

LILIAN NOINDORF

**CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE PARA O
TRANSPORTE DE AMÔNIO EM *Herbaspirillum seropedicae***

Monografia apresentada para obtenção
do título de Bacharel no Curso de
Ciências Biológicas, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Curitiba
2000

ORIENTADORA:

Dra. Leda Satie Chubatsu

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Dra. Leda Satie Chubatsu pela sua orientação, apoio e ensinamentos, fundamentais para o bom transcorrer desta monografia e para minha formação.

Agradeço ao Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalho e pela chance do desenvolvimento desta monografia.

Ao prof. Emanuel M. de Souza pelas discussões, dicas e pelo tempo a mim dedicado.

Aos meus amigos Rose Adele, Mariana, Luíza, Juliana Ramos e Luciano pela amizade, carinho, risadas, ajuda e dedicação mostrados.

Aos amigos Elaine Benelli e Humberto pela ajuda e prestatividade e em especial a Fabiane pela realização das hibridizações.

À minha família, em especial a minha mãe que sempre me incentivou, ajudou, deu amor e torceu por mim.

Ao meu querido Marcus que sempre me deu força, amor e alegria quando eu precisei.

Agradeço também ao apoio financeiro do PRONEX/96.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO.....	viii
1. INTRODUÇÃO	
1.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	1
1.2 Fixação biológica de nitrogênio.....	1
1.3 Os genes <i>nif</i>	2
1.4 Assimilação de amônia.....	3
1.5 Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema <i>ntr</i>	4
1.6 Transporte de amônio.....	5
2. OBJETIVO.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Bactérias e plasmídeos.....	14
3.2 Bibliotecas genômicas.....	14
3.3 Condições de cultivo.....	14
3.4 Purificação de DNA total de <i>H. seropedicae</i>	18
3.5 Amplificação de DNA por PCR.....	18
3.5.1 Amplificação de parte do gene <i>amtB</i> a partir do DNA total de <i>H. seropedicae</i>	19
3.5.2 Amplificação de parte do gene <i>amtB</i> a partir do plasmídeo pEMB100.....	19
3.5.3 Amplificação do gene <i>amtB</i> a partir da biblioteca genômica de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> em cosmídeo pLAFR3.....	19
3.6 Purificação de DNA plasmidial	20
3.7 Análise eletroforética de DNA.....	20

3.8	Condições de digestão de DNA com enzimas de restrição.....	21
3.9	Preparo do DNA com pontas cegas.....	21
3.10	Preparo dos vetores.....	21
3.11	Ligação de DNA.....	21
3.12	Transformação bacteriana por eletroporação	22
3.12.1	Preparo de células eletrocompetentes.....	22
3.12.2	Transformação bacteriana	22
3.13	Seleção dos plasmídeos recombinantes	23
3.14	Sequenciamento de DNA.....	23
3.14.1	Preparação de DNA simples fita.....	23
3.14.2	Preparação de DNA dupla fita.....	23
3.14.3	Reação de sequenciamento.....	24
3.14.3	Tratamento da amostra após reação de sequenciamento.....	24
3.15	Infecção da bactéria <i>E. coli</i> estirpe LE392 com fago λ EMBL3 (biblioteca genômica).....	24
3.16	Transferência do DNA do fago λ EMBL3 para membranas de nylon ou nitrocelulose.....	25
3.17	Transferência do DNA do gel de agarose para membrana de nylon ou nitrocelulose.....	25
3.18	Hibridização.....	26
3.19	Purificação de DNA em gel de agarose.....	26

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1	Síntese de oligonucleotídeos para a amplificação de parte do gene que codifica para o transportador de íons amônio em <i>H. seropedicae</i>	27
4.2	Amplificação do fragmento via PCR utilizando os "primers" degenerados.....	32
4.3	Construção do plasmídeo pLN1.....	33
4.4	Sequenciamento do inserto do plasmídeo pLN1.....	35
4.5	Clonagem do gene <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i>	38

4.5.1	Hibridização do fragmento <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i> contra o banco genômico de <i>H. seropedicae</i> em fago λ EMBL3.....	38
4.5.2	Hibridização do fragmento do gene <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i> com o plasmídeo pEMB100.....	41
4.5.3	Resgate do gene <i>amtB</i> de uma biblioteca genômica de <i>H. seropedicae</i> em cosmídeo pLAFR3 por PCR.....	42
5.	CONCLUSÕES.....	47
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema <i>ntr</i> na família Enterobacteriaceae.....	6
Figura 2 – Modelo de retenção cíclica de NH ₃ / NH ₄ ⁺	8
Figura 3 – Modelo do transporte de amônio de <i>Rhizobium etli</i> para planta associada.....	11
Figura 4 – Comparação das seqüências de transportadores de amônio de <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e localização de regiões com alta homologia.....	28
Figura 5 – Seqüência dos oligonucleotídeos degenerados derivados da comparação do gene para o transporte de amônio em <i>E. coli</i> , <i>M. tuberculosis</i> e <i>B. subtilis</i>	31
Figura 6 – Produto de amplificação por PCR obtido do DNA genômico de <i>H. seropedicae</i>	32
Figura 7 – Esquema do vetor pTZ19R.....	34
Figura 8 – Análise do plasmídeo recombinante por PCR.....	36
Figura 9 – Esquema do plasmídeo pLN1.....	37
Figura 10 – Seqüência obtida do fragmento amplificado a partir do genoma de <i>H. seropedicae</i>	38
Figura 11 – Comparação da seqüência parcial do gene <i>amtB</i> de <i>H. seropedicae</i> com seqüências dos microrganismos utilizados para a síntese dos “primers” com os quais o fragmento sequenciado foi obtido.....	40
Figura 12 – Seqüência dos “primers” específicos sintetizados a partir da seqüência do fragmento do gene <i>amtB</i> clonado.....	42
Figura 13 – Esquema do cosmídeo pLAFR3.....	43
Figura 14 – Produtos de amplificação obtidos a partir da biblioteca genômica de <i>H. seropedicae</i> em cosmídeo pLAFR3, utilizando os “primers” TNH41 e TNH42.....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Comparação do uso de códons de <i>H. seropedicae</i> , <i>A. brasilense</i> e <i>E. coli</i>	30
TABELA 2 – Resultado da comparação da seqüência obtida do fragmento amplificado do genoma total de <i>H. seropedicae</i> com seqüências depositadas no banco de dados (GenBank).....	39

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é um microrganismo diazotrofo e endofítico, encontrado em associação com diversas gramíneas de interesse agrícola, como cana-de-açúcar, arroz, sorgo e milho. Em vista do alto gasto energético envolvido na redução do N_2 a NH_3 , o processo de fixação de nitrogênio é altamente regulado pelos níveis de oxigênio e amônia. Existem evidências de que a captação de amônio para dentro da célula ocorre de forma ativa, através de carreadores específicos presentes na membrana celular, conhecidos genericamente como proteínas Amt. O objetivo do nosso trabalho é a identificação do gene relacionado ao transporte de íons amônio em *H. seropedicae*. Sequências de aminoácidos de possíveis transportadores de amônio de *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Bacillus subtilis* foram analisadas e as regiões mais conservadas foram escolhidas para o planejamento de oligonucleotídeos degenerados que foram utilizados como "primers" numa reação de PCR utilizando o DNA genômico de *H. seropedicae* como molde. O produto obtido na reação de PCR foi clonado no vetor pTZ19R, originando o plasmídeo recombinante pLN1. O inserto foi sequenciado e submetido a comparação com o banco de dados, mostrando-se bastante similar as seqüências de transportadores de amônio de diversos organismos, sugerindo a presença de um gene homólogo ao transportador de amônio em *H. seropedicae*. Este fragmento está sendo utilizado para a clonagem do gene *amt* completo deste organismo.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae é um diazotrofo associativo isolado das raízes de gramíneas e mais recentemente do interior de folhas e caules de cana-de-açúcar e arroz (BALDANI *et al.*, 1986; 1992). Eles são bactérias Gram-negativas, vibrióides, algumas vezes helicoidais e muito móveis, capazes de fixar nitrogênio sob condições microaeróbicas (BALDANI *et al.*, 1986). *H. seropedicae* fixa nitrogênio em uma ampla faixa de pH e, aparentemente, em uma maior concentração de oxigênio que as espécies de *Azospirillum* (BALDANI *et al.*, 1986; FU & BURRIS, 1989; KLASSEN, 1994).

O caráter endofítico obrigatório destes organismos foi recentemente revelado (BODDEY *et al.*, 1995) e ele está classificado, com base na análise de sequências de rRNA, como sendo um membro do subgrupo β das Proteobactérias (YOUNG, 1992).

BALDANI *et al.* (1995) inocularam diferentes estirpes de *Herbaspirillum* em sementes de arroz e observaram que a estirpe Z94 contribui com até 54% do nitrogênio total acumulado pela planta e outras estirpes também fixaram aproximadamente 30% de nitrogênio. Este experimento confirma o potencial de estirpes de *Herbaspirillum* para fixar nitrogênio associado a arroz. Além disso, após 30 dias de inoculação houve um aumento no peso úmido e seco das plantas.

1.2 Fixação biológica de nitrogênio

A amônia é o composto nitrogenado de mais fácil utilização em procariotos e que proporciona a maior velocidade de crescimento se comparado a outras fontes nitrogenadas. Entretanto, em várias situações, a bactéria é obrigada a utilizar outras fontes de nitrogênio. Neste caso, esses organismos são capazes de sintetizar proteínas visando a captação e metabolização destes compostos. A síntese e, em alguns casos, a atividade dessas proteínas são altamente reguladas em relação a disponibilidade desses compostos (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Fixação biológica de nitrogênio é o processo de redução do dinitrogênio gasoso (N₂) a amônia, catalisado pela complexo enzimático denominado nitrogenase. A estequiometria desta reação é a seguinte:



A expressão da fixação de nitrogênio pelos diazotrofos requer condições ambientais favoráveis. Dentre estas incluem-se ausência de nitrogênio fixado, baixas tensões de oxigênio, presença de molibdênio e temperatura adequada (POSTGATE, 1982). Nitrogênio fixado (NH₄⁺) e oxigênio afetam a expressão das proteínas envolvidas na fixação de nitrogênio nos diversos organismos diazotróficos estudados (EADY, 1986; POSTGATE, 1982).

