL ou 100 µL da suspensão de células eletrocompetentes. Em seguida essas células foram transferidas para um cubeta de eletroporação (BRL) sendo submetidas a um campo elétrico (4 KΩ, 330 µF) para permitir a entrada do plasmídeo na célula. Após a eletroporação as células foram ressuspensas em 1 mL de SOC e incubadas a 37°C, sob agitação por 1 hora. Após a incubação, alíquotas da suspensão foram plaqueadas em meio LA contendo os antibióticos adequados a fim de selecionar os transformantes.

3.8 ARMAZENAMENTO DE BACTÉRIAS

A suspensão de células das estirpes de *E. coli* e *H. seropedicae* foi estocada em glicerol 50% a -20°C e a -80°C.

Algumas estirpes de *H. seropedicae* foram estocadas em meio NFb-Malato semi-sólido suplementado com 20 mmol/L de NH₄Cl, a temperatura ambiente.

3.9 IDENTIFICAÇÃO DE MUTANTES EM GENES REGULADOS POR NARINGENINA

A expressão de genes regulados por naringenina foi analisada pela determinação da atividade de β -galactosidase de mutantes aleatórios crescidos em meio sólido e em meio líquido.

A atividade de β -galactosidase em meio sólido foi determinada devido a degradação do substrato X-gal em galactose e um produto insolúvel de cor azul o que causa uma mudança de coloração da colônia de branca para azul. A intensidade da cor azul indica um aumento ou diminuição da expressão da enzima β -galactosidase.

Para a determinação da atividade de β -galactosidase de culturas crescidas em meio líquido foi utilizado como substrato o ONPG e os produtos gerados são galactose e *o*-nitrofenol que pode ser quantificado por um método colorimétrico.

3.9.1 Triagem em meio sólido de mutantes em genes regulados por naringenina.

A expressão gênica regulada por naringenina foi avaliada pela determinação da atividade de β -galactosidase em meio sólido na presença de 2 mmol/L de NH_4CL (baixo nitrogênio) e na presença de 20 mmol/L de NH_4CL (alto nitrogênio).

Os mutantes foram cultivados em placas de 96 poços contendo NFbHPN lactato com 0,7% de ágar, a 30°C pelo tempo mínimo de 48 horas. Após este período os mutantes foram re-inoculados em quatro placas distintas A, B, C e D. Todas as quatro placas continham meio NFbHP lactato, X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosídeo) (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), canamicina (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e gentamicina (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As placas A e B continham 2 mmol/L de NH_4CL , as placas C e D 20 mmol/L de NH_4CL . Além disso as placas B e D também continham 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ de naringenina

Para determinar quais mutantes tinham o gene regulado por naringenina foi feita a comparação visual das placas crescidas na ausência e presença deste composto, placas A e B (2 mmol/L de NH_4CL) e placas C e D (20 mmol/L de NH_4CL).

3.9.2 Triagem em meio líquido de mutantes em genes regulados por naringenina

3.9.2.1 Determinação da atividade de β -galactosidase em bloco de 96 poços.

O método utilizado foi descrito por SCHWAB (2002) com algumas adaptações.

As estirpes mutantes foram crescidas em bloco de 96 poços contendo 1,250 mL de meio líquido NFbHPN malato com canamicina (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e gentamicina (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sob agitação (120 rpm) à 30°C durante 12-14 horas. As culturas foram re-inoculadas em 4 blocos distintos A, B, C e D. Todos os blocos continham 1,250 mL de meio líquido NFbHP malato com canamicina (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e gentamicina (160 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ao meio líquido dos blocos A e B foi adicionado 2mmol/L de NH_4Cl e dos blocos C e D foi adicionado 20mmol/L de NH_4Cl . O meio de cultura dos blocos B e D ainda continham 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ de naringenina. Estes blocos foram incubados à 30°C durante 12 a 14 horas sob agitação constante.

Para o ensaio de atividade de β -galactosidase foram utilizados blocos contendo trezentos e oitenta microlitros de mistura de tampão Z (SDS 0,27% e β -mercaptaetanol 0,39% em $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mmol/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mmol/L, KCl 10 mmol/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mmol/L, pH 7,0) em cada poço. Aos poços foi adicionado 20 μL de cultura e 25 μL de clorofórmio. O bloco foi vedado com uma tampa adesiva, a mistura homogenizada em agitador de placas (cerca de 2 minutos), centrifugada brevemente e estabilizada em banho-maria a 30°C, por 10 minutos. Para iniciar a reação 80 μL de solução de *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG 4 mg/mL em tampão Z) foram adicionados e após visualização de coloração amarela a reação foi interrompida pela adição de 200 μL de uma solução de Na_2CO_3 1 mol/L. O bloco de reação foi centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos. Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para uma placa de fundo chato para a leitura da D.O.₄₁₅ no leitor de microplacas (Elx800 – Universal Microplate Reader). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A atividade específica de β -galactosidase foi dada em nanomoles de ONP formado por minuto por miligrama de proteína total (nmol ONP/min/mg proteína).

3.9.2.2 Determinação da atividade de B-galactosidase em tubo.

O protocolo para determinar a atividade de β -galactosidase em tubo de uma cultura foi descrito por NOINDORF (2006). As estirpes mutantes foram crescidas a 30°C durante 12 horas em 5 mL de meio NFbHP malato contendo 2 mmol/L ou 20 mmol/L de NH_4Cl na presença ou ausência de naringenina. 100 μL desta cultura foram misturados com 900 μL de tampão Z e 50 μL de clorofórmio e incubados por 10 minutos à 30°C. Foram adicionados 200 μL *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG 4 mg/mL em tampão Z) para disparar a reação e após visualização de coloração amarela a reação foi interrompida pela adição de 500 μL de uma solução de Na_2CO_3 1 mol/L. Os tubos de reação foram centrifugados a 13.400 rpm por 5 minutos e então a leitura de densidade ótica foi feita a 420 e 550 nm.

A atividade específica de β -galactosidase foi dada em nanomoles de ONP formado por minuto por miligrama de proteína total (nmol ONP/min/mg proteína).

3.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.

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

3.10.1 Determinação da concentração de proteína em bloco de 96 poços

Alíquotas de 50 μL de cultura de *H. seropedicae* foram transferidas para os poços de um bloco de 96 poços contendo 50 μL de NaOH 0,2 mol/L. O bloco foi vedado com adesivo, a solução homogenizada suavemente e incubada por pelo menos 30 minutos a 37°C. Após incubação, foram adicionados 900 μL de reativo de Bradford (100 mg de Coomassie blue G-250 dissolvido em 50 mL de etanol, 100 mL de ácido fosfórico 85% e completar para 1 L com H_2O), desta solução foram transferidos 200 μL para placas de ELISA para leitura da D.O.₅₉₅ em leitor de microplaca. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A curva padrão foi obtida utilizando BSA em concentrações de 0,6 μg até 6 μg .

3.11 PURIFICAÇÃO DE DNA CROMOSSOMAL DE *H. seropedicae*.

Dez mililitros de uma cultura de células de *H. seropedicae* cultivada durante 12-16 horas foram centrifugados por 10 minutos a 5.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 µL de solução de GET. A suspensão de células foi incubada com lisozima (10 µg/mL) a 30°C durante 5 horas, seguido da adição de 50 µL de SDS 10% e incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Ao lisado celular foi acrescentado 200 µg/mL de pronase e a mistura foi incubada a 37°C por 16 horas. A desproteíntização foi feita pelo tratamento com 250 µL de fenol equilibrado (pH 8,0); 250 µL de fenol-clorofórmio álcool isoamílico (25:24:1); 250 µL de clorofórmio álcool isoamílico (24:1). O DNA presente na fase aquosa foi então precipitado pela adição de 3 volumes de etanol 96%. Após a centrifugação o etanol foi descartado e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80%. O precipitado foi seco em bomba de vácuo ou em estufa a 37°C e dissolvido em 100 ou 200 µL de água ultrapura autoclavada.

3.12 CLIVAGEM DO DNA COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO.

A digestão do DNA com enzima de restrição foi feita segundo protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (1989) ou pelo fabricante. Para clivagem completa do DNA cromossomal (2 µg) foi utilizada a enzima *NarI* e o sistema de restrição foi incubado a 37°C por 12 horas.

3.13 ELETROFORESE DE DNA

A determinação do perfil eletroforético dos plasmídeos ou do DNA cromossomal foi feita por eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Após a eletroforese, os géis foram corados com solução de brometo de etídio (EtBr) a 0,5 µg/mL. O complexo DNA-EtBr foi observado em transiluminador de ultravioleta e a imagem foi registrada eletronicamente.

3.14 CLONAGEM DOS GENES MUTAGENIZADOS DE *H. seropedicae*

Após a digestão do DNA cromossomal com *NarI*, 200 ng de DNA foram tratados com 1 U de T4-DNA ligase em um volume final de 100 µL em tampão (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,6, MgCl₂ 10 mmol/L, DTT 1 mmol/L, ATP 1 mmol/L e PEG8000 5%). A mistura foi incubada a 4°C por 24-48 horas. O DNA do sistema de ligação foi precipitado com 3 volumes de etanol 96%, centrifugado por 30 minutos, lavado com 1 mL de etanol 70%, seco em bomba à vácuo e então foi dissolvido em 6 µL de água milli-Q. Dois microlitros desta solução foram utilizados para transformar células de *E. coli* por eletroporação.

3.15 SEQUENCIAMENTO DE DNA

3.15.1 Reação de seqüenciamento

O seqüenciamento de DNA foi realizado utilizando o método de didesoxinucleotídeos fluorescentes (KARGER *et al.*, 1991) em seqüenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems, EUA). Para a incorporação dos didesoxinucleotídeos foi feito um sistema de reação contendo 300 ng de DNA, 5 pmol de oligonucleotídeo iniciador complementar à seqüência de inserção do transposon (LACZ5', 5'-GCAAGGCGATTAAGTTGGGT-3', ou IR2, 5'-CGAACCGAACAGGCTTATGT-3') e 3 µL do reagente *DYEnamic ET terminator reagent premix* (GE Helthcare), em volume total de 7,5 µL. A reação de seqüenciamento foi feita em termociclador com as seguintes etapas: (95 °C, 1 min) × 1; [(94 °C, 20 s), (55 °C, 45s), (60 °C, 1,5 min)] × 35. O produto da reação foi precipitado adicionando-se 10 µL de H₂O Milli-Q, 2 µl de acetato de amônio 7,5 mol/L e 60 µl de etanol 96%, seguido de repouso por 30 min. A mistura foi centrifugada a 13.400 rpm por 20 min, desprezando depois o sobrenadante. O precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 80% e centrifugado a 13.400 rpm por 5 min.

Após secagem a vácuo, o precipitado resultante foi ressuscitado em 3 µL de tampão de aplicação. A corrida foi efetuada em gel desnaturante de poliacrilamida 5%.

3.16 COMPARAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS COM O BANCO DA DADOS GENOPAR E NCBI

As seqüências obtidas foram comparadas com o bando de dados do Programa Genoma do Paraná (GENOPAR) através do programa BLAST N e outros bancos de dados através do programa BLAST X (GenBank/NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov) (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

3.17 AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DAS ESTIRPES MUTANTES NA PRESENÇA DE SDS E POLIMIXINA

As estirpes mutantes foram avaliadas quanto ao crescimento na presença de polimixina 5 µmol/L e SDS 0,1%.

As estirpes foram crescidas em meio NFbHPN - Malato líquido durante aproximadamente 12 horas. Após este crescimento elas foram novamente inoculadas em meio NFbHPN - Malato líquido numa proporção 1/200, com antibióticos próprios, e crescidas por aproximadamente 12 horas a 30°C sob agitação constante. As estirpes crescidas foram então coletadas em amostras de 1 mL, feita a leitura de D.O.₆₀₀, e então diluídas. As diluições 10⁻⁷ foram plaqueadas em meio NFbHPN - Malato sólido e com antibiótico próprio. As placas foram incubadas a 30 °C e após 24h e 48h foram contados o número de colônias resultantes.

3.18 PERFIL DE LPS (LIPOPOLISSACARÍDEOS) DAS ESTIRPES MUTANTES

O perfil de lipopolissacarídeos das estirpes mutantes e selvagens foi verificado por eletroforese SDS-PAGE (BROUGHTON *et al.*, 2006) e coloração por prata (TSAI & FRASCH; 1982). Para extração do LPS total as estirpes foram crescidas em NFbHPN na presença ou ausência de naringenina. As células foram centrifugadas e o precipitado lavado com 1 mL de solução salina estéril, ressuspensão em 160 µL de tampão de lise (Tris/HCl 1 mol/L pH 6.8; 10% glicerol; 4% β-mercaptoetanol; 0,005% bromofenol azul) e fervido por 10 minutos. Foram adicionados a mistura 40 µL de SDS 10% e 8 µL de proteinase K seguido e a mistura foi incubada a 60°C por 16 horas. Após este

período 416 μL de tampão de aplicação (Tris-HCl 120 mM pH 6,8; 3% SDS; 30% glicerol; 9% β -mercaptoetanol; 0,03% bromofenol azul) foram adicionados e corrida eletroforética foi feita em gel SDS-PAGE 20% por aproximadamente 4 horas (LAEMMLI, 1970).

Para visualização das amostras, os géis foram corados com prata como descrito a seguir. Após a corrida o gel foi fixado por 16 horas em etanol 40% e ácido acético 5% seguido de incubação por 5 minutos com etanol 40%, ácido acético 5% e ácido periódico 0,7%. Os géis foram lavados 3X com H_2O destilada e o LPS foi corado com 50 mL de solução contendo 0,7 mL de NH_4OH , 9,5 mL de NaOH 0,1 mol/L e 300 mg de AgNO_3 . Os géis foram lavados com água destilada, e então revelados com 50 mL de solução contendo 25 mg de ácido cítrico e 250 μL de formaldeído 37%, lavados e armazenados com água destilada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

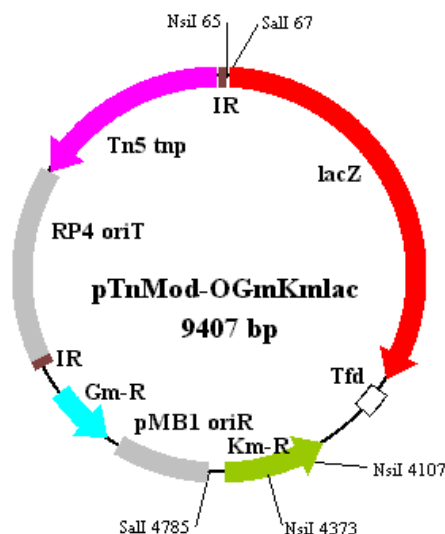
4.1 CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE MUTANTES ALEATÓRIOS DA ESTIRPE SMR1 DE *H. seropedicae*.

Para a construção de mutantes aleatórios foi utilizado o plasmídeo suicida pTnMod-OGmKmlacZ (SCHWAB *et al.*, 2007) (Figura 04) que possui um transposon contendo: um gene de resistência a gentamicina e outro a canamicina, uma origem de replicação *oriR*, e um gene reporter *lacZ* sem promotor. A inserção deste transposon no genoma da bactéria ocorre de maneira aleatória e a expressão do gene repórter *lacZ* é dirigida por possíveis promotores a montante da posição de inserção. Conseqüentemente, o transposon descrito serve como sonda para analisar alterações no perfil de expressão gênica em diferentes condições fisiológicas.

O plasmídeo pTnMod-OGmKmlacZ foi transferido para células de *H. seropedicae* conforme descrito (item 3.5), e os mutantes resistentes a gentamicina e canamicina foram selecionados. Neste trabalho foram obtidos um total 12.000 mutantes aleatórios pela inserção do transposon no genoma da estirpe SmR1 de *H. seropedicae*. As estirpes mutantes foram armazenadas em glicerol 50% a -70°C em placas de 96 poços.

As estirpes mutantes obtidas podem ser utilizadas para a identificação de genes expressos em diferentes condições fisiológicas. Schwab e colaboradores (2007) utilizaram este plasmídeo, com sucesso, para a seleção de genes de *H. seropedicae* regulados em resposta à disponibilidade de amônio no meio.

FIGURA 04 - MAPA FÍSICO DO PLASMÍDEO pTnMod-OGmKmlacZ (SCHWAB *et al.*, 2007)



Este plasmídeo foi utilizado para obtenção de uma coleção de mutantes aleatórios de *H. seropedicae* SmRI. Entre as IRs (seqüências repetitivas invertidas) está localizada a região que sofre transposição, contendo a *oriR*, o gene repórter *lacZ* e os genes que conferem resistência aos antibióticos canamicina e gentamicina.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DE MUTANTES EM GENES REGULADOS POR NARINGENINA

Estudos de interação planta/bactéria mostraram que o flavonóide naringenina (50 $\mu\text{mol/L}$) estimulou a colonização de *Arabidopsis thaliana* por *H. seropedicae* (GOUGH *et al.*, 1997) e a colonização intercelular em raízes de trigo por *Azorhizobium caulinodans* (WEBSTER *et al.*, 1998) Estes resultados sugerem que naringenina e/ou outros flavonóides secretados podem estar envolvidos no processo de colonização de plantas por microrganismos.

Para a identificação de genes de *H. seropedicae* regulados pelo flavonóide naringenina as estirpes mutantes contendo o TnMod-OGmKmlacZ foi cultivado na presença ou ausência de naringenina e a expressão do gene *lacZ* foi determinada através da determinação da atividade da enzima β -galactosidase.

O crescimento da estirpe selvagem SMR1 de *H. seropedicae* foi avaliado em diferentes concentrações de naringenina (50, 100, 250 e 500 $\mu\text{mol/L}$; dados não mostrados). Não foram observadas alterações no crescimento em nenhuma das

concentrações testadas. Com este resultado, mais os dados de literatura, a concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$ foi utilizada.

A resposta a naringenina foi estudada na presença de concentrações distintas de NH_4Cl , 2mmol/L e 20mmol/L, pois a disponibilidade de nitrogênio pode mascarar a sinalização por flavonóides. A identificação de mutantes em genes regulados por naringenina foi feita seguindo a estratégia descrita a seguir:

Primeiro a expressão de genes regulados por naringenina foi determinada nas estirpes mutantes cultivadas em meio sólido. A intensidade da coloração azul da colônia indica o nível da expressão da enzima β -galactosidase. As estirpes mutantes que apresentaram uma expressão diferencial de β -galactosidase em resposta a naringenina foram re-avaliadas pela determinação da atividade específica de β -galactosidase de culturas em meio líquido cultivadas em bloco tipo “deep well” contendo 2 mL de meio. Este procedimento de triagem foi feito para reduzir a frequência de resultados falsos que podem aparecer quando as análises são feitas em larga escala. Finalmente as estirpes foram cultivadas líquido NFbHP na presença ou ausência de naringenina (50 $\mu\text{mol/L}$) em frascos de 25 mL contendo 5 mL de meio.

Depois destas três etapas, os genes mutados das estirpes mutantes que apresentaram expressão do gene *lacZ* regulada por naringenina foi isolado e identificado por seqüenciamento e comparação com o banco de dados Genopar.

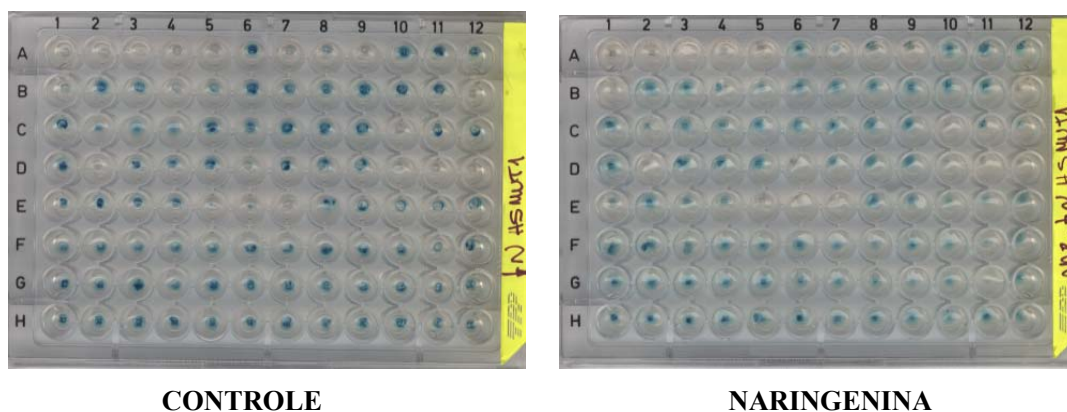
Os resultados obtidos serão descritos nos próximos itens. Primeiro serão apresentados os mutantes que apresentaram expressão de β -galactosidase reguladas por naringenina na presença de 2mmol/L NH_4Cl . e depois na presença de 20mmol/L NH_4Cl .

4.2.1 Identificação de mutantes em genes regulados por naringenina crescidos em 2 mmol/L DE NH_4Cl

Para a identificação de mutantes em genes regulados por naringenina crescidos em 2 mmol/L de NH_4Cl 5000 estirpes foram testadas em meio (NFbHP lactato com 0,7% de Agar contendo X-GAL (30 $\mu\text{g/mL}$), 2 mmol/L de NH_4Cl na presença ou ausência de 50 $\mu\text{mol/L}$ de naringenina). Pela comparação visual da coloração das colônias 210 estirpes mutantes apresentaram expressão de β -galactosidase diferencial em resposta a naringenina (Figura 05). Cento e sessenta e oito estirpes tiveram

expressão de β -galactosidase aumentada na presença de naringenina enquanto em 42 a expressão foi reprimida.

FIGURA 05: DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE β -GALACTOSIDASE EM PLACA, DE ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae*, NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE NARINGENINA CRESCIDAS EM 2 mmol/L DE NH_4Cl .

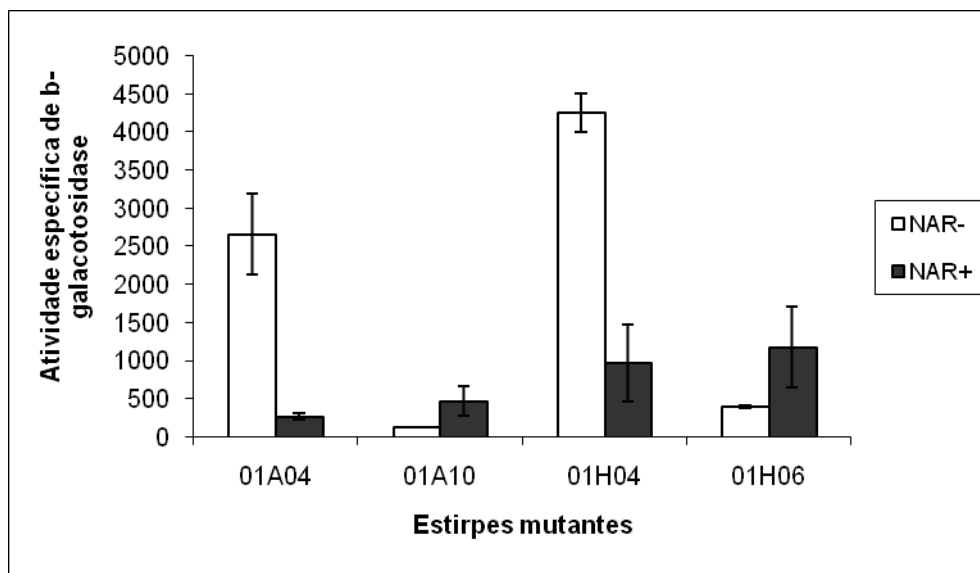


As estirpes mutantes foram cultivados em placas de 96 poços com meio NFbHP lactato contendo 0,7% ágar NH_4Cl 2 mmol/L e X-gal (35 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A placa denominada controle não possui naringenina e a outra placa contém 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ de naringenina.