Em vista do alto gasto energético envolvido na redução do dinitrogênio gasoso a amônia, o processo de fixação de nitrogênio é altamente regulado, tanto na atividade da nitrogenase como na expressão dos seus genes. O controle da expressão dos genes estruturais do complexo enzimático nitrogenase é feita de maneira intrincada, envolvendo cascatas de genes regulatórios. De maneira simplificada, a atividade ou síntese do complexo enzimático nitrogenase só ocorre em baixos níveis de oxigênio e na ausência de amônia.

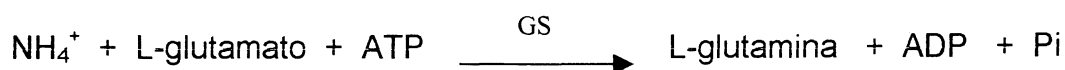
1.3 Os genes *nif*

Os genes *nif* codificam proteínas provavelmente essenciais para a biossíntese das proteínas do complexo nitrogenase (MERRICK *et al.*, 1982). As proteínas codificadas pelos genes *nifLA*, são responsáveis pelo controle da transcrição dos demais genes *nif*, sendo a proteína NifA ativadora de transcrição e a NifL anti-ativadora em *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans* e *Azotobacter vinelandii* (MERRICK, 1983).

1.4 Assimilação de amônia

A amônia formada no processo de redução de N₂ atmosférico ou captada do meio externo é utilizada para a síntese de glutamina e glutamato. Na maioria das células, esses compostos servem de doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas. A assimilação da amônia nos procariotos pode ocorrer por duas vias: a) a glutamina sintetase (GS) (reação 1) e a glutamato sintase (GOGAT) (reação 2) e b) glutamato desidrogenase (GDH) (reação 3) (MERRICK & EDWARDS, 1995).

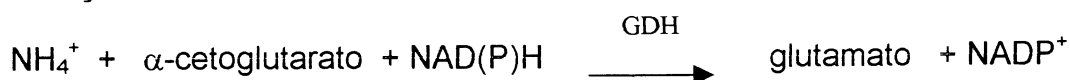
REAÇÃO 1



REAÇÃO 2



REAÇÃO 3



A via da GDH é utilizada quando as células crescem na presença de excesso de nitrogênio fixado, enquanto a via GS/GOGAT em condições limitantes (MERRICK & EDWARDS, 1995).

1.5 Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema *ntr*.

O sistema *ntr* controla o metabolismo geral de nitrogênio, regulando a utilização de fontes alternativas de nitrogênio como nitrato e aminoácidos (DRUMMOND *et al.*, 1983).

Em enterobacteriáceas este sistema é composto por seis proteínas: NtrB (produto do gene *ntrB*), NtrC (produto do gene *ntrC*), GlnD (produto do gene *glnD*), proteína PII (produto do gene *glnB*), GlnE (produto do gene *glnE*) e glutamina sintetase (produto do gene *glnA*). Essas proteínas interagem em um complexo mecanismo em cascata (MERRICK & EDWARDS, 1995). Recentemente, foi descoberto um gene homólogo ao *glnB*, denominada *glnK* (van HEESWIJK *et al.*, 1996), entretanto o seu papel no sistema *ntr* ainda não está completamente esclarecido.

A atividade das proteínas NtrB, NtrC e glutamina sintetase, é dependente da relação α -cetogluturato/glutamina (BUENO *et al.*, 1985). Em baixas concentrações de íons amônio, quando a relação α -cetogluturato/glutamina é alta, o α -cetogluturato induz uma mudança conformacional na proteína PII, que adquire uma conformação ótima para a uridililação pela proteína GlnD. O produto do gene *glnD* possui duas atividades catalíticas dependendo do nível intracelular de nitrogênio fixado: em condições limitantes de NH_4^+ a proteína GlnD possui atividade de uridililtransferase e catalisa a adição do grupamento UMP à proteína PII, enquanto que em condições de excesso de NH_4^+ , GlnD adquire atividade de enzima removedora de UMP (de MEL *et al.*, 1994). A proteína PII-UMP não interage com NtrB que, na sua forma livre, catalisa a fosforilação da proteína NtrC, ativando-a. A proteína NtrC fosforilada (NtrC-P) é um ativador de transcrição do gene *nifA* e do operon *glnAntrBC* (*glnAp2*) de *K. pneumoniae* (REITZER & MAGASANIK, 1985 e MAGASANIK, 1989). PII-UMP interage com a adenililtransferase (ATase) que catalisa a desadenilação da glutamina sintetase, ativando-a (BROWN *et al.*, 1971; KAMBEROV *et al.*, 1995 e MERRICK & EDWARDS, 1995). A glutamina sintetase desadenilada passa então a produzir glutamina (KEENER & KUSTU, 1988).

Em condições de excesso de nitrogênio fixado a proteína GlnD liga glutamina, o que inibe sua atividade de uridililtransferase e ativa a de enzima removedora de UMP, favorecendo a desuridililação de PII (de MEL *et al.*, 1994). A proteína PII desuridililada estimula a atividade de fosfatase da proteína NtrB, que desfosforila NtrC-P, inativando-a. Ao mesmo tempo a PII desuridililada age sobre a ATase, que passa a catalisar a adenilação da glutamina sintetase. A glutamina sintetase adenilada é inativa (HAWKES *et al.*, 1985 e MERRICK & EDWARDS, 1995) (figura 2).

Em condições limitantes de nitrogênio fixado, a proteína NtrC fosforilada ativa a transcrição dos genes *glnAntrBC*, dos genes *nifLA* e de outros sistemas alternativos de assimilação de fonte nitrogênio (MERRICK & EDWARDS, 1995). Além disso a atividade da GS é estimulada pela desadenilação. Neste caso a assimilação de NH_4^+ é máxima. Quando os níveis de NH_4^+ são altos, a síntese da glutamina sintetase é diminuída e sua atividade inibida por adenililação. Neste caso a principal via de assimilação de NH_4^+ passa a ser a glutamato desidrogenase (MERRICK & EDWARDS, 1995).

1.6 Transporte de amônio

Evidências sobre a existência de transportadores ativos de íons amônio (denominados genericamente por Amt) em procariotos são descritas em cerca de 50 espécies. A análise das proteínas codificadas pelos genes *amt* já clonados, indicam que são proteínas transmembrânicas e compartilham elevada homologia (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Segundo KLEINER (1985), o transporte de amônia através da membrana celular pode ocorrer por duas vias: a primeira, um transporte passivo, envolveria a difusão da amônia em sua forma neutra através da membrana celular a favor de um gradiente de concentração. A segunda, capta a forma protonada (NH_4^+) do meio extracelular, sendo aparentemente dependente de energia.

A existência de um gradiente de concentração de NH_4^+ através da membrana celular de muitos procariotos, contra o qual o transporte de NH_4^+ tem

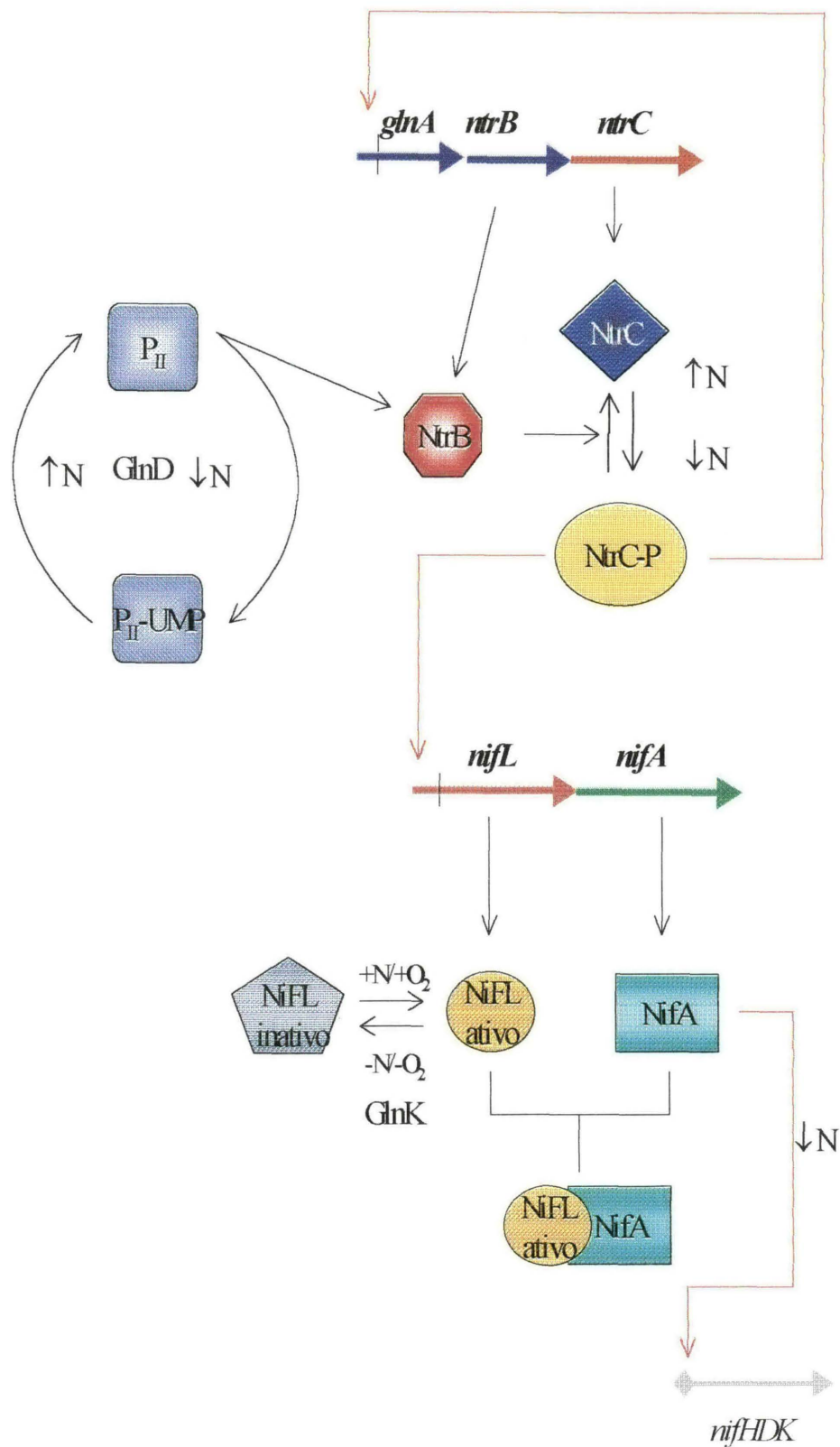


Figura 1 – Controle do metabolismo geral de nitrogênio pelo sistema *ntr* na família Enterobacteriaceae (FISCHER, 1994).