Noventa e seis das 210 estirpes selecionadas na etapa anterior foram crescidas em meio líquido (na presença ou ausência de naringenina) em bloco de 96 poços e a atividade específica de β -galactosidase foi determinada também em bloco. Das 96 estirpes analisadas 4 apresentaram expressão diferencial de β -galactosidase em resposta a naringenina, sendo 2 com expressão de β -galactosidase reguladas positivamente e 2 negativamente.

As 4 estirpes mutantes selecionadas foram então cultivadas em meio líquido em frascos de 30 mL e a atividade específica de β -galactosidase foi determinada pelo método padrão. Todas as 4 estirpes mutantes selecionadas apresentaram expressão diferencial de β -galactosidase na presença do flavonóide naringenina (Figura 06), o DNA genômico destas 4 estirpes mutantes foi extraído, fragmentado e ligado. A clonagem, sequenciamento e identificação dos genes ficaram para uma próxima etapa.

FIGURA 06 – ATIVIDADE ESPECÍFICA DE β -GALACTOSIDASE NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE NARINGENINA DE ESTIRPES MUTANTES CRESCIDAS EM 2 mmol/L DE NH_4Cl .

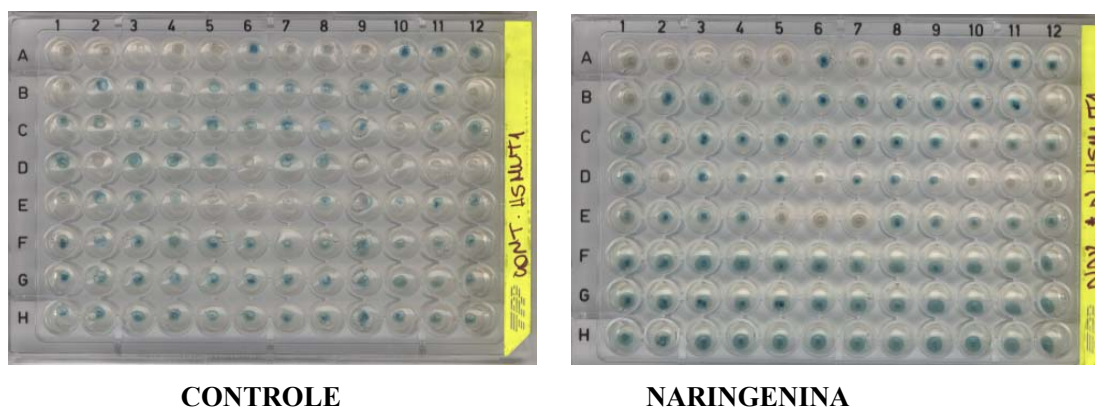


Os valores são a média da atividade específica de β -galactosidase de cada estirpe mutante testada em duplicata expressa em nmol ONP/min/mg proteína, com intervalos de desvio padrão. A legenda NAR- representa a ausência de naringenina NAR+ a presença de naringenina (50 $\mu\text{mol/L}$).

4.2.2 Identificação de mutantes em genes regulados por naringenina crescidos em 20 mmol/L DE NH_4Cl

Cinco mil estirpes foram testadas em meio seletivo (NfbHP lactato sólido, X-GAL (30 $\mu\text{g/mL}$), 20 mmol/L de NH_4Cl na presença ou ausência de 50 $\mu\text{mol/L}$ de naringenina) para a identificação de mutantes em genes regulados por naringenina crescidos em 20 mmol/L de NH_4Cl . 196 estirpes mutantes apresentaram expressão diferencial de β -galactosidase em resposta a naringenina após comparação visual da coloração das colônias (Figura 07), 148 estirpes com expressão de β -galactosidase aumentada e 48 com expressão diminuída.

FIGURA 07 – EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE β -GALACTOSIDASE EM PLACA, DAS ESTIRPES MUTANTES DE *H. seropedicae*, NA PRESENÇA DE NARINGENINA E NH_4Cl 20 mmol/L.



As estirpes mutantes foram cultivados em placa de 96 poços contendo meio NFbHP lactato 0,7 ágar NH_4Cl 20 mmol/L e , X-gal (35 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A placa denominada controle não contem naringenina e a outra contem 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ de naringenina.

Após crescimento em bloco de 96 poços e determinação da atividade específica de β -galactosidase em bloco, das 196 estirpes mutantes selecionadas na primeira etapa somente 57 estirpes mutantes continuaram apresentando expressão diferencial de β -galactosidase em resposta a naringenina. Destas 57 estirpes, 40 estirpes apresentaram expressão de β -galactosidase aumentada e 17 estirpes expressão diminuída em resposta a naringenina.

Estas 57 estirpes mutantes foram então cultivadas em frascos de 30 mL na presença ou ausência de naringenina e o ensaio da determinação da atividade de β -galactosidase foi feito em tubo. A Tabela 5 mostra os resultados dos ensaios de atividade de β -galactosidase para 22 estirpes mutantes que apresentaram expressão diferencial de β -galactosidase neste ensaio. Das 22 estirpes mutantes, 9 estirpes apresentaram expressão de β -galactosidase aumentada e 13 estirpes expressão diminuída.

Com o objetivo de avaliar se a expressão diferencial de β -galactosidase observada nestes mutantes é dependente da presença de 20 mmol/L de NH_4Cl a atividade de β -galactosidase das 22 estirpes mutantes também foi testada após crescimento em 2 mmol/L de NH_4Cl na presença ou ausência de naringenina (Figura

08). Nestas condições doze estirpes apresentaram expressão de β -galactosidase regulada por naringenina somente em 20 mmol/L de NH_4Cl , sugerindo que estes genes são regulados tanto por amônio quanto por naringenina. Sete estirpes (9E11, 9F3, 13C6, 13C9, 39G2, T1A8 E T1E11) mostraram o mesmo tipo de regulação encontrado em 20 mmol/L de NH_4Cl e três estirpes (9D3, 31B12 e 39B7) apresentaram expressão de β -galactosidase oposta na presença ou ausência de naringenina em comparação com 20 mmol/L de NH_4Cl . Nestas três estirpes a expressão de β -galactosidase na presença de naringenina e 2 mmol/L NH_4Cl é inibida, ao contrário do que acontece em alto nitrogênio, indicando os níveis de nitrogênio podem inverter a regulação por naringenina.

Estes resultados sugerem que a disponibilidade de amônio pode alterar a resposta ao flavonoide naringenina.

TABELA 05 – ATIVIDADE ESPECÍFICA DE β -GALACTOSIDASE DAS 22 ESTIRPES MUTANTES COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA PRESENÇA DE 20 mmol/L DE NH_4Cl .

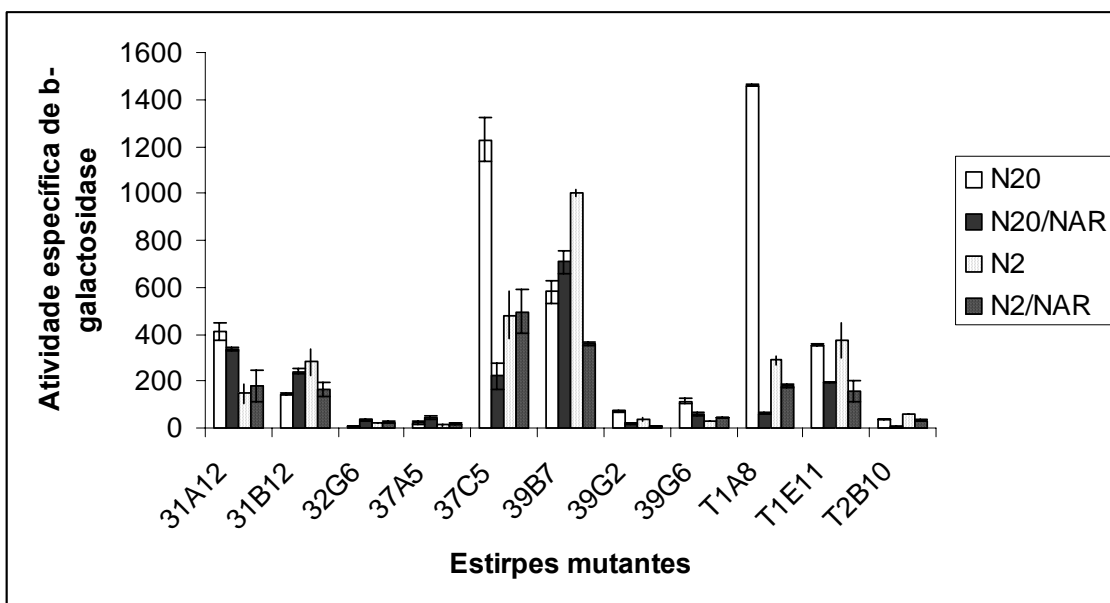
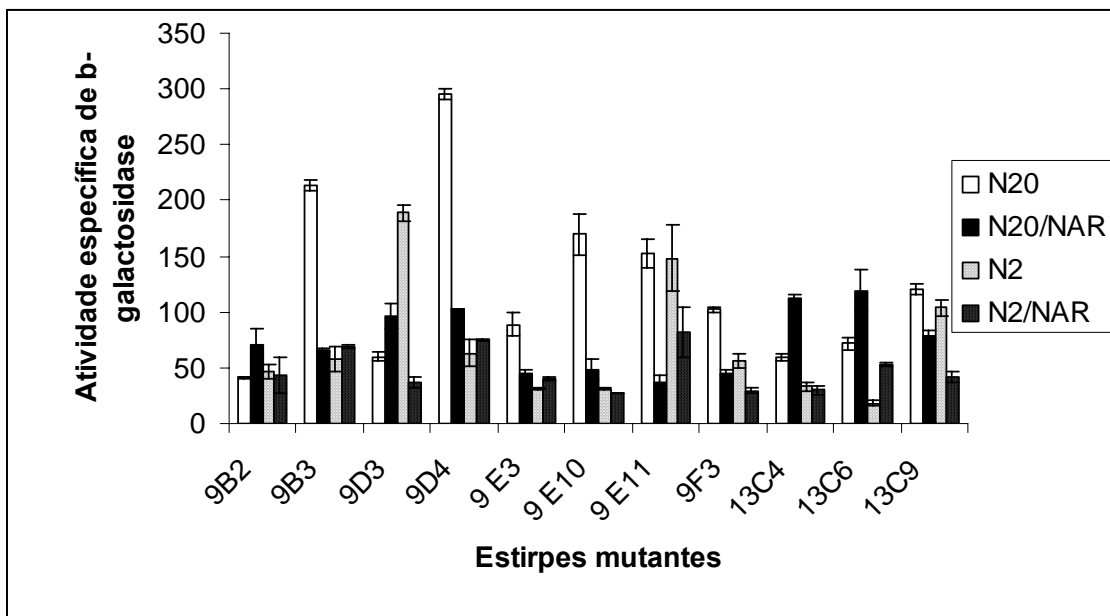
Nome da estirpe	Atividade sem naringenina	Atividade com 50 $\mu\text{mol/L}$ naringenina	Fator de indução/repressão [†]	Tipo de Regulação [‡]
9B2	35,52 (1,36)	73,73 (1,53)	2,07	+
9B3	212,8 (4,78)	66,11 (1,15)	0,31	-
9D3	59,88 (3,67)	95,93 (10,94)	1,60	+
9D4	295,69 (4,55)	102,26 (0,37)	0,34	-
9E3	88,73 (10,74)	44,78 (3,5)	0,50	-
9E10	169,39 (19,01)	48,68 (9,75)	0,29	-
9E11	152,29 (12,8)	36,8 (6,03)	0,24	-
9F3	102,27 (2,68)	45,38 (1,99)	0,44	-
13C4	59,71 (3,69)	112,16 (3,04)	1,88	+
13C6	71,69 (6,12)	118,92 (18,38)	1,66	+
13C9	120,46 (4,71)	79,44 (4,15)	0,66	-
31 A12	411,96 (35,03)	333,82 (7,31)	0,81	-
31B12	144,67 (1,21)	241,4 (10,26)	1,67	+
32G6	9,48 (1,46)	36,63 (3,47)	3,86	+
37 A5	22,02 (4,4)	45,08 (7,12)	2,05	+
37C5	1227,42 (92,92)	221,07 (54,08)	0,18	-
39B7	579,52 (50,61)	709,19 (49,11)	1,22	+
39G2	73,33 (4,07)	20,44 (4,09)	0,28	-
39G6	114,25 (11,97)	61,56 (6,65)	0,80	-
T1A8	1458,75 (3,23)	61,55 (4,58)	0,04	-
T1E11	354,67 (4,55)	193,65 (2,31)	0,55	-
T2B10	36,34 (1,87)	4,23 (0,57)	0,12	-