sido freqüentemente observado é uma das evidências da existência de transportadores ativos de íons amônio. Se a permeação ocorresse exclusivamente pela difusão inespecífica de NH_3 , seria impossível o acúmulo de NH_4^+ , já que o interior da maioria das bactérias é alcalino em relação ao meio externo (KLEINER, 1985). Segundo esta teoria, o transportador de NH_4^+ não impediria a perda de NH_3 por difusão, mas estaria constantemente recuperando-a, após sua protonação, do meio extracelular. Isto poderia explicar a perda constante de NH_3 em mutantes Amt^- . Estudos em *K. pneumoniae* apresentaram valores de coeficiente de permeabilidade da membrana celular bastante elevados ($1.8 \times 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$), similares ao coeficiente de permeabilidade da água (KLEINER, 1985). A diminuição do potencial de membrana resultante do transporte eletrogênico de NH_4^+ seria balanceado por uma exportação de prótons dependente de energia (figura 2).

Recentemente, porém, SOUPENE *et al.* (1998) sugeriram que a proteína Amt é responsável pelo transporte de NH_3 através da membrana plasmática em *Escherichia coli*. Evidências para esta conclusão derivam dos efeitos do pH sobre a taxa de crescimento: mesmo em baixas concentrações de NH_4^+ os efeitos da disrupção do transportador são significativos apenas em culturas com valores de pH abaixo de 7. Estes dados indicam que a função do Amt só é requerida para o crescimento ótimo de *E. coli* quando a concentração de NH_3 externa cai para níveis muito baixos. Além disso, a disrupção do Amt resulta num maior crescimento de *E. coli* em uma fonte pobre de nitrogênio (arginina), levando à hipótese de que NH_3 pode difundir para fora através do Amt quando sua concentração interna excede aquela do meio. Em pH 7 a expressão constitutiva do gene *amt* não melhorou o crescimento deficiente, em condições limitantes de nitrogênio, de um mutante de *Salmonella typhimurium* que não apresentava a atividade de GS. Esta deficiência no crescimento parece ser causada pela necessidade de uma alta concentração interna de NH_4^+ , requerida para assimilação de amônia via GDH, o que indica que o Amt não concentra este íon.

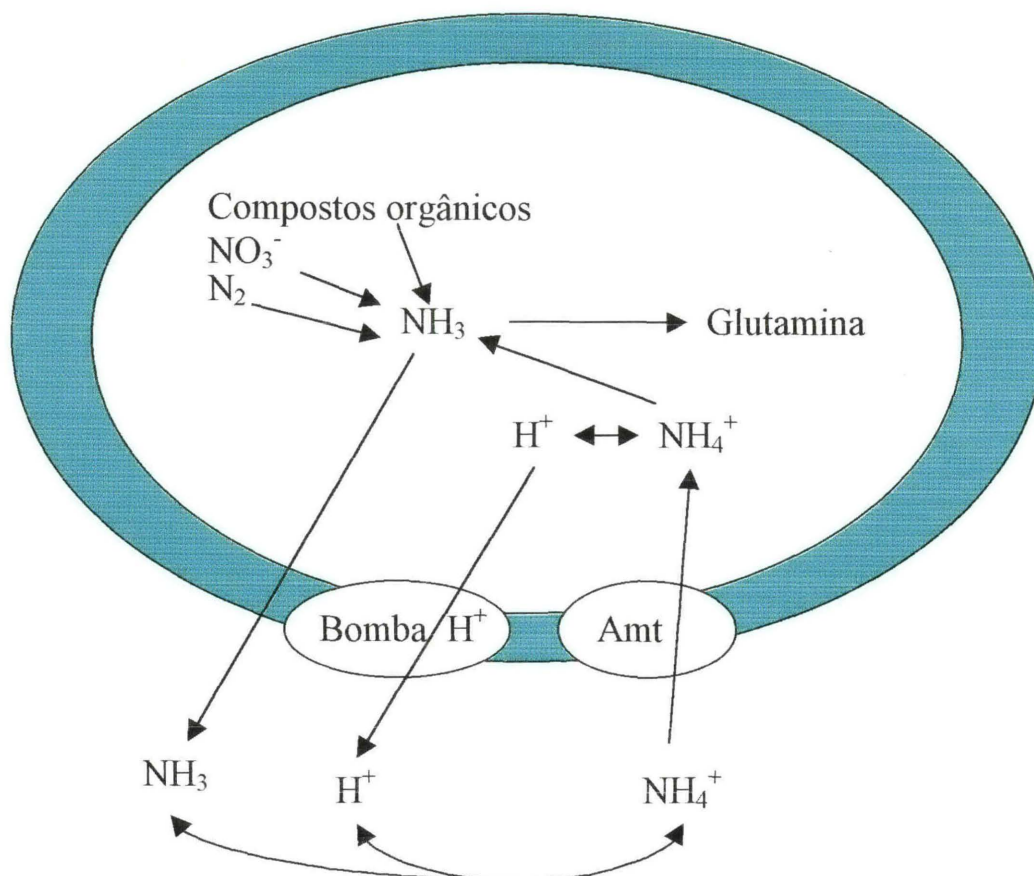


Figura 2 – Modelo de retenção cíclica de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, segundo KLEINER (1985).

Mutações de gene *nifL* em *A. vinelandii* resultam na excreção de amônia pela bactéria (BREWIN *et al.*, 1999). Neste organismo a expressão do operon *nifLA* não está sob controle do sistema *ntr* e o gene *nifL* é a única forma de regulação de regulon *nif*. Nenhuma evidência, no entanto, foi encontrada de que a proteína NifL controla o seu sistema de transporte de amônia. A excreção de amônia parece ocorrer devido a perda passiva de NH_3 , a qual se acumula em altas concentrações dentro da célula como resultado de uma aumentada e prolongada expressão da nitrogenase, causada pela perda da função da proteína NifL ou pela superexpressão da proteína NifA.

Medidas da concentração intracelular de amônia em estirpes selvagem de *A. vinelandii* mostraram que esta pode ser até 20 vezes maior do que em *K. pneumoniae*. Se a membrana celular é tão permeável a NH_3 como proposto por KLEINER (1985) ($1.8 \times 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$), o custo energético para manutenção desta concentração de amônia através da retenção cíclica seria três a cinco vezes maior do que aquele requerido para sua fixação, sendo, portanto desnecessário, visto a alta afinidade da GS por amônia. Estimativas de coeficientes de permeabilidade menores da NH_3 através da membrana celular seriam mais realistas (BREWIN, *et al.* 1999).

Mutantes de *A. vinelandii* que excretam amônia tem uma concentração de amônia intracelular apreciavelmente maior que a estirpe selvagem e estas concentrações invariavelmente excedem aquela do meio extracelular, sugerindo que amônia é perdida passivamente pela célula. Quando o meio torna-se alcalino, a perda passiva provavelmente requer a difusão de NH_4^+ bem como de NH_3 , porque assumindo que o pH intracelular é controlado, concentrações extremamente altas de amônia intracelular são requeridas para gerar o gradiente de concentração necessário para que ocorra excreção de amônia. Assim, parece que amônia é perdida da célula através da difusão passiva de NH_4^+ através de um carreador específico.

A expressão do gene *amtB* de vários organismos como *E. coli*, *Azospirillum brasilense* e *S. typhimurium* (van HEESWIJK, *et al.*, 1996; van DOMMELEN *et al.*, 1998; SOUPENE *et al.*, 1998) ocorre em condições limitantes de amônio e parece ser dependente da proteína NtrC. A repressão por altos níveis de amônia extracelular, nesses casos, pode estar relacionada à captação rápida e suficiente da amônia pelo processo de difusão que atenderia à necessidade celular por nitrogênio.

Um modelo de regulação do gene *amtB* em *R. etli* foi recentemente proposto por TATÉ, *et al.* (1999). Bactérias do gênero *Rhizobium* são capazes de induzir o desenvolvimento de nódulos simbióticos em raízes de plantas leguminosas. Durante o desenvolvimento destes nódulos a bactéria se diferencia em bacteróides capazes de fixar nitrogênio, devido a ativação da nitrogenase. Os

bacterióides diferentemente das bactérias livres, são incapazes de assimilar o nitrogênio fixado devido ao desaparecimento da proteína NtrC, ativador transcricional do gene *glnA* (codifica para a proteína GS). A proteína NtrC ativa também a transcrição do gene *amtB* neste organismo. Assim, a NH_3 pode difundir passivamente através da membrana bacterióide para dentro do relativamente ácido espaço periobacterióide, onde é convertida para NH_4^+ , a qual então, entra no citosol da planta através de um transportador de amônio localizado na membrana periobacterióide (Figura 3). A expressão constitutiva do gene *amtB* interfere com a nodulação e com a fixação de nitrogênio. Isto pode ocorrer devido a captação de NH_4^+ do espaço periobacterióide para o interior do bacterióide, o que gera um ciclo fútil com conseqüências negativas para a associação simbiótica.

A existência de dois transportadores de amônio tem sido proposta em *A. vinelandii* (MELETZUS *et al.*, 1998). Mutantes *amtB* deste organismo apresentam deficiência no transporte de metilamônio, mas crescem eficientemente em concentrações limitantes de amônia. *Azoarcus* sp. e *Rhodobacter capsulatus* também possuem dois genes potencialmente codificando para transportadores de amônio, *amtB* e *amtY* (MARTIN & REINHOLD-HUREK, 1999; YAKUNIN & HALLENBECK, 1999). Mutantes *amtB* ou *amtY* de *R. capsulatus* não apresentam deficiência de crescimento e possuem taxas de transporte de amônia semelhantes a estirpe selvagem, mas, assim como em *A. vinelandii*, mutantes *amtB* não são capazes de transportar metilamônio. Mutantes *amtB*, mas não mutantes *amtY*, são também totalmente incapazes de ADP-ribosilação da proteína Fe ou outras modulações da atividade da nitrogenase em resposta a adição de NH_4^+ , o que sugere que a proteína AmtB funciona primariamente como um sensor de amônia para os processos que regulam a atividade da nitrogenase.

O estudo da organização e regulação dos genes envolvidos direta ou indiretamente no processo de fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* é de importância não só acadêmica, como também prática. Supondo que ocorra o transporte ativo de íons NH_4^+ , o isolamento de mutantes de *H. seropedicae* deficientes nesse transporte, poderia permitir, num primeiro aspecto, o

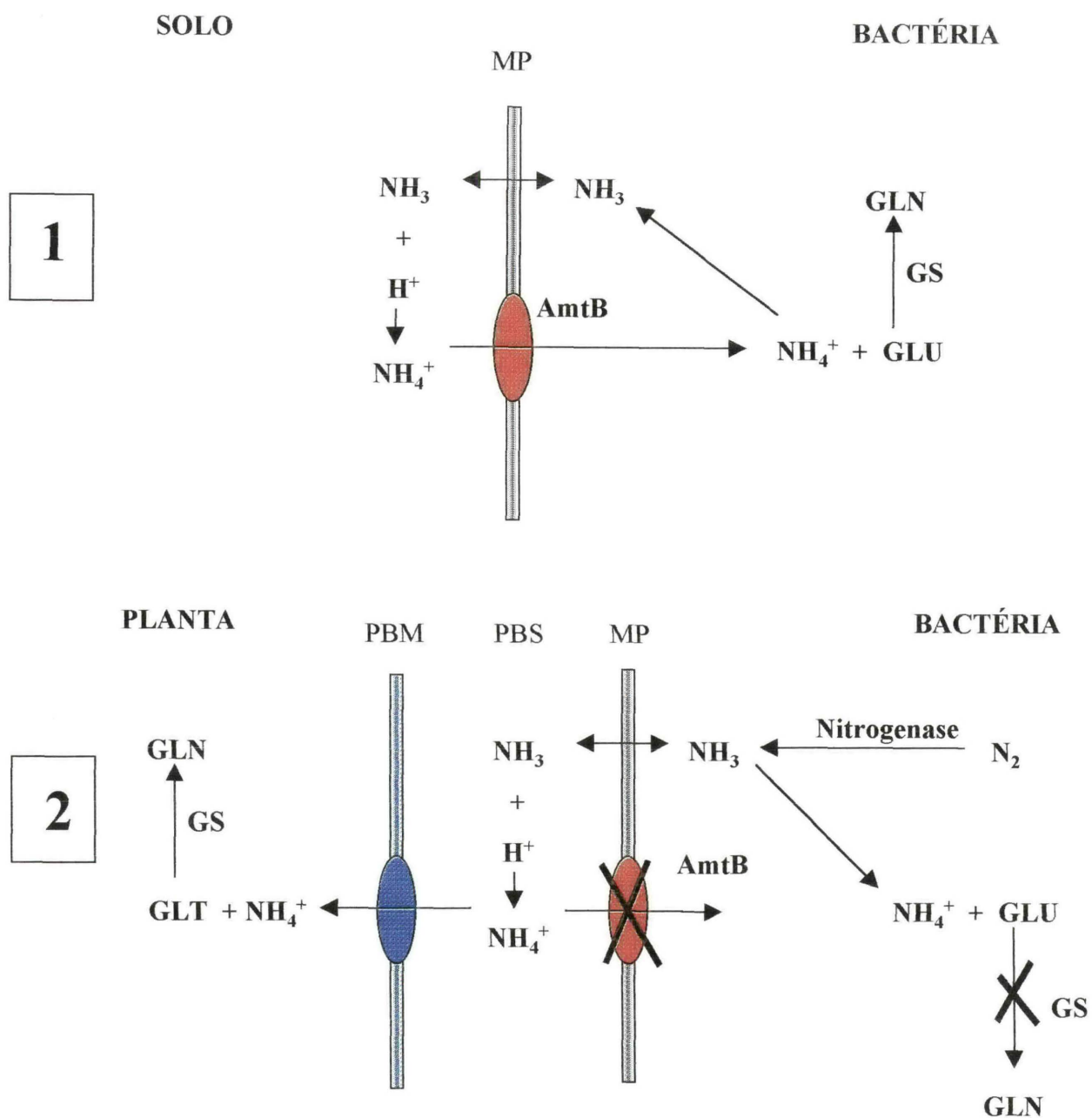


Figura 3 - Modelo do transporte de amônio de *Rhizobium etli* para planta associada (adaptado de TATÉ *et al.*, 1999).

1 - representação da bactéria antes de infecção, 2 - representação após infecção da planta. (GLN) indica glutamina, (GLU) glutamato, (PMB) membrana peribacterióide, (PBS) espaço peribacterióide e (GS) glutamina sintetase.

funcionamento do sistema de fixação de nitrogênio em concentrações mais elevadas de amônia extracelular (na bactéria selvagem, a adição de amônia ao meio de cultura leva a uma acentuada diminuição na atividade e síntese da nitrogenase). Outro aspecto desses mutantes deficientes no transporte de amônia, seria uma maior dificuldade em recaptar a amônia obtida pelo processo de fixação e que teria sido eliminada por difusão. Neste ponto, vale salientar que a amônia produzida pelo processo de fixação de nitrogênio e não captada/utilizada pelo sistema bacteriano, poderia sofrer difusão para o exterior deste microorganismo, permitindo a sua utilização pela planta associada. Esses aspectos são extremamente interessantes, na medida em que *H. seropedicae* é capaz de associar-se a diversos vegetais de interesse agrícola. Assim, mutantes de *H. seropedicae* deficientes em transporte de amônio poderiam atuar, em determinadas situações, como biofertilizantes.

2. OBJETIVO

- Clonar e seqüenciar as regiões codificadoras para transportadores de íons amônio de *H. seropedicae*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

BACTÉRIAS

Herbaspirillum seropedicae

SmR1 (Z78, Sm^R, Nif⁺; SOUZA *et al.*, 1995)

Escherichia coli

XL1Blue (SAMBROOK *et al.*, 1989)

7118 (MESSING *et al.*, 1977)

LE 392 (SAMBROOK *et al.*, 1989)

PLASMÍDEOS

pTZ19R (MEAD *et al.*, 1986)

pLN1 (este trabalho; contém parte do transportador de amônio de *H. seropedicae*)

pEMB100 (BENELLI *et al.*, 1997)

3.2 BIBLIOTECAS GENÔMICAS

Foram utilizadas bibliotecas genômicas de *H. seropedicae* construídas em fago λ EMBL3 (MACHADO *et al.*, 1995) e no cosmídeo pLAFR3, mantida na bactéria *E. coli* estirpe DH5 (STEFFENS, 1994).

3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

H. seropedicae estirpe SmR1 foi cultivada em meio NFbHP-malato (PEDROSA & YATES, 1984), adicionado de 20 mmol/L de NH₄Cl (NFbHPN) como fonte de nitrogênio. As culturas foram crescidas sob agitação (150 rpm) a 30°C.

E. coli estirpes XL1Blue e 7118 foram cultivadas em meio líquido Luria-broth (LB) (SAMBROOK *et al.*, 1989) ou Terrific broth (SAMBROOK *et al.*, 1989) sob agitação ou em meio sólido MacConkey ou LA, a 37°C.

E. coli estirpe LE392 foi cultivada sob agitação em meio líquido Triptonabroth (TB) contendo 2% de maltose ou NCZYM adicionado de 10 mmol/L de $MgCl_2$ a 37°C.

Composição dos meios de cultura

NFbHP-malato

	gramas/litro
KH_2PO_4	4,0
K_2HPO_4	6,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
NaCl	$1,0 \cdot 10^{-1}$
$CaCl_2$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Ácido nitrilo-triacético	$5,6 \cdot 10^{-2}$
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Ácido málico	5,0
Biotina	$1,0 \cdot 10^{-4}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
$MnSO_4 \cdot H_2O$	$2,35 \cdot 10^{-3}$
H_3BO_3	$2,8 \cdot 10^{-3}$
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	$8,0 \cdot 10^{-5}$
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	$2,4 \cdot 10^{-4}$

O meio sólido foi obtido pela adição de ágar na concentração de 15 g/L ao meio líquido.

LB

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

O meio sólido foi obtido pela adição de ágar na concentração de 15 g/L ao meio líquido, sendo denominado LA.

Terrific broth

Extrato de levedura	24,0 g/L
Triptona	12,0 g/L
glicerol	4,0 mL/L
KH_2PO_4	2,31 g/L
K_2HPO_4	12,54 g/L

TB

	gramas/litro
Cloreto de sódio	8,0
Triptona	10,0

NCZYM

	gramas/litro
Nz amina	10
NaCl	5
Extrato de levedura	5
Casamino ácidos	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	2

MacConkey

	gramas/litro
Peptona	17
Polipeptona	3
Lactose	10
Sais biliares	1,5
Cloreto de sódio	5
Ágar	13,5
Vermelho neutro	0,03
Cristal Violeta	0,001

Antibióticos

Os antibióticos usados foram:

	Concentração final
ampicilina (Amp)	200 µg/mL
estreptomicina (Sm)	80 µg/mL
Canamicina (Km)	50 µg/mL

Estocagem

Estoques de *E. coli* e *H. seropedicae* foram mantidos em glicerol 50% a -20°C .