Os valores são a média da atividade específica de β -galactosidase de cada estirpe mutante testada em triplicata expressa em nmol ONP/min/mg proteína, com intervalos de desvio padrão.

[†] O fator de indução refere-se à razão entre a atividade específica em meio adicionado de 50 $\mu\text{mol/L}$ de naringenina e sem naringenina (induzido se a razão > 1, ou reprimido se a razão < 1).

[‡] Os tipos de regulação podem ser ativação (+) ou inibição (-) em presença de 50 $\mu\text{mol/L}$ de naringenina e 20 mmol/L de NH_4Cl .

FIGURA 08 – ATIVIDADE ESPECÍFICA DE β -GALACTOSIDASE EXPRESSAS DIFERENCIALMENTE NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE NARINGENINA COM 20 mmol/L E 2 mmol/L DE NH_4Cl .



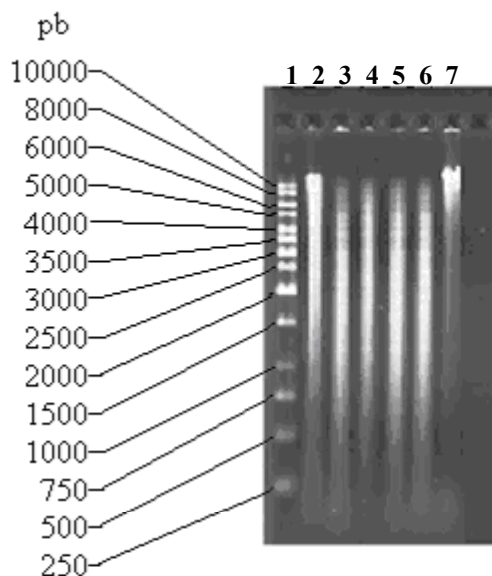
Os valores são a média da atividade específica de β -galactosidase de cada estirpe mutante testada em duplicata expressa em nmol ONP/min/mg proteína, com intervalos de desvio padrão. A legenda N20 representa a condição de alto amônio (20 mmol/L); N20/NAR a presença de naringenina (50 $\mu\text{mol/L}$) e alto amônio; N2 a condição de baixo amônio (2 mmol/L); e N2/NAR a presença de naringenina (50 $\mu\text{mol/L}$) e baixo amônio.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES REGULADOS POR NARINGENINA

As 22 estirpes mutantes que tiveram a expressão diferencial de β -galactosidase confirmada nas 3 etapas, na presença de naringenina e 20 mmol/L de NH_4Cl , tiveram o seu DNA genômico extraído e digerido com a enzima de restrição *Nar* I (Figura 09). Os fragmentos digeridos foram ligados e posteriormente transformados em *E. coli* estirpe Top10 ou DH10B. Não houve a necessidade de utilizar um vetor para a ligação dos fragmentos pois o transposon contém uma *oriR* que é reconhecida em *E. coli*. A seleção dos transformantes foi realizada através do antibiótico canamicina. Das 22 ligações obtidas após fragmentação do DNA genômico, apenas 12 apresentaram transformantes e os plasmídeos isolados foram então seqüenciados.

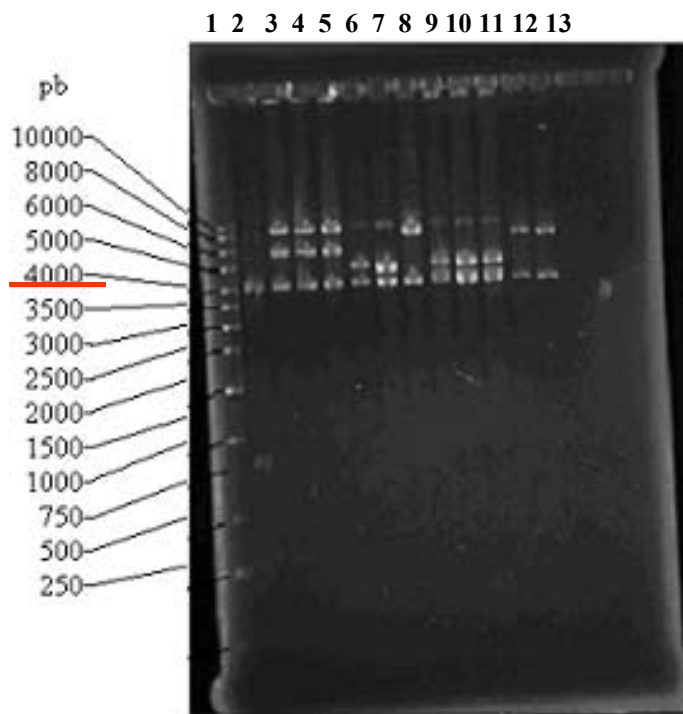
Os plasmídeos, obtidos a partir dos transformantes, foram digeridos com a enzima de restrição *Hind*III. Esta enzima libera um fragmento, que se encontra dentro do transposon, de aproximadamente 4 kb (Figura 10).

FIGURA 09 – RESTRIÇÃO DE DNA GENÔMICO DAS ESTIRPES MUTANTES



Gel de agar 1% contendo DNA genômico digerido das estirpes mutantes com enzima de restrição *Nar*I. Na linha 1: marcador de peso molecular; linhas 2 a 7: confirmação da fragmentação de DNAs genômicos de estirpes mutantes diferentes.

FIGURA 10 – PERFIL DE RESTRIÇÃO DOS PLASMÍDEOS SELECIONADOS



Perfil eletroforético dos plasmídeos contendo a região genômica com inserção do transposon. Plasmídeos produzidos a partir de diferentes estirpes mutantes que foram extraídos e clivados com *Hind* III. No perfil eletroforético - linha 1: marcador de peso molecular (1 kb ladder); linha 2: controle - restrição do plasmídeo pTnMod-OgmKmlacZ; linhas 3 a 13: restrição de plasmídeos extraídos dos transformantes obtidos após ligação de DNA genômico fragmentado de estirpes mutantes.

Para identificar o gene mutado, os insertos dos plasmídeos obtidos foram seqüenciados. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências depositadas no banco de dados do Programa Genoma do Paraná (www.genopar.org). Isto permitiu identificar os sítios de inserção do transposon de pTnMod-OGmKmlacZ no genoma de *H. seropedicae*.

Na Tabela 06 estão listadas as ORFs e os genes identificados com suas respectivas funções, o nível de indução e repressão na presença ou ausência de naringenina nas duas concentrações de cloreto de amônio e a classificação funcional dos genes identificados de acordo com seu papel ou via metabólica conforme classificação no COG (Clusters of Orthologous Groups) (TATUSOV *et al.*, 1997) descrita no banco de dados do Programa Genoma do Paraná.

Os genes mutados em cada estirpe são descritos a seguir.

TABELA 06- IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE *H. seropedicae* REGULADOS POR NARINGENINA

Estirpe Mutante	ORF identificada	Nome do gene	Produto ou Função do gene	Classificação no COG	Indução/repressão 20 mmol/L de NH ₄ Cl	Indução/repressão 2 mmol/L de NH ₄ Cl
9B3	234.0167	<i>epsG</i>	biossíntese de eps	Grupo D – processos celulares e sinalização	-	S/D
9D4	247.0297	-	O-antígeno acetilase	Grupo I- metabolismo e transporte de lipídeos	-	S/D
9E3	261.0393	-	Proteína hipotética conservada	Grupo S- função desconhecida	-	S/D
9F3	287.0212	-	O-antígeno acetilase	Grupo I- metabolismo e transporte de lipídeos	-	-
13C9	107.0008	<i>trmU</i>	Metiltransferase	Grupo J – tradução, estrutura ribossomal e biogênese	-	-
31B12	238.0144	-	Proteína hipotética	Grupo S- função desconhecida	+	-
37 A5	184.0091	<i>bioF</i>	Ácido-5-aminelevulinico sintase	Grupo H- metabolismo e transporte de coenzimas	+	S/D
37C5	238.0148	-	Proteína hipotética	Grupo S- função desconhecida	-	S/D
39G2	264.0225	-	NAD dependente	Grupo C -conversão e produção de energia	-	-
T1A8	253.0171	-	Indolpiruvato ferredoxina oxirredutase, subunidades α e β	Grupo C- conversão e produção de energia	-	-
T1E11	263.0356	-	Proteína hipotética	Grupo S – função desconhecida	-	-
T2B10	266.0359	-	Proteína hipotética conservada não caracterizada	Grupo S- função desconhecida	-	S/D

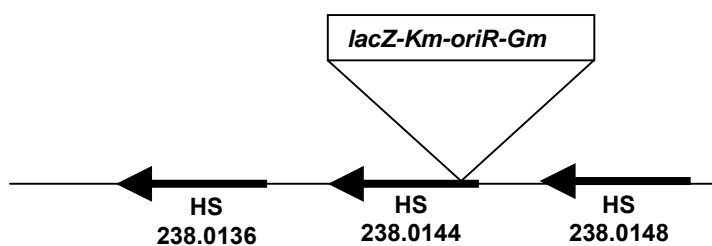
Estirpes mutantes identificadas e número das ORFs identificadas no genoma de *H. seropedicae* com nome do genes seu respectivos produto ou função e classificação segundo COG obtido pelo banco de dados do Programa Genoma do Paraná. O fator de indução/repressão em alto e baixo amônio está representado. Os símbolos + significa indução; - repressão ; e S/D sem diferença significativ

4.3.1 Estirpe 31B12

A estirpe 31B12 identificado com mutação no gene HS238.0144, codifica para proteína hipotética conservada não caracterizada. Análises em banco geral de dados NCBI mostrou similaridade com uma proteína da via do Sistema de Secreção do Tipo II de *Vibrio cholerae* com e-value de $7e-12$. Esse Sistema de Secreção é utilizado por várias bactérias gram-negativas principalmente para a secreção de enzimas degradativas extracelulares, geralmente associadas à degradação de tecidos do hospedeiro. (PUGSLEY, 1993; SANDKVIST, 2001).