3.4 PURIFICAÇÃO DE DNA TOTAL DE *H. seropedicae*

Cinquenta mililitros de cultura de *H. seropedicae* ($\text{D.O.}_{600} \cong 2,0$), crescida em meio NFbHPN contendo Sm, foi centrifugada à 5000 rpm por 10 minutos, a 4°C . As células foram lavadas com 30 mL do tampão TES (Tris-HCl pH8,0, 50 mmol/L; EDTA pH 8,0, 20 mmol/L; NaCl 200 mmol/L) e ressuspensas em 20 mL do mesmo. As células foram incubadas com a enzima lisozima (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 1 hora, a 30°C . Para completar a lise das células foi adicionado o detergente SDS 1% (m/V) e a mistura incubada a 55°C por 10 minutos. A degradação das proteínas foi feita adicionando-se proteinase K (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubação a 50°C por 8 horas. A mistura foi finalmente extraída com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) (2x) e com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (1x). Após a extração o DNA foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto a -20°C por 2 horas, lavado com 1mL de etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 100 μL de água destilada contendo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase.

3.5 AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR

A amplificação de parte do gene que codifica para o transportador de íons amônio foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (KOCHER & WILSON, 1991).

A reação de amplificação foi feita em termociclador Perkin-Elmer 2400 utilizando-se o tampão Gibco PCR uma vez concentrado, 0,2 mmol/L de dNTPs, DNA purificado (molde), 0,2 pmol/ μL de cada oligonucleotídeo ("primers"), 1,5 mmol/L de cloreto de magnésio e 1U da enzima Taq DNA polimerase.

3.5.1 Amplificação de parte do gene *amtB* a partir do DNA total de *H. seropedicae*

Os “primers” utilizados para a amplificação de parte do gene *amtB* a partir do DNA genômico de *H. seropedicae* foram oligonucleotídeos sintetizados quimicamente (Gene Assembler da Pharmacia). A sequência desses oligonucleotídeos foi obtida a partir da comparação das sequências de transportadores de amônio de diversos organismos, depositadas em banco de dados (GenBank).

Foram utilizados 10µg de DNA genômico como molde e o volume final da reação foi de 50 µL. Os parâmetros do termociclador foram: 1 ciclo de 10 minutos a 94°C; 10 ciclos de 5 minutos a 94°C, 2 minutos a 20°C e 2 minutos a 72°C; 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 20°C e 2 minutos a 72°C e 2 ciclos de 10 minutos a 72°C. Durante a elevação da temperatura de 20°C a 72°C foi utilizada apenas 10% da potência na primeira etapa de amplificação e 20% da potência na segunda. O fragmento amplificado foi analisado em gel horizontal de agarose 1,5%, utilizando o tampão TAE 1X (0,04mols/L Tris-Acetato e 0.001mols/L EDTA).

3.5.2 Amplificação de parte do gene *amtB* a partir do plasmídeo pEMB100

A reação de PCR e os parâmetros do termociclador foram os mesmos do item anterior, com exceção do “template” que aqui foi o plasmídeo pEMB100 (BENELLI *et al.*, 1997).

3.5.3 Amplificação do gene *amtB* a partir da biblioteca genômica de *H. seropedicae* em cosmídeo pLAFR3

Para esta amplificação foram utilizados os “primers” específicos TNH41 e TNH42, obtidos a partir de parte do gene que codifica para o transportador de íons amônio em *H. seropedicae*, juntamente com os “primers” reverso e universal. Como molde foram utilizados um conjunto de cosmídeos de uma biblioteca genômica de *H. seropedicae* em cosmídeo pLAFR3. Foram feitas quatro diferentes reações: com o “primer” universal e TNH41; universal e TNH42; reverso

e TNH41; e reverso e TNH42. Os parâmetros do termociclador foram: 1 ciclo de 5 minutos a 96°C, 2 minutos a 40°C e 4 minutos a 72°C; 35 ciclos de 40 segundos a 95°C, 40 segundos a 40°C e 4 minutos a 72°C e 1 ciclo de 30 segundos a 95°C e 10 minutos a 72°C.

3.6 PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

O método utilizado para a purificação de plasmídeos foi o de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989).

A bactéria *E. coli* contendo o plasmídeo de interesse foi crescida em 5 mL de meio LB com ampicilina até uma D.O.₆₀₀ \cong 2,0. A cultura foi transferida para tubos plásticos de 1,5 mL e, as células coletadas por centrifugação (13.000 x g, 1 minuto) foram ressuspensas em 100 μ L de uma solução contendo Tris-HCl 25 mmol/L, pH 8,0; glicose 50 mmol/L e EDTA 10 mmol/L (GET). As células foram lisadas com 200 μ L de uma solução contendo NaOH 0,2 mol/L e SDS 1% (m/V). As proteínas, o DNA cromossomal desnaturado, os restos celulares e o SDS foram precipitados com a adição de 180 μ L de acetato de potássio 3 mol/L pH 4,8 e incubação por 10 minutos em gelo. As amostras foram, então, centrifugadas (13.000 x g, 5 minutos) e a solução aquosa foi extraída com 100 μ L de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O DNA plasmidial foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 70%, seco à vácuo e dissolvido em 30 μ L de água contendo RNase na concentração final de 10 μ g/mL. Após, foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

3.7 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE DNA

A eletroforese de DNA foi feita em gel de agarose horizontal como descrito por MANIATIS *et al.* (1982).

O tampão utilizado foi TAE 1X (Tris-acetato 40 mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,0). O DNA foi visualizado após tratamento com solução de brometo de etídeo (0,5 mg/mL) em transiluminador de luz ultravioleta e o perfil eletroforético

registrado fotograficamente ou utilizando um sistema de vídeo imagem acoplada a equipamento de impressão térmica (GDS 5000).

3.8 CONDIÇÕES DE DIGESTÃO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

As condições utilizadas para a digestão de DNA com enzimas de restrição foram aquelas especificadas pelo fabricante ou por MANIATIS *et al.* (1982).

Usualmente 1-5 U das diferentes enzimas de restrição foram utilizadas para digestão de 0,2 – 1 µg de DNA em um volume de 20 µL durante 4 horas na presença do tampão adequado a 37°C.

3.9 PREPARO DO DNA COM PONTAS CEGAS

Os produtos de PCR a serem ligados em terminal cego foram tratados com a enzima T4 DNA polimerase. A reação foi feita utilizando-se o tampão T 1X concentrado da Amersham (33 mmol/L Tris –acetato pH 7,9; 10 mmol/L de acetato de magnésio; 0,5 mmol/L de ditioneitol e 66 mmol/L de acetato de potássio), 0,3% de BSA (soroalbumina bovina) acetilada, 0,17 mmol/L de dNTP's, 0,4 U de T4 DNA polimerase e 1µg DNA.

3.10 PREPARO DOS VETORES

Os vetores foram linearizados com a enzima de restrição adequada. Após a restrição, a enzima foi desnaturada por calor ou retirada por extração com um volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). O DNA extraído foi precipitado com etanol absoluto, lavado, seco e dissolvido em água.

3.11 LIGAÇÃO DE DNA

O vetor linearizado (item 3.10) foi ligado ao inserto numa proporção de 1:5 (mol) utilizando tampão de ligação, 0,8 U de T4 DNA ligase e incubação a 16°C

durante a noite. No caso de ligação em terminal coesivo, a mistura vetor-inserto foi aquecida a 65° C por 5 minutos e resfriada em gelo antes da adição do tampão e da enzima.

3.12 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

3.12.1 Preparo de células eletrocompetentes

Dois e meio mililitros de uma cultura saturada foram inoculados em 250 mL de meio LB, quando *E. coli* e em meio NFbHPN, quando *H. seropedicae*. A cultura foi crescida até D.O.₆₀₀ 0,5 -1,0. As células foram coletadas por centrifugação (5000 rpm por 15 minutos) e lavadas duas vezes com água estéril (250 e 150 mL). Em seguida, foram ressuspensas em glicerol 10%, centrifugadas novamente (10.000 rpm por 5 minutos), ressuspensas em um volume final de 0,5 mL de glicerol 10%, separadas em alíquotas de 40 µL e estocadas a -70°C.

3.12.2 Transformação bacteriana

O método utilizado foi indicado pelo fabricante do eletroporador (Gibco-BRL).

Foi adicionado 1µL da ligação vetor-fragmento em 40 µL da bactéria *E. coli* eletrocompetente. A suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação e submetida a um campo elétrico de 4kV, 200Ω, 330µF, a fim de permitir a entrada do plasmídeo na bactéria. Um mililitro do meio LB foi adicionado à cubeta e a amostra foi incubada a 37°C sob agitação, por uma hora. Após incubação a suspensão foi plaqueada em meio sólido LA ou MacConkey contendo os antibióticos adequados.

3.13 SELEÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

Os plasmídeos recombinantes inseridos em *E. coli* foram selecionados em meio diferencial MacConkey contendo ampicilina (resistência do vetor pTZ19R). As colônias brancas foram crescidas em meio LB contendo o mesmo antibiótico para posterior purificação do DNA plasmidial.

3.14 SEQUENCIAMENTO DE DNA

3.14.1 Preparação de DNA simples fita

Cinco mililitros da bactéria hospedeira *E. coli* estirpe XL1BLUE contendo o plasmídeo de interesse foram crescidos durante a noite em meio LB com os antibióticos ampicilina e tetraciclina. Para a infecção, 50 μ L desta cultura foram inoculados em 3 mL do meio Terrific broth com os antibióticos ampicilina, tetraciclina e kanamicina, 2% de glucose e 100 μ L do fago M13KO7 e deixados a 37°C sob agitação por aproximadamente 24 horas.

A cultura foi transferida para tubos plásticos de 1,5 mL e centrifugada a 13.000 x g por 3 minutos. Um mililitro do sobrenadante foi coletado e a este foi adicionado 250 μ L de PEG (polietilenoglicol) 20% e NaCl 2,5 mol/L e o sistema foi incubado em gelo por no mínimo 30 minutos. A mistura foi, então, centrifugada a 13.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e a amostra foi submetida a nova centrifugação a 13.000 x g por 30 segundos, para retirar o excesso de PEG e ressuspensa em 100 μ L de Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 e EDTA 1mmol/L. A mistura foi extraída uma vez com 50 μ L de fenol e uma vez com 50 μ L de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Após a extração o DNA foi precipitado com 3 volumes de etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 80%, seco à vácuo e ressuspensa em 40 μ L de água.

3.14.2 Preparação de DNA dupla fita

A purificação de DNA plasmidial para posterior sequenciamento foi realizado basicamente como no item 3.6. Após dissolvido em água, o DNA foi

incubado com RNase (concentração final de 1 µg/mL) por 3 horas a 37°C. Foram feitas, então, mais duas extrações com 100 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, o DNA foi precipitado com 450 µL de etanol absoluto, lavado, seco e dissolvido em aproximadamente 8 µL de água.

3.14.3 Reação de sequenciamento

O procedimento é baseado na incorporação de dideoxynucleotídeos marcados com material fluorescente. Nesta reação foram utilizados aproximadamente 0,5 µg do DNA purificado, 2,6 µL de tampão TACS (Tris 106 mmol/L, MgCl₂ 2,6 mmol/L e (NH₄)₂SO₄), 15 pmol do primer apropriado e 6,0 µL de mistura para sequenciamento Terminator Ready Rxn Mix (Perkin-Elmer). O volume final da reação foi de 20 µL. A reação foi feita utilizando-se um termociclador e os parâmetros foram: 1 ciclo de 5 minutos a 95°C e 35 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 40°C e 6 minutos a 60°C.

3.14.4 Tratamento da amostra após reação de sequenciamento

O produto da reação de sequenciamento foi precipitado com 7 µL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 100 µL de etanol absoluto, centrifugado (13.000 g por 15 minutos), lavado com etanol 70%, dissolvido em 15 µL de TSR (Template Suppression Reagent), desnaturado (96°C por 5 minutos) e submetido a eletroforese no Sequenciador Automático de DNA da Applied Biosystems ABI-PRIZM 310 (Perkin-Elmer).

3.15 INFECÇÃO DA BACTÉRIA *E. coli* ESTIRPE LE392 COM FAGO λ EMBL3 (BIBLIOTECA GENÔMICA)

A bactéria *E. coli* estirpe LE392 foi crescida em meio TB com maltose até D.O₆₀₀ ≅ 2. As células foram coletadas por centrifugação, ressusperidas em 1/10 do volume de sulfato de magnésio 10 mmol/L e estocadas a 4°C por no máximo 2 semanas.

Para a infecção foram misturados 10 μ L da bactéria, 3-10 μ L da suspensão de bacteriófago e o volume foi completado para 200 μ L com uma solução de $MgSO_4$ 10 mmol/L.

O sistema foi incubado a 37°C por 30 minutos e, após incubação, foram adicionados 3 mL de meio SM (5,8 g/L NaCl, 2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05 mol/L Tris-HCl pH7,5 e 0,01% de gelatina) contendo 0,7% de agarose e 3 μ L de tiamina 5 mg/mL. Esta mistura foi espalhada imediatamente sobre uma placa contendo meio LA. As placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 12 horas.

3.16 TRANSFERÊNCIA DO DNA DO FAGO λ EMBL3 PARA MEMBRANAS DE NYLON OU NITROCELULOSE

O método utilizado foi o descrito pelo fabricante da membrana (Amersham). A membrana foi colocada delicadamente sobre a superfície do ágar que contém as placas de lise e deixada por 1 minuto. Marcou-se a membrana e o ágar com uma agulha, para permitir a correta orientação nas placas. A membrana foi tratada com soluções desnaturante (1,5 mol/L NaCl e 0,5 mol/L NaOH) por 5 minutos, neutralizante (1,5 mol/L NaCl, 0,5 mol/L Tris-HCl pH 7,2 e 0,001 mol/L EDTA) por 5 minutos e com uma solução 20X SSC (3 mol/L NaCl e 0,3 mol/L de citrato de sódio) por 2 minutos. Esses tratamentos foram realizados sobre papel filtro embebido com as soluções. Após secagem ao ar, o DNA foi fixado à membrana de nitrocelulose em estufa a 85°C durante 2 horas ou à membrana de nylon por irradiação com luz ultravioleta em transiluminador durante 4 minutos.

3.17 TRANSFERÊNCIA DO DNA DO GEL DE AGAROSE PARA MEMBRANA DE NYLON OU NITROCELULOSE

Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose, visualizados, fotografados e transferidos a vácuo (VacumnGene™ XL, Pharmacia Biotech) para uma membrana de nylon ou nitrocelulose. Para a transferência, o gel foi tratado com solução desnaturante (1,5 mol/L NaCl, 0,5

mol/L NaOH) por 5 minutos, com solução neutralizante (1,5 mol/L NaCl, 0,5 mol/L Tris-Cl pH 7,2 e 0,001 mol/L EDTA) por 7 minutos e o DNA transferido a vácuo com uma solução 20X SSC (3 mol/L NaCl e 0,3 mol/L de citrato de sódio) por 30 minutos. O DNA foi fixado à membrana como descrito no item anterior.

3.18 HIBRIDIZAÇÃO

As membranas contendo DNA foram pré-hibridizadas em tampão de Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,5 contendo SDS 5% por 15 minutos a 65 °C e hibridizadas na mesma solução contendo a sonda marcada com [³²P] a 65°C, durante aproximadamente 24 horas. As membranas foram lavadas com SSC 2X a 0,1X, SDS 0,1% a 65°C, por 30 minutos e expostas contra um filme de raios-X.

Os procedimentos para marcação da sonda com [³²P] e hibridização das membranas foram realizadas por REGO, neste laboratório.

3.19 PURIFICAÇÃO DE DNA EM GEL DE AGAROSE

Para purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose, a eletroforese foi conduzida em agarose de baixo ponto de fusão em tampão TAE 1X. Após visualização, as bandas correspondentes aos fragmentos de interesse foram cortadas, separadas em tubos eppendorf e incubadas a 65°C por 5 minutos para a fusão da agarose. Após incubação, foram adicionados: Tris-HCl pH 8,0 (50 mmol/L), NaCl (200 mmol/L) e 1 volume de fenol equilibrado com Tris-HCl pH 8,0. A mistura foi agitada e centrifugada a 13.000rpm por 5 minutos. À fase aquosa acrescentou-se 0,6 volumes de isopropanol. A mistura foi incubada a -20°C por 20 minutos sendo então centrifugada a 13.000rpm por 10 minutos. O sedimento obtido foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em água.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese de oligonucleotídeos para a amplificação de parte do gene que codifica para o transportador de íons amônio em *H. seropedicae*

Devido a dificuldade experimental em se utilizar sondas heterólogas para a hibridização com a finalidade de se clonar genes, a estratégia utilizada foi a amplificação e clonagem de um pequeno fragmento do gene que codifica para o transportador de íons amônio em *H. seropedicae* e que seria utilizado como sonda homóloga. Para isso, foram sintetizados oligonucleotídeos para a amplificação deste fragmento a partir do DNA genômico de *H. seropedicae*.

Para a determinação da seqüência dos oligonucleotídeos a serem utilizados na reação de PCR, foram comparadas seqüências de aminoácidos já conhecidas de possíveis transportadores de íons amônio de três organismos (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium tuberculosis*). A comparação destas seqüências foi realizada utilizando-se o programa Clustal, que faz alinhamentos, permitindo a determinação de suas regiões comuns (figura 4). As regiões mais conservadas (regiões 1 e 3 da figura 4) foram escolhidas para a síntese dos "primers" e para isso foram convertidas para nucleotídeos, obedecendo uma tabela de preferência de uso de códons para *H. seropedicae* (SOUZA, 1990) (tabela 1). Como o código genético é degenerado, em algumas posições havia a possibilidade de se colocar mais de uma base. Durante o processo de síntese, parte das moléculas receberam uma determinada base, enquanto outros receberam outras bases. Assim sendo, foi sintetizado para cada região uma população de "primers", cujas seqüências estão apresentadas na figura 5. Na figura estão indicados, entre parênteses, os vários nucleotídeos presentes numa mesma posição.

(...continuação figura 4) Clustal. Os asteriscos indicam aminoácidos idênticos, enquanto os pontos indicam substituições de aminoácidos do mesmo grupo. Os traços nas seqüências indicam espaços criado pelo programa a fim de fornecer o melhor alinhamento entre as seqüências. Em vermelho estão indicados as regiões de alta homologia, as quais foram utilizadas para obtenção dos "primers" para reação de PCR. As setas indicam o sentido (5' → 3') dos "primers" sintetizados.

Tabela 1 - Comparação do uso de códons de *H. seropedicae*, *A. brasilense* e *E. coli* (SOUZA, 1990)

Resíduo e codon	Hs	Ab	Ec	Resíduo e codon	Hs	Ab	Ec
	% de uso				% de uso		
Phe TTT	17	3	44	Tyr TAT	29	10	41
Phe TTC	83	97	56	Tyr TAC	71	90	59
Leu TTA	2	0	6	*	0	25	88
Leu TTG	22	1	8	*	0	0	4
Leu CTT	2	2	9	His CAT	47	9	39
Leu CTC	17	26	7	His CAC	53	91	61
Leu CTA	3	0	2	Gln CAA	32	3	27
Leu CTG	55	71	69	Gln CAG	68	97	73
Ile ATT	25	3	37	Asn AAT	35	9	24
Ile ATG	69	97	62	Asn AAC	65	91	76
Ile ATA	6	0	1	Lys AAA	21	2	77
Met ATG	100	100	100	Lys AAG	79	98	23
Val GTT	4	6	38	Asp GAT	42	4	51
Val GTC	37	54	13	Asp GAC	58	96	49
Val GTA	14	0	23	Glu GAA	55	28	73
Val GTG	46	40	27	Glu GAG	45	72	27
Ser TCT	0	2	27	Cys TGT	40	0	42
Ser TCC	25	31	26	Cys TGT	60	100	58
Ser TCA	6	0	8	*	100	75	8
Ser TCG	33	47	11	Trp TGG	100	100	0
Pro CCT	6	0	9	Arg CGT	26	6	58
Pro CCC	36	16	6	Arg CGC	51	81	35
Pro CCA	9	0	20	Arg CGA	0	0	2
Pro CCG	48	84	65	Arg CGG	21	11	3
Thr ACT	13	2	24	Ser AGT	17	0	6
Thr ACC	69	76	51	Ser AGC	19	20	22
Thr ACA	3	2	6	Arg AGA	2	0	1
Thr ACG	16	20	20	Arg AGG	0	2	<1
Ala GCT	5	5	28	Gly GGT	18	15	48
Ala GCC	67	70	19	Gly GGC	66	82	41
Ala GCA	5	0	23	Gly GGA	6	0	5
Ala GCG	23	25	30	Gly GGG	10	3	7

4.2 Amplificação do fragmento via PCR utilizando os “primers” degenerados

Seria esperado que com a utilização dos “primers” indicados, um fragmento de cerca de 180 pares de base (pb) fosse amplificado. Este fragmento corresponderia aos 59 aminoácidos presentes nesta região. Após realização da reação de PCR e análise por eletroforese, um fragmento migrando com o tamanho esperado foi obtido (figura 6).