As bactérias gram-negativas desenvolveram sistemas de secreção de proteínas que são importantes na interação da bactéria com organismo hospedeiro. Estudos com *Rhizobium* sp. demonstraram que o sistema de secreção do Tipo III é ativado pela proteína NodD que responde a flavonóides (VIPREY *et al.*, 1998). A resposta deste gene a naringenina pode indicar que ele está relacionado com Sistemas de Secreção respondendo a estímulos externos podendo atuar na interação planta-bactéria.

FIGURA 11- LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON TnMod-OGmKmlacZ NO GENOMA DE HS 31B12

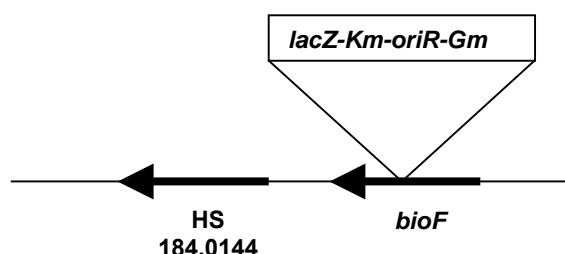


As setas grandes indicam o sentido de transcrição das ORFs adjacentes à inserção. Abaixo das setas estão indicados os nomes dos genes mutagenizados segundo o Programa Genoma do Paraná.

4.3.2 Estirpe 37 A5

A estirpe 37A5 possui mutação no gene *bioF*. Este gene codifica para a proteína 5-ácido-aminolevulínico sintase que é uma enzima da via biossintética do heme (LEE *et al.*, 2005). Análises no banco de dados geral mostrou similaridade com aminotransferase de *Microcystis aeruginosa* (e-value: 1e-123) e como descrito pelo GENOPAR similaridade com ácido-5-aminolevulínico sintase de *Bradirhizobium sp* (e-value: 2e-40).

FIGURA 12- LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON TnMod-OGmKmlacZ NO GENOMA DE HS 37A5



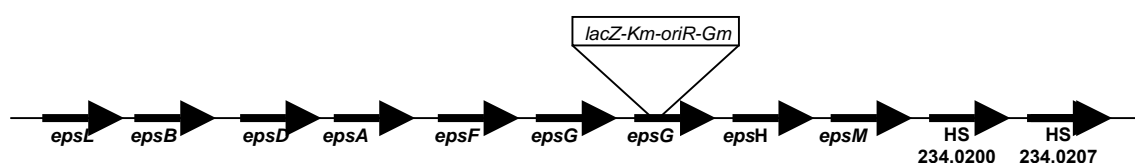
As setas grandes indicam o sentido de transcrição das ORFs adjacentes à inserção. Abaixo das setas estão indicados os nomes dos genes mutagenizados segundo o Programa Genoma do Paraná.

4.3.3 Estirpe 9B3

A estirpe 9B3 possui mutação no gene *epsG*. Esse gene encontra-se em um operon com 11 genes, possivelmente envolvidos na síntese de exopolissacarídeos. A sequência obtida através do genopar apresentou similaridade com o gene *epsG* de *Methylobacillus sp.* (e-value: 3e-20).

Os genes *eps* podem estar envolvidos na interação planta/*H. seropedicae*, uma vez que genes similares estão relacionados com a simbiose do gênero *Rhizobium* com leguminosas. Trabalhos já demonstraram que a invasão do nódulo é abortada em vários estágios em mutantes de genes *eps* ou *exo*, de *Rhizobium meliloti* (PERRET *et al.*, 2000).

FIGURA 13- LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON TnMod-OGmKmlacZ NO GENOMA DE HS 9B3



As setas grandes indicam o sentido de transcrição das ORFs adjacentes à inserção. Abaixo das setas estão indicados os nomes dos genes mutagenizados segundo o Programa Genoma do Paraná.

4.3.4 Estirpes 9D4 E 9F3

As estirpes mutantes 9D4 e 9F3 foram identificados como possuindo mutações nos genes HS247.0297 e HS287.0212. Esses genes codificam duas proteínas diferentes com função de antígeno O acetilase. Análises no banco geral de dados NCBI mostraram que o produto do gene 9D4 possui similaridade com antígeno O acetilase de *Xylella fastidiosa* com e-value $1e-119$ e o produto do gene 9F3 possui similaridade com antígeno O acetilase de *Xylella fastidiosa* com e-value $9e-104$.

As duas seqüências de aminoácidos obtidas através do genopar foram alinhadas através do programa Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994). Este alinhamento mostrou que as duas proteínas encontradas no genoma de *H. seropedicae* são proteínas diferentes (Figura 15).

Antígeno O juntamente com lipídeo A e um núcleo de oligossacarídeos, formam a estrutura de lipopolissacarídeos (LPS), que são uma classe de glicoconjugados que estão presentes em uma monocamada externa da membrana. Lipídeo A, é uma região hidrofóbica, que ancora o LPS na membrana. Logo depois do Lipídeo A encontra-se a região do núcleo, que é composta por oligossacarídeos fosforilados compostos de 10 a 15 unidades. Finalmente o antígeno O possui como função principal unir o núcleo de polissacarídeos e interagir com o ambiente, sendo que sua estrutura é composta de polissacarídeos variáveis com unidades oligoméricas repetitivas (BROUGHTON *et al.*, 2006; LEROUGE & VANDERLEYDEN, 2001; YETHON *et al.*, 2000).

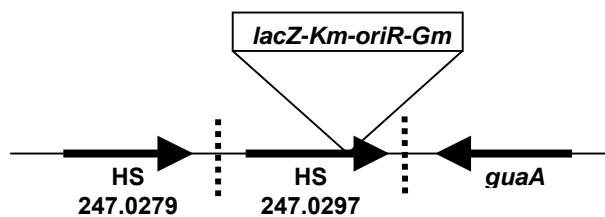
A correta estrutura de LPS é essencial para a interação hospedeiro/bactérias. A infecção de plantas com mutantes de LPS que não possuem antígeno O demonstram uma interrupção prematura na nodulação. Muito da heterogeneidade de LPS é dada pela

composição química e estrutura do antígeno O que é a molécula geralmente responsável pela especificidade de cada estirpe. Alterações na estrutura de LPS podem ocorrer em resposta a diferentes ambientes, como é o caso deste trabalho, em resposta ao flavonóide naringenina. As modificações em resposta ao ambiente ocorrem ao nível de porção de lipídeo A e também no antígeno O (LEROUGE & VANDERLEYDEN, 2001).

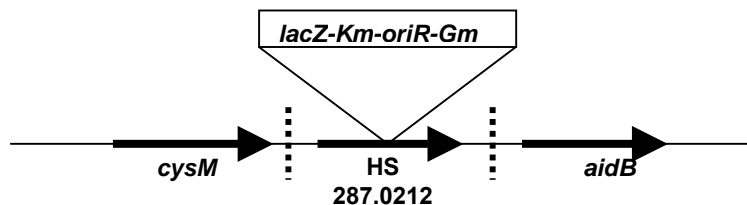
Esta resposta de genes que codificam para antígeno O na presença de flavonóides no organismo de estudo pode indicar uma possível mudança de conformação em estruturas de membrana podendo assim facilitar a interação e invasão da planta hospedeira.

FIGURA 14- LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON TnMod-OGmKmlacZ NOS GENOMAS DE HS 9D4 E HS 9F3

9D4



9F3



As setas grandes indicam o sentido de transcrição das ORFs adjacentes à inserção. Abaixo das setas estão indicados os nomes dos genes mutagenizados segundo o Programa Genoma do Paraná. As linhas tracejadas verticais significam regiões intergênicas maiores que 100 pb, indicando que a região pode não fazer parte de um único operon.

FIGURA 15 – ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DOS PRODUTOS DOS GENES 9D4 E 9F3

```

247.0297.p  -----MS ILQRPALSHS KYRSDIDGLR AIAVLAVVSF HGFPNFVRGG
287.0212.p  MLASNHKTPA GAASPATAHP GYRPDIDGLR AIAVLSVVVF HAFPEWLPGG
Clustal Co      :      * * : * .   * * . * * * * *   * * * * : * *   * . * * : : * *

247.0297.p  FIGVDVFFVI SGYLISTIIF ENLDRGTFTF TEFYARRVRR IFPALLLVLS
287.0212.p  FVGVDIFFVI SGFLISGILF DALQRDRFSI VDFYIRRIRR IFPALLLVML
Clustal Co      * : * * * : * * * *   * * : * * * * : * :   : * : * . * : :   . : * * * * : * *   * * * * * * * :

247.0297.p  TCFVVGWFVL LTDEYKQLGK HIAGGAGFVS NFLLRDESGY FDNSAETKPL
287.0212.p  ACLLAGWFIL LPEEYRQLGK HLLGGAGFVS NIVLWNEAGY FDTSAETKPL
Clustal Co      : * : : . * * * : *   * . : * * : * * * *   * :   * * * * * * *   * * : * : * * * *   * * . * * * * * * *

247.0297.p  LHLWSLGIEE QFYILWPMML FFSWRRKFNL LTITIIVALA SFAANIKGIN
287.0212.p  LHLWSLGVVEE QFYLFWPLML WAAWRRRTGM LAVLLGVMAL SFGWNIVWLH
Clustal Co      * * * * * * * : * *   * * * : * * : : *   : : * * * :   . :   * : :   *   * * . * *   : :

247.0297.p  KDATAAFYLP QSRFWELLSG TLLAWFTLYK QHTTIELRPR LGTWILQLIY
287.0212.p  RDVAAAFYLP MSRFWELGAG ALLAWRHRQG AVPTSVQAHR L-----
Clustal Co      : * * . * * * * * *   * * * * * * : *   : * * * *   . *   *   *   *

247.0297.p  SEKRKSDGKF LIDVSSITGL CIVLYGFWRI NKELAFPGVW ALVPILGTIL
287.0212.p  -----SVAGL LLIVVAIATI TKDDAFPGWW ALLPVTGAVL
Clustal Co      : * : * *   : : : . :   *   . * :   * * * * *   * * * : * : * *

247.0297.p  IIAAGPAAWV NRTLLSNKIL VWFGLISFPL YLWHWPVLSF ARIVENELPS
287.0212.p  LLAAGPQARI NRSLLSHRTM VWVGLISYPL YLWHWPLLAF ARLVVGATPS
Clustal Co      : : * * * * * * : *   * * : * * * * : :   * * . * * * * : * *   * * * * * * * : * * * *   * * * * . * *

247.0297.p  YPLRVGAIAL AILAWLTYE IVERPIRTGN NAN-TKITVT ALIGLMALVG
287.0212.p  VQLRLAAVAL ALLLAWLTYR LVELPVRLRS AGHRSAVTLA LLMALMAALG
Clustal Co      * * : . * : * *   * : : * * * * * .   : * * * : *   .   . : : : * : :   * : . * * * * : *

247.0297.p  AVGYR----T FAANGWESRM SPDITRISRA AGEWQYPG-- --KLTA FNFE
287.0212.p  GYVVKRNGMD FRQLGAVAML FNDQVKETAV LNHFELPHPS CAALMGQEHS
Clustal Co      .   :   *   *   : :   *   . : : .   . . : : *   *   . : .

247.0297.p  NRTFYRQNSN MDEITLFIGD SNIEQYVVRT DELISTKPNN SNSVVFATGG
287.0212.p  RDWCAAPVSA EPPQVLLIGD SYSGAYAPML ARLYQASPQP QLVFQQFARG
Clustal Co      .   *   .   * : * * *   *   *   .   *   . : : * :   .   .   : *

247.0297.p  GCLAIPGSPY DEAHMSCANL METALNYAKT NASVASVVG AQWNSYLSDG
287.0212.p  GCASL----L DGGGGYCGEI SERVAAYARQ TPSIKTVVLA ANWPGHIAAN
Clustal Co      * * : :   *   .   * : : :   *   .   * * :   . . * : : * * : . * * * : : .

247.0297.p  YGLRGSFGTA GKDYSAAALNR LARYIRELKY LGKKVYFILN IPIGDELDPK
287.0212.p  P-----KGVLKA LEHTILYRQ LGKRVVVLLS PPNG--ANPK
Clustal Co      . . . * :   * : *   :   * * * : *   . : * .   * *   : * *

247.0297.p  FMITRNLKHF PHVINLKERG LNRKDIDERY GKIQKDLEQI ARAAGADVVN
287.0212.p  SCVLRGIRLS DADFCNLPR- AKAEQMDDHY RDLMLPLLQR LDVP---VFD
Clustal Co      : * . : :   :   *   :   : : * : * *   . :   * *   . .   * . :

247.0297.p  PMDFLCNATK CSSLDDEGEP IYKDRSHLRP QYVRYRASFI DEFLETHW---
287.0212.p  PYPTLCDEHG CKVIDGP-RI LYFDPGHLSA YGAQYLADHA GDALRRLLLG
Clustal Co      *   * * :   * . : * .   .   : * * . * *   . : * * . .   . : *