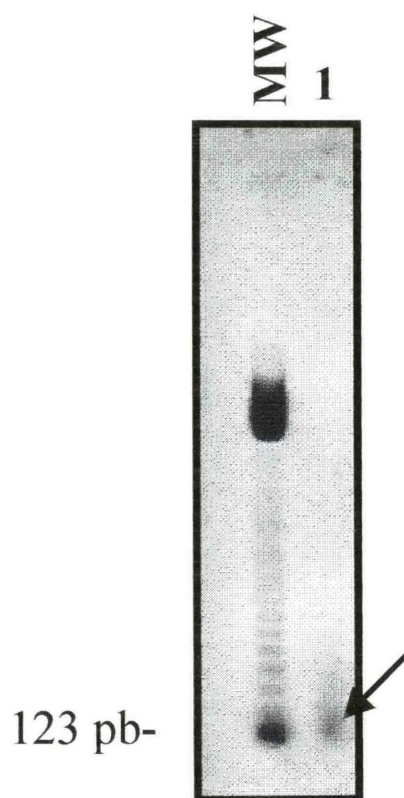


Figura 6 - Produto de amplificação por PCR obtido do DNA genômico de *H. seropedicae*.

Eletroforese em gel de agarose 1,5% em TAE 1X.

Linha 1- mostra o produto de amplificação por PCR utilizando DNA genômico de *H. seropedicae* e os “primers” degenerados.

MW indica padrão de massa molecular (123 pb ladder).

Vários parâmetros dos ciclos da reação de PCR foram testados antes de conseguirmos o produto de amplificação. A dificuldade para obtenção deste amplificado deveu-se provavelmente à degeneração dos “primers” que não se ligavam de forma específica ao molde (DNA genômico de *H. seropedicae*) em alta temperatura. Para que ocorresse o pareamento entre os oligonucleotídeos e o DNA total foi necessário a utilização de uma temperatura de anelamento bastante baixa (20° C) (item 3.5.1) o que vem a diminuir ainda mais a especificidade dos “primers”.

4.3 Construção do plasmídeo pLN1

O fragmento amplificado foi clonado no vetor pTZ19R (figura 7). Para isso, o vetor foi cortado com a enzima de restrição *Hinc* II, que produz terminal cego e manipulado a fim de adicionar o nucleotídeo timidina ao seu terminal 3'. Este procedimento foi utilizado, pois facilita a ligação com o fragmento amplificado, uma vez que a enzima Taq DNA polimerase normalmente adiciona o nucleotídeo adenosina na extremidade 3' dos produtos amplificados durante a reação de PCR.

Após a ligação do segmento de PCR ao vetor pTZ19R, a bactéria *E. coli* estirpe XL1Blue foi transformada com a mistura de ligação e selecionada através da resistência ao antibiótico ampicilina, em meio diferencial MacConkey. Como o plasmídeo pTZ19R apresenta resistência a ampicilina, cresceram neste meio apenas as bactérias que o receberam. Dentre estas, aquelas cujo plasmídeo continha o inserto foram selecionadas pela diferença de cor quando crescida em meio MacConkey. A entrada do inserto no vetor impede a produção da enzima β -galactosidase. A presença desta enzima torna o meio ácido, assim as colônias que a produzem tornam-se avermelhadas no meio MacConkey e aquelas que não produzem a enzima permanecem brancas. As colônias brancas foram crescidas em meio LB contendo ampicilina e foi feita a extração do seu plasmídeo (item 3.6).

Os plasmídeos obtidos foram analisados para a presença do inserto de 180 pb. Inicialmente as análises foram feitas através digestão com as enzimas de

restrição *EcoRI* e *HindIII*, que liberam o inserto. Como desta forma não foi possível visualizar o fragmento a ser liberado, partiu-se para análise do plasmídeo

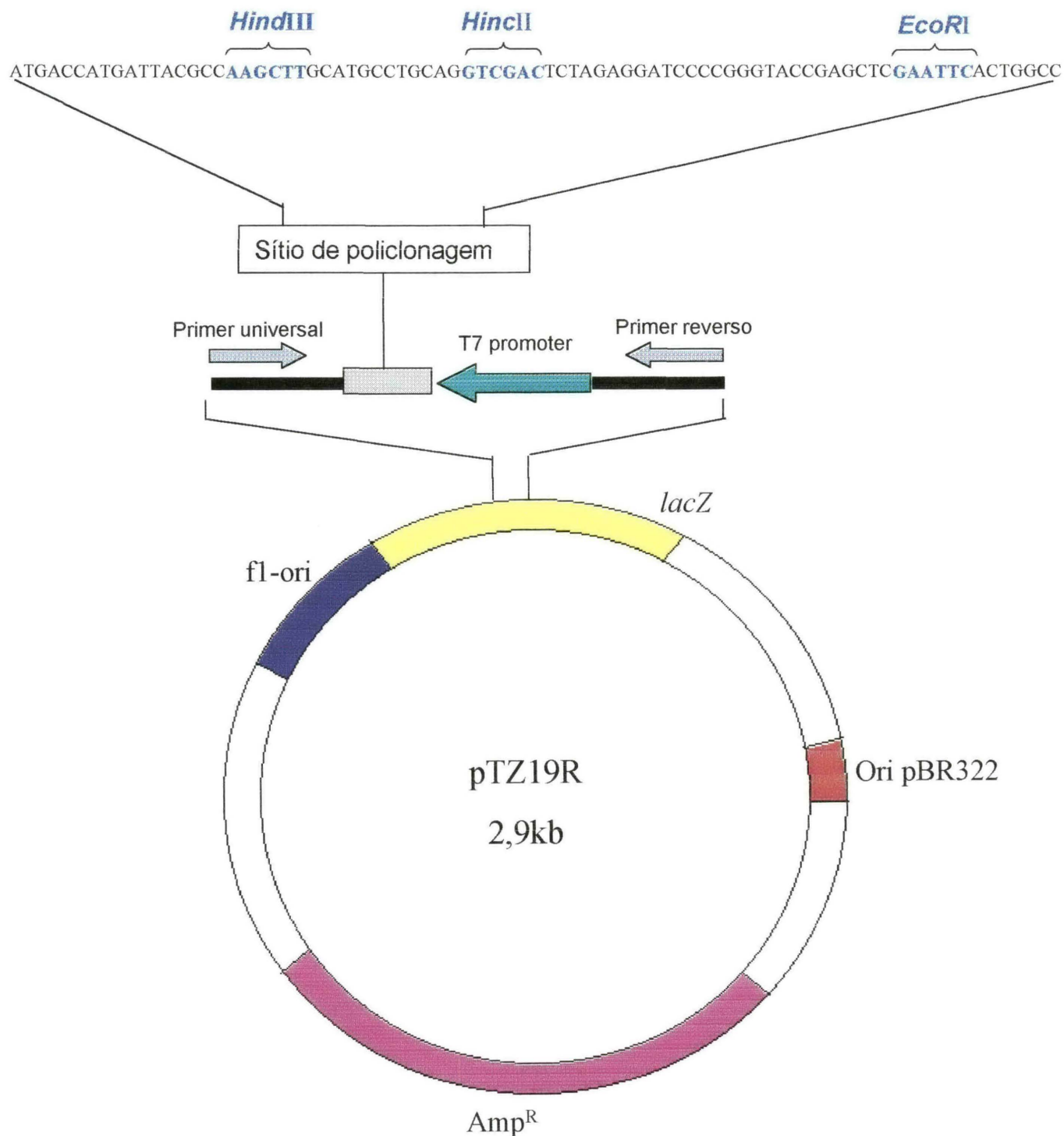


Figura 7 - Esquema do vetor pTZ19R

recombinante através de reação de PCR utilizando-se os "primers" reverso e universal, que alinham-se a 3' e 5' respectivamente do sítio de policlonagem do plasmídeo pTZ19R (figura 7). Foram utilizados como molde desta reação o vetor pTZ19R com e sem o inserto, sendo possível, assim, constatar a presença deste, pela diferença de tamanho do produto amplificado entre as duas amostras. Na figura 8 é possível observar uma diferença de taxa de migração entre os produtos de amplificação obtidos a partir do vetor e do plasmídeo recombinante. O primeiro apresenta aproximadamente 120 pb e o segundo aproximadamente 300 pb, o que comprova a presença do inserto neste último. Apenas um clone foi obtido e este foi denominado pLN1 (figura 9).

4.4 Sequenciamento do inserto do plasmídeo pLN1

A purificação do DNA para sequenciamento foi feita inicialmente através da infecção do clone com o bacteriófago M13KO7, produzindo DNA simples fita. Entretanto, devido a dificuldade de infecção da bactéria pelo bacteriófago, a quantidade de DNA produzida era insuficiente para a realização do sequenciamento (resultados não apresentados). O sequenciamento foi feito então, com DNA dupla fita.

O plasmídeo pLN1 foi sequenciado utilizando-se o "primer" universal. A seqüência obtida apresentou 176 pb (figura 10) e engloba seqüências dos "primers" utilizados para a amplificação.