```

```

247.0297.p  ----
287.0212.p  TPAH
Clustal Co

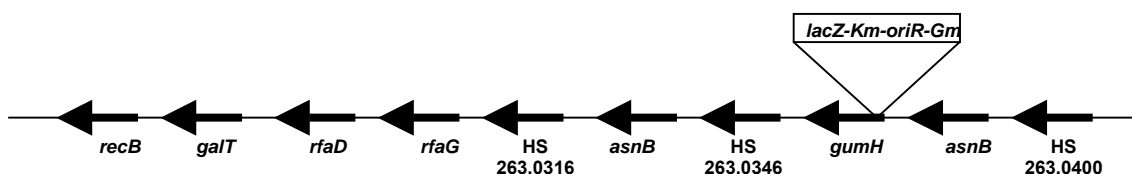
```

Alinhamento realizado através de CLUSTAL W das seqüências consenso de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes mutagenizados das estirpes 9D4 (ORF 247.0297) e 9F3 (ORF 287.0212). O alinhamento mostra a conservação dos aminoácidos entre as duas proteínas, onde * representa a presença de um mesmo aminoácido nas duas proteínas; : uma alteração conservada; e . uma alteração não conservada.

4.3.5 Estirpe T1E11

A estirpe T1E11 que possui no gene *gumH*, que codifica para uma proteína hipotética e encontra-se em um operon, formado por 10 genes. Em alinhamento com banco geral de dados, esta proteína apresentou uma similaridade com proteína GumH de *Xylella fastidiosa* com um e-value de 0,12. No mesmo operon, encontram-se genes envolvidos com síntese de carboidratos como os genes *rfaG*, *rfaD* e *galT*. Os genes que codificam glicosiltransferases são importantes na transferência dos grupos de açúcares formando a estrutura de LPS (BROUGHTON *et al.*, 2006; YETHON *et al.*, 2000). Este gene assim como os anteriores também pode estar relacionado com a interação planta-bactéria no organismo de estudo.

FIGURA 16- LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON TnMod-OGmKmlacZ NO GENOMA DE HS T1E11

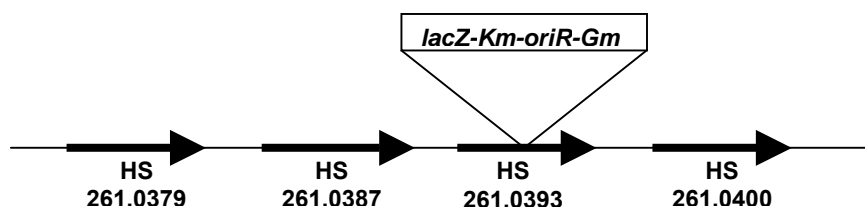


As setas grandes indicam o sentido de transcrição das ORFs adjacentes à inserção. Abaixo das setas estão indicados os nomes dos genes mutagenizados segundo o Programa Genoma do Paraná.

4.3.6 Estirpe 9E3

A estirpe 9E3 foi identificada possuindo mutação no gene HS261.0393 que codifica para uma proteína hipotética conservada. Este gene encontra-se em um operon com 4 genes, todos codificam para proteínas hipotéticas no genoma de *H. seropedicae*. Analisando o operon podemos observar que os dois primeiros genes codificam para proteínas de membrana externa. Esta análise pode ser um indicativo que o gene mutado possa ser uma proteína de membrana cuja expressão é regulada por naringenina.

FIGURA 17- LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON TnMod-OGmKmlacZ NO GENOMA DE HS 9E3



As setas grandes indicam o sentido de transcrição das ORFs adjacentes à inserção. Abaixo das setas estão indicados os nomes dos genes mutagenizados segundo o Programa Genoma do Paraná.

4.3.7 Estirpe T1A8

A estirpe T1A8 possui mutação no gene HS253.0171. Este gene codifica para a proteína indolpiruvato ferredoxina oxirredutase subunidades α e β .

Este gene pode estar relacionado com a produção de ácido indolacético (AIA) um fitormônio (auxina) comumente estudado atualmente. Os hormônios vegetais, ou fitormônios, produzidos por bactérias são substâncias orgânicas que podem estimular o crescimento das plantas. Três vias biossintéticas foram descritas para a produção de AIA em *Azospirillum sp*: duas dependentes de triptofano e outra independente. Estudos com *H. seropedicae* revelaram a produção de AIA, juntamente com produção de giberilinas A_1 e A_3 , mas ainda são desconhecidas quais as vias responsáveis por sua síntese. (BASTIÁN *et al.*, 1998; BOTTINI *et al.*, 1989; CROZIER *et al.*, 1988; LAMBRECHT *et al.*, 2000).

Apesar de a indução observada ser negativa na presença do flavonóide, a indução dos genes *nod*, e flavonóides podem estimular a produção de AIA bactérias do gênero *Rhizobium* (LAMBRECHT *et al.*, 2000). Além disso, fatores como a própria concentração do precursor (triptofano), presença de múltiplos genes regulatórios em diferentes vias metabólicas a também a concentração final de AIA podem estar envolvidos na regulação dos genes responsáveis pela produção de AIA (RADWAN, MOHAMED & REIS, 2004).

A atividade de β -galactosidase desta estirpe foi testada na presença de triptofano (500 $\mu\text{mol/L}$) e AIA (100 $\mu\text{mol/L}$) em alto e baixo nitrogênio. Estudos demonstraram que aplicação de triptofano exógeno aumenta a produção de AIA em diversas bactérias como *Azospirillum sp*, *Pseudomonas putida* e *Rhizobium sp* (SPAEPEN, VANDERLEYDEN & REMANS, 2007). Podemos observar (Figura 19) que na presença de triptofano há uma pequena inibição da atividade específica, e na presença de AIA a inibição observada foi maior.

Em todas as condições que continham baixo amônio observamos uma inibição da expressão do gene. Uma vez que utilizamos amônio como fonte de nitrogênio este resultado corrobora com os resultados de Radwan e colaboradores (2004), que observaram, em estirpes de *Azospirillum sp*, um efeito positivo na produção de indóis quando aplicado nitrogênio na forma de íons amônio quando comparado com nitrogênio na forma de nitrato.

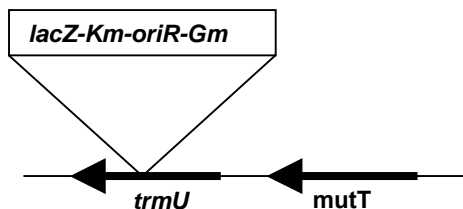
Com estes dados podemos sugerir que esta enzima pode estar envolvida na produção de AIA, tendo a sua expressão inibida por AIA e por naringenina e estimulada por amônio.

4.3.8 Estirpes 13C9, 37C5, 39G2 e T2B10

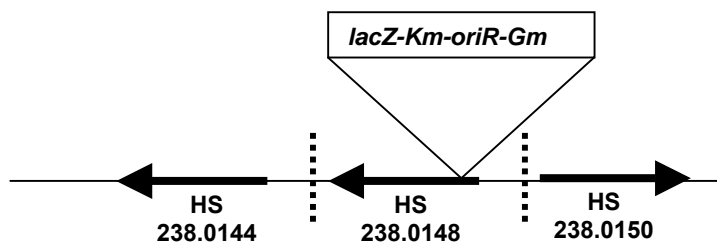
As estirpes 13C9, 37C5, 39G2 e T2B10 possuem mutações nos genes *trmU*, HS238.0148, HS264.0225 e HS266.0359. Esses genes codificam para: uma metiltransferase, uma proteína hipotética com função desconhecida, uma aldeído desidrogenase NAD dependente, e uma proteína hipotética conservada não caracterizada. Para a caracterização destes genes serão necessários estudos mais profundos nas estirpes uma vez que não existem relatos na literatura de genes homólogos a estes que respondam a flavonóides.

FIGURA 20 - LOCALIZAÇÃO DA INSERÇÃO DO TRANSPOSON TnMod-OGmKmlacZ NOS GENOMAS DE HS 13C9, HS 37C5, HS 39G2 e HS T2B10

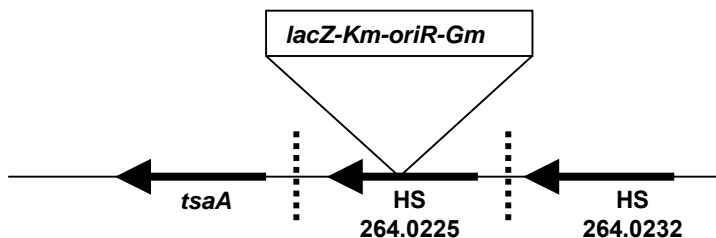
13C9



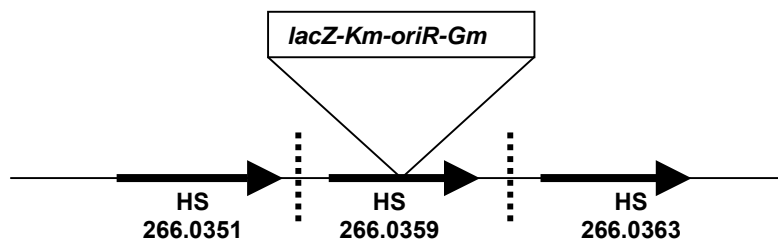
37C5



39G2



T2B10



As setas grandes indicam o sentido de transcrição das ORFs adjacentes à inserção. Abaixo das setas estão indicados os nomes dos genes mutagenizados segundo o Programa Genoma do Paraná. As linhas tracejadas verticais significam regiões intergênicas maiores que 100 pb, indicando que a região pode não fazer parte de um único operon.

4.4 ENSAIOS DE CRESCIMENTO DAS 22 ESTIRPES MUTANTES REGULADAS POR NARINGENINA (20 mmol/L DE NH₄Cl) NA PRESENÇA DE SDS E POLIMIXINA B.

Estudos demonstram que mudanças na estrutura de lipopolissacarídeos (LPS) diminuem a hidrofobicidade da superfície celular e fazem as bactérias serem mais sensíveis a agentes detergentes (YETHON *et al.*, 2000, JOFRÉ, LAGARES & MORI, 2004) e a peptídeos catiônicos antimicrobianos (CAMPBELL, REUHS & WALKER, 2002). Como foram identificados cinco estirpes mutantes (9B3, 9D4, 9E3, 9F3 e T1E11) que possuem genes mutados que podem estar relacionados com metabolismo de LPS, as 22 estirpes mutantes reguladas por naringenina (20 mmol/L de NH₄Cl) foram crescidas na presença de SDS 0,1% e 5 µg/mL de polimixina e comparadas com a estirpe selvagem.

Os resultados mostraram que na presença de polimixina (5 µg/mL) o número e o formato das colônias das estirpes mutantes eram semelhantes ao da estirpe selvagem. Na presença de SDS 0,1% as estirpes 9B3, 9D3, 9D4, 9F3, 13C4, 13C9, 31A12, 37C5 e 39G2 não apresentaram crescimento mostrando que os genes mutados estão envolvidos com a estrutura da membrana ou ainda relacionados com outros fatores que afetam crescimento nesta condição.

Das cinco estirpes destacadas anteriormente, três não apresentaram crescimento em SDS 0,1%. A estirpe 9B3 que possui mutação no gene *epsG* e as estirpes 9D4 e 9F3 que possuem mutações nos genes que codificam para antígenos O acetilases. Esses resultados corroboram com a hipótese de que estes genes mutagenizados podem realmente estar envolvidos no metabolismo de LPS.

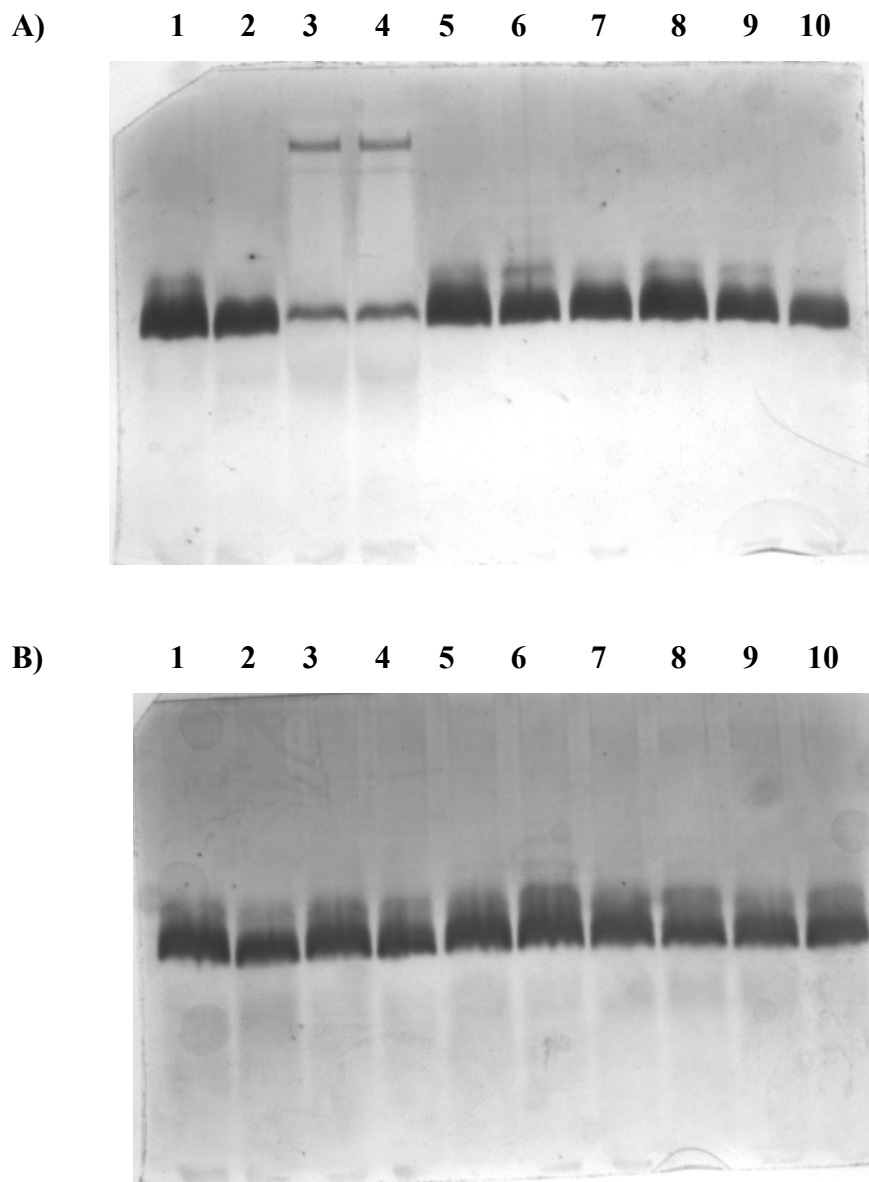
4.5 PADRÃO ELETROFORETICO DE LPS DAS 22 ESTIRPES MUTANTES REGULADAS POR NARIGENINA (20 MMOL/L DE NH₄CL).

As estirpes mutantes também foram submetidas à análise do padrão de corrida eletroforética de LPS (lipopolissacarídeos). A extensão da heterogenidade de LPS é facilmente observada em amostras separadas por SDS-PAGE. Este procedimento é especialmente utilizado para determinar o número e a distribuição de repetições de O-antígeno que exibem uma escala de banda depois de coradas com prata (LEROUGE & VANDERLEYDEN, 2001, BROUGHTON *et al.*, 2006).

O padrão eletroforetico de LPS das estirpes mutantes foi comparado com o da estirpe selvagem crescidas na presença e ausência de naringenina. A Figura 21 mostra que o padrão eletroforético de LPS não foi alterado nas condições testadas. Nesta figura também é possível observar que a estirpe 13C4 possui um padrão de corrida eletroforética de LPS diferente da estirpe selvagem independente da condição de crescimento, indicando que esta mutação alterou a estrutura do LPS desta estirpe mutante.

O fato de não ter se observada diferença no padrão eletroforético de LPS não significa que não possam ter ocorrido mudanças no LPS.

FIGURA 21 - PADRÃO DE LPS DAS ESTIRPES MUTANTES



Gel SDS-PAGE 20% de extração rápida de LPS (lipopolissacarídeos) corado com prata. Todas as estirpes passaram por duas condições de crescimento diferentes para extração de LPS, a primeira com NFbHPN malato sem naringenina e a segunda com naringenina. As linhas ímpares representam a extração realizada das estirpes que cresceram sem naringenina e as linhas pares com naringenina. Nos dois géis as linhas 1 e 2 representam a estirpes selvagem SMR1 sem e com naringenina respectivamente e as demais linhas são estirpes mutantes. No gel A as linhas 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8 e 9 e 10 representam as estirpes mutantes 13C4, 13C6, 13C9 e 31A12. No gel B as linhas 3 e 4, 5 e 6, 7 e 8 e 9 e 10 representam as estirpes mutantes 39B7, 39G2, 39G6 e T1A8.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE PROVÁVEIS ELEMENTOS DE REGULAÇÃO NAS SEQÜÊNCIAS A MONTANTE DOS GENES ALVOS DE INSERÇÃO REGULADOS POR NARINGENINA

Análises *in silico* na região a montante dos 12 genes identificados foram feitas para determinar a presença de prováveis seqüências promotoras dependentes de σ^{70} e σ^{54} , e também foram verificadas a presença de seqüências consenso de ligação ao ribossomo (RBS).

Na região promotora do gene T1A8 foi identificado um possível sitio promotor dependente do σ^{54} da RNA polimerase (Figura 16). Também foi encontrada uma seqüência consenso de ligação da ativadora de transcrição NtrC. Dentre as classes de genes de *E. coli* regulados por NtrC, a maioria compreende sistemas de transporte de fontes alternativas de nitrogênio (ZIMMER *et al.*, 2000). As regiões promotoras dos demais genes possuem possíveis sítios de ligação para a subunidade σ^{70} .

37C5 -

gtcagactgggcagcacttgtcaaaacgacatttcaataaggccgcttccggccagaaa
cggacgttgatcaaagcataaccgcctttcgttcgaaagtacggctctggcttatcttccat
Região -35 **Região -10**
tccgaagatccatgccaatccgcccctctccgggaagtgatcataagttcaaagactg
caggccttaaagatctggcatttgagtgcacagtcgcgccaattattgcctcacagga
Região -35
atthaatcaatttaaactcacatgggttgattcctaaattgataaaaagggtggggtaATG
Região -10 **RBS**

39G2 -

ttcggctcttccgggggtggctactgtactgttgcgcatggtagcggatttgccgggtaa
gcggccagtcatgcagggcaggcagtcagcaaagtagtaaattcaattgacagcttgtc
Região -35
tgcactggcttagattgactccccagaaaaaccaacaagatccaggagacaagccctcg
Região -10
ccgaccgtctgcgacccccgcgtctgtggccgggcccgtggcgattctgcgcccctgcct
gccgcccctgctgctcttgttgcgtccccacctccagccaccaaggaacgcaccgccATG
RBS

T2B10 -

atgccctctatgcgcatcgtggagcgcctgcagcaggaccctggcatcgcgcccgat
Região -35
gacgtcatgatcagcctggtcgagggcgacaagggtaactggtccttcggacaaggact
Região -10
ggcgcaatacgtgatgtgagccggcccgggtggcggcctcctgcatgccttgccaccacc
tgctaggatgtcgctcattccattgactgcgcccggctgcgcctttgccatgcccctg
cgacatcccgttccctggccgagactgcggcgtgttctcgccacggctggcgtcctgATG

T1A8 –

t c c t c a a g a c g c t g a c c g g c a a g c a g c c g c g t t t g c a g t t a c c g g t g t t g c c g c c t
c t t c g g a g a a g a c a c t g c g g c c g c a a c c c t t c g a t c a t c c c t g a a a a g t c g c c g g c a
NtrC
g c a c n n n n n t g g t g c a
a a a a a a a g c g g a t c t g a c a g g g g g a g c c a g a t c c g c g a g c t a g t g g t g c t t t c a a c
a c t a g a g g g g a g g a a c c t t g c a c a g t a a c g g a t a c c a a t c a a t c g c t g t t c a a g t g a
g g t c t a t t a a a c g t c a g t g c c g a a g c t g g t c c a a t g g c t t t t a c t g g a t g t t a c a t t
c a c g t c t t g c t t g t a a c a c t t g a g c t g g c t g c a g c t c t t t t t t t t c a g c c g g a a a t a
t t g t t g t t t t t g t c t t t c c g g c a t t t t c t t c t a c c c g g g c a t c a a c g c c g c a g g a
Região -24 **-12**
c t t g c g g a a a g t g t t t c c t g c a t g c c a a a a a a c c c g a a a a c c c t g c t g c g g c g c g c
g t a g c a g g t g g c t c a c c c t t g t g c t a a c t t g a a g t a c a a c c t g a a g a a g a c c c g g c c
c a c a a g g c t g a g g t g t t c c c c a t c c c g a c a g a a a a g t c t g c c g g g a g c a t g t g c a g g
c a a a a c a a g a t t t t t g g c a c g g a g a c c a c A T G
RBS

T1E11 -

c a c t g g c c t t g t c g c g c a c g g c a t c c t g g c a a g a t g g a t a g g a t c g t g g a g t g t c g c g c
c g c t c t a c c t g c t t t g c c a g c a c g g c g t t g t g t g t c t a c t t t t t g g c g c a g g c a a c t g a g c
Região -35 **Região -10**
t c t t c g g c a a a g a t g c g c a t c g c c t c c a t g c t g t c a c g c g c c g a c a a a t a a a a c t c c a t
c t a g t a a a g t a c a t c c c t c c g a a t g a a a a t c g g t c t t a t t g g a a a c a t g a a c a a t a a c a
a c t t c g c g t t g t t g c g c c a c c t g c t g g a t c t g g g t g c a g a c g c t g a g t t g c t g c t c A T G

Cada seqüência mostrada corresponde à provável região promotora a montante da região do operon onde se encontra o gene com inserção com transposon na estirpe descrita (seqüências de DNA gentilmente cedidas pelo programa Genopar – www.genopar.org); as seqüências consenso para promotor dependente de σ^{54} (regiões -24 e -12) e dependentes de σ^{70} (regiões -35 e -10), os nucleotídeos 100% encontram-se sublinhados. Ainda encontra-se destacada sublinhada e em negrito as seqüências consenso a ligação ao ribossomo (RBS) e também o início da tradução ATG.

Estas análises representam uma primeira etapa na identificação de regiões regulatórias, nos operons onde os genes mutados identificados se encontram. É importante ressaltar que são necessárias análises complementares e ainda ensaios para confirmação destes resultados.

A estratégia de mutagênese aleatória tem sido amplamente utilizada para identificar e caracterizar genes e mecanismos com funções desconhecidas. Esse trabalho representa uma primeira etapa na identificação de genes de *H. seropedicae* relacionados na sua interação com planta e outros mecanismos que respondem aos flavonóides. Os genes que respondem a flavonóides podem vir a elucidar os mecanismos de interação *H. seropedicae*-planta, uma vez que os flavonóides já foram descritos na literatura como sendo indutores de genes relacionados com a colonização de plantas por bactérias.

5.CONCLUSÕES

1. Quatro estirpes mutantes tiveram a expressão do gene mutado regulado por naringenina quando crescidas em 2 mmol/L de NH_4Cl . Duas são reguladas positivamente e duas negativamente.

2. Vinte e duas estirpes mutantes apresentaram expressão do gene mutado regulado por naringenina quando crescidas em 20 mmol/L de NH_4Cl . Nove são reguladas positivamente e treze reguladas negativamente. Esse padrão de regulação foi alterado quando estas estirpes cresceram em 2 mmol/L de NH_4Cl , indicando que a disponibilidade de amônio pode afetar a regulação de genes por naringenina.

3. Os genes mutados de doze estirpes mutantes, que apresentaram expressão diferencial em resposta a naringenina, quando crescidas em 20 mmol/L de NH_4Cl , foram identificados.

4. Dos dez genes regulados negativamente por naringenina na presença de 20 mmol/L de NH_4Cl cinco codificam para proteínas envolvidas com a síntese de EPS e LPS. Estes resultados indicam que a naringenina está envolvida na regulação do metabolismo de EPS e LPS.

5. Nove estirpes, cujo gene mutado e regulado por naringenina, não apresentaram crescimento na presença de SDS 0,1 %. Indicando que estes genes podem estar envolvidos com a estrutura da membrana. Destacam-se as estirpes 9B3, 9D4 e 9F3 cujos produtos dos genes mutagenizados são: uma proteína relacionada com biosíntese de EPS; e duas proteínas com função de O-antígeno acetilase, relacionada com LPS;. Novamente encontramos relação entre a naringenina e os componentes da membrana bacteriana.

6. A estirpe mutante 13C4 (não identificada) apresentou diferença do perfil eletroforético de LPS em comparação com a estirpe selvagem, indicando que o gene mutado está envolvido no metabolismo de LPS.

8. O gene que codifica para a indolpiruvato ferredoxina oxirredutase foi regulado negativamente na presença de naringenina e 20 mmol/L de NH_4Cl . A expressão deste gene foi inibida na presença de AIA e ativada na presença de alto amônio.

Esse trabalho mostra que genes de *H. seropedicae* respondem ao flavonóide naringenina, positivamente e negativamente, e que em alguns casos essa regulação é afetada pela disponibilidade de amônio. Os genes identificados podem estar relacionados com a interação planta-bactéria.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; TSAI, S.M.; PARK, Y.K.; Transformações enzimáticas de flavonóides. **B. CEPPA**. V. 25, nº 01, p. 61-76, 2007.

ALTSCHUL, S.T., MADDEN, T.L., SHÄFFER, A.A., ZHANG, J., MILLER, W., LIPMAN, D.J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARNOLD, W.; BECKER, A.; KELLER, M.; ROXLAU, A.; PÜHLER, A. The role of *Rhizobium meliloti* surface polysaccharides in the infection of *Medicago sativa* nodules. **Endocytobiosis and Cell Research**, v. 17, p. 17-28, 1994.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**. V. 36. P. 86-93. 1986.

BALDANI, VLD; OLIVARES, F.L.; DÖBEREINER, J. Selection of *Herbaspirillum* spp. strains associated with rice seedlings amended with ¹⁵N-labeled fertilizer. 202. **International Symposium on Sustainable Agriculture for the tropics - The role of Biological Nitrogen Fixation**, Angra dos Reis, Brasi, 1995.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. Recent Advances In Bnf With Non-Legume Plants. **Soil Biol. Biochem.**, v. 29, p. 911-992, 1997.

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

BASTIÁN, F., COHEN, A., PICCOLI, P., LUNA, V., BARALDI, R., BOTTINI, R., Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter*

diazotrophicus and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**. v. 24, p. 7-11, 1998.

BOTTINI, R., FULCHIERI M., PEARCE, D., PHARIS, R.P. Identification of gibberellins A₁, A₃ and iso-A₃, in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**. v. 90, p. 45-47, 1989.

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

BROUGHTON, W.J.; HANIN, M.; RELIÉ, B.; KOPCIŃSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; SIMSEK, S.; OJANEN-REUHS, T.; REUHS, B.; MARIE, C.; KOBAYASHI, H.; BORDOGNA, B.; LE QUÉRE, A.; JABBOURI, S.; FELLAY, R.; PERRET, X.; DEAKIN, W.J. Flavonoid-Inducible modifications to Rhamnan O Antigenes are necessary for *Rhizobium* sp. Strain NGR234-Legume symbiosis. **Journal of Bacteriology**. v. 188, n. 10, p. 3654-3663, 2006.

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

CAMPBELL, G.R.O.; REUHS, B.L.; WALKER, G.C. Chronic intracellular infection of alfafa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolissaccharide core. **PNAS**. v. 99, p. 3938-3943, 2002.

CROZIER, A., ARRUDA, P., JASMIM, J., MONTEIRO, A.M., SANDBERG. G., Analysis of Indole-3-Acetic acid and Related Indoles in Culture Medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Enviromental Microbiology**. v. 54, p. 2833-2837, 1988.

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16S rDNA characterization of new nitrogen-fixing bacteria from Banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L) Merrill). **Applied Environmental Microbiology**. v 67, p.2375-2379, 2001.

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

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

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

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

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

HANAHAN D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol**. v. 166 p.557-580, 1983.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. V. 96, p. 67-2002.

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

JAIN, V., KUMAR, M., CHATTERJI, D. ppGpp: stringent response and survival. **J. Microbiol.** v.44, p. 1-10, 2006.

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

JOFRÉ, E.; LAGARES, A.; MORI, G. Desruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolissaccharides core, exopolissaccharide production, and root colinization in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology.** v. 231, p. 267-275, 2004.

KARGER, A.E.; HARRIS, J.M.; GESTELAND, R.F. Multiwavelength fluorescence detection for DNA sequencing using capillary electrophoresis. **Nucleic Acid Res.**, v. 19, p. 4955-4962, 1991.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U. Effect of nitrogen in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Can. J. Microbiol.** v. 43, p. 887-891, 1997.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, n. 227, p. 680-685, 1970.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology.** v. 8, n. 7, p. 298-300, 2000.

LEE, D.A.; JUN, W.J.; SHIN, D.H.; CHO, H.Y., HONG, B.S. Effect of culture conditions on production of 5-aminolevulinic Acid by recombinant *Escherichia coli*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 69, n. 03, p.470-476, 2005.

LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I.; ROUTABOUL, J-M.; BAUDRY, A.; POURCEL, L.; NESI, N.; CABOCHE, M. Genetics and Biochemistry of seed flavonoids. **Ann. Rev. Plant. Biol.** v.57, p. 405-430, 2006.

LEROUGE, I. & VANDERLEYDEN J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal-plant-microbe interactions. **FEMS microbiology Reviews.** v. 26, p. 17-47, 2001.

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

MACHADO, H.B.; YATES, M.G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of *nifR3*-like-*ntrB*-*ntrC* operon and are negatively regulated. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p.674-684, 1995.

MACHADO, I.M.P.; YATES, M.G.; MACHADO, H.B., SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Cloning and sequence of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 29, p. 1599-1602, 1996.

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

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

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

NOINDORF, L. **Identificação e caracterização do operon *orf1glnKamtB* e do gene *amtH* DE *Herbaspirillum seropedicae***. 157 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PERRET X.; STAEHELIN C.; BROUGHTON W.J. Molecular basis of Symbiotic Prosmocuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64, n. 1, p. 180-201, 2000.

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

PUGSLEY, A. P. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 57, p. 50-108, 1993.

PÜHLER, A. *et al.* What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 7, p. 137-147, 2004.

QUISPEL, A. A search of signals in endophytic microorganisms. **Molecular signals in Plant-Microbe Communications** p. 471-491, 1992.

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

REDDY, P.M.; REONDÓN-ANAYA, M.; SOTO DEL RÍO, M.D.; KHANDUAL, S. Flavonoids as Signaling Molecules and Regulators of Root Nodule Development. **Dynamic soil, Dynamic plant**. v. 1, n° 2, p. 83-94, 2007.

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

SANDKVIST, M. Type II secretion and pathogenesis. **Infect. Immun.** v. 69, p. 3523-3535, 2001.

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

SCHWAB, S. **Caracterização parcial dos elementos em cis responsáveis pela regulação da expressão do operon *glnAntrBC* de *Herbaspirillum seropedicae*.** 120 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, UFPR, Curitiba 2002.

SCHWAB, S.; RAMOS, H.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O; YATES, M.G.; CHUBATSU, L.S.; RIGO, L.U. Identification of NH₄⁺-regulated genes of *Herbaspirillum seropedicae* by random insertional mutagenesis. **Arch. Microb.** P. 379-386, 2007.

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

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling. **FEMS Microbiology Rev.** v.31, p. 425-448, 2007.

TATUSOV, R.L.; KOONIN, E.V.; LIPMAN, D.J. A genomic perspective on protein families. **Science.** v. 278, p. 631-637, 1997.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.; GIBSON, T.J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Acids Res.** v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TSAI, CM, FRASCH, CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Anal Biochem.** v. 119, p.115-119, 1982.

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

WEBSTER, G.; JAIN, V.; DAVEY, M.R.; GOUGH, C.; VASSE, J.; DÉNARIÉ, J.; COCKING, E.C. The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. **Plant, Cell & Environment.** v.21, n.4, p. 373-383, 1998.

YETHON, J.A.; VINOGRADOV, E.; PERRY, M.B.; WHITFIELD, C. Mutation of the lipopolysaccharide core glycosyltransferase encoded by *waaG* destabilizes the outer membrane of *Escherichia coli* by interfering with core phosphorylation. **Journal of Bacteriology.** v. 182, n. 19, p. 5620-5623, 2000.

ZIMMER, D.P.; SOUPENE, E.; LEE, H.L.; WENDISCH, V.F.; KHODURSKY, A.B.; PETER, B.J.; BENDER, R.A.; KUSTU, S. Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, p.14674–14679, 2000.