Através do sequenciamento foi possível constatar que a ligação do fragmento ao vetor pTZ19R ocorreu em terminal cego muito embora tenha sido feita reação para introdução de nucleotídeos no terminal 3' do vetor (item 4.3). A figura 10 mostra a seqüência do fragmento de DNA obtido e a região em azul indica o sítio de restrição da enzima *Hinc* II, com a qual o vetor foi cortado para a posterior ligação com o fragmento.

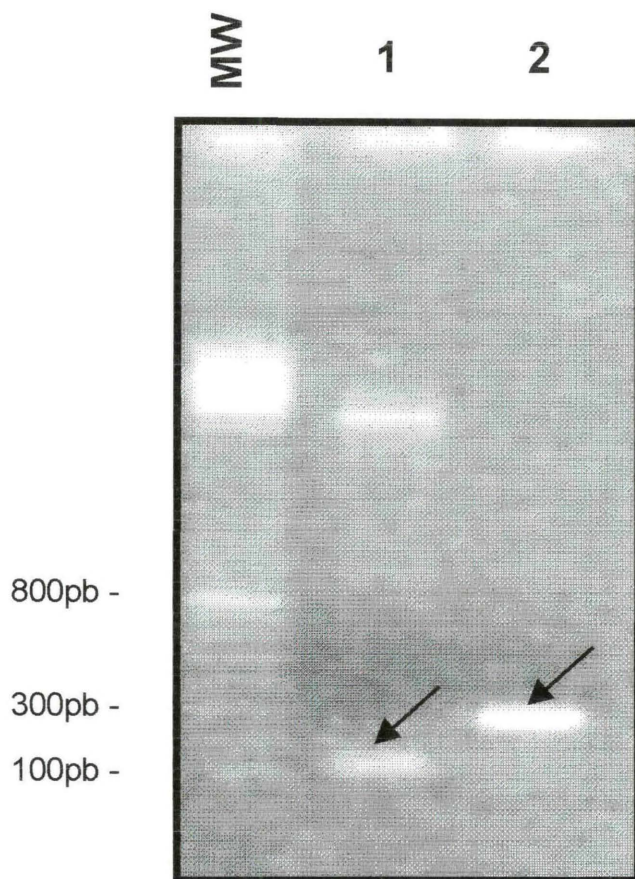


Figura 8 -Análise do plasmídeo recombinante por PCR.

O plasmídeo recombinante foi analisado por PCR utilizando os “primers” reverso e universal que se alinham nas extremidades do sítio de policlonagem do vetor pTZ19R.

MW - indica padrão de massa molecular (100 pb ladder).

1 - produto de amplificação por PCR utilizando o plasmídeo pTZ19R como molde .

2 - produto de amplificação por PCR utilizando o plasmídeo pLN1 como molde.

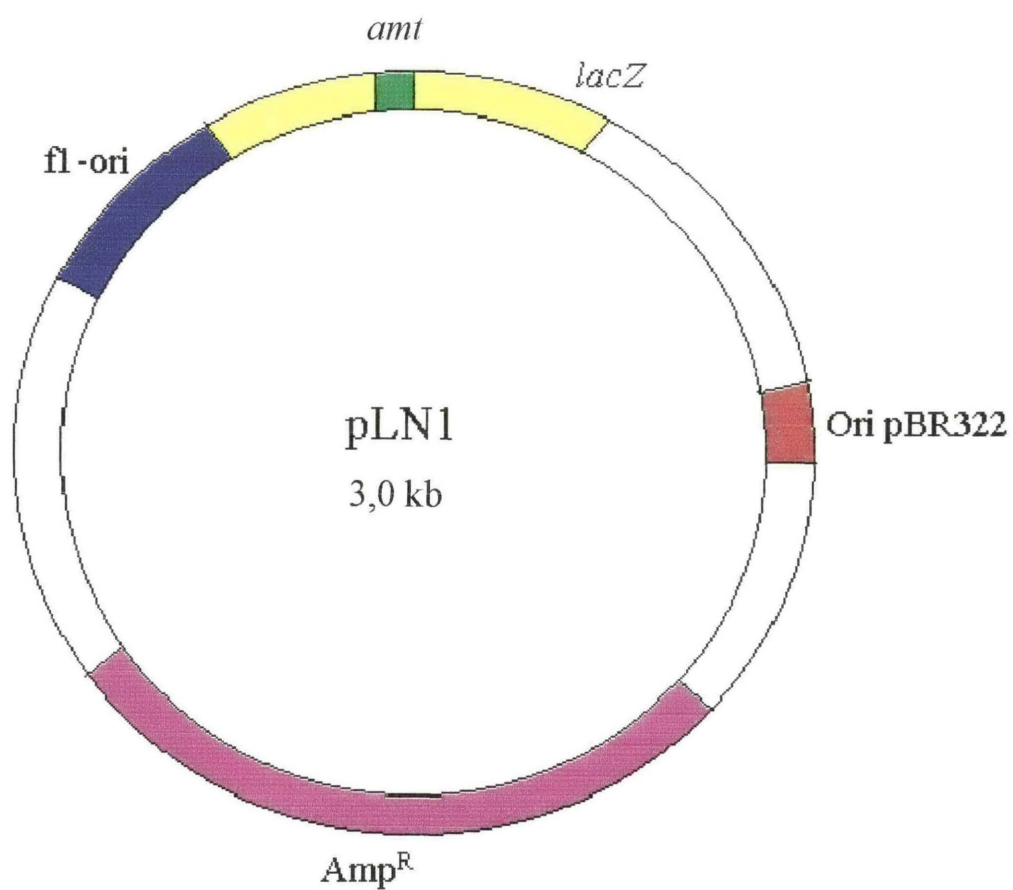


Figura 9 - Esquema do plasmídeo pLN1.

O pLN1 corresponde ao vetor pTZ19R contendo um fragmento de aproximadamente 180 pb correspondente ao gene *amt* de *H. seropedicae* inserido no gene *lacZ*.

A seqüência obtida foi submetida a comparações com o banco de dados (GenBank) utilizando-se o programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Este programa traduz a seqüência de nucleotídeos nas seis seqüências de leitura possíveis e as compara com seqüências depositadas no banco de dados. A análise desta comparação demonstrou que a seqüência submetida apresentou-se bastante similar a seqüência de transportadores de íons amônio de outros organismos, o que sugere tratar-se realmente de uma parte do gene que codifica para o transportador de íons amônio em *H. seropedicae* (tabela 2 e figura 11). Essa análise indicou alta homologia com o gene *amtB* de *E. coli* e devido a isso passamos a denominar o fragmento como parte do gene *amtB* de *H. seropedicae*.

GTCGCGATGGATTTTGGCCGGCGGCACGGTGGTGACATCAACGCCGCTATCGCCGGCCTGGTCGGTTCC
TATGTGATCGGCAAGCGTATCGGTTTCGGCAAGGAAGCCTTCAAGCCGCATAGCCTGACCCTGACCATG
GTCGGCGCCTCGCTGCTGTGGTTCAGGCTGGTCGGCTTCAAGAC

AMDFAGGTVVHINAIAIAGLVGSYVIGKRIGFGKEAFKPHSLTLTMVGASLLWFRLVGF

Figura 10- Seqüência obtida do fragmento amplificado a partir do genoma de *H. seropedicae*.

As regiões em vermelho correspondem aos “primers” utilizados na amplificação e as regiões em azul correspondem ao sítio de restrição da enzima *Hinc* II (pertencentes ao vetor). Em verde está mostrada a seqüência traduzida para aminoácidos. O primeiro aminoácido corresponde ao terceiro nucleotídeo mostrado.

4.5 CLONAGEM DO GENE *amtB* DE *H. seropedicae*

Devido a dificuldade de clonar este gene, foram utilizadas várias estratégias diferentes na tentativa de obtê-lo. Estas serão comentadas abaixo.

4.5.1 Hibridização do fragmento *amtB* de *H. seropedicae* contra banco genômico de *H. seropedicae* em fago λ EMBL3

O fragmento *amtB* de *H. seropedicae* clonado no plasmídeo pLN1 foi utilizado para tentar isolar o gene do transportador de amônio completo de *H.*

seropedicae. Para isso uma biblioteca genômica em fago λ EMBL3 foi transferido para membranas de nylon ou nitrocelulose visando a sua hibridização com o plasmídeo pLN1 marcado radioativamente.

Tabela 2 - Comparação da seqüência obtida do fragmento amplificado do genoma total de *H. seropedicae* com seqüências depositadas no banco de dados (GenBank).

Espécie	Gene	Função	identidade (%)	similaridade(%)
<i>Escherichia coli</i>	<i>amtB</i>	provável transportador de amônio	68	84
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>amt</i>	provável transportador de amônio	55	72
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>ngrA</i>	provável transportador de amônio	50	67
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>mep3</i>	transportador de amônio	40	67
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>mep1</i>	transportador de amônio	40	67
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>amt1</i>	Alta afinidade com transportadores de amônio	49	66

A análise foi feita a partir da seqüência de aminoácidos e são indicadas aquelas com maior homologia com a seqüência submetida.

GENE AMTB DE *E. coli* PROVÁVEL TRANSPORTADOR DE AMÔNIO

Query: 1 AMDFAGGTVVHINAAIAGLVGSYVIGKRIGFGKEAFKPHSLTLTMVGASLLWFRLVGF 58
 A+DFAGGTVVHINAAIAGLVG+Y+IGKR+GFGKEAFKPH+L + G ++L+ GF
 Sbjct: 180 ALDFAGGTVVHINAAIAGLVGAYLIGKRVGFGKEAFKPHNLPVFTGTAILYIGWFGF 237

GENE AMT DE *M. tuberculosis* PROVÁVEL TRANSPORTADOR DE AMÔNIO

Query: 1 AMDFAGGTVVHINAAIAGLVGSYVIGKRIGFGKEAFKPHSLTLTMVGASLLWFRLVGF 58
 A+DFAGGTVVHINA +A L+ + V+GKR G+ F+PH+L M+GA+LLWF GF
 Sbjct: 189 AIDFAGGTVVHINAGVAALMLAIVLGKRRGWPATLFRPHNLPFVMLGAALLWFGWYGF 246

GENE NRG A DE *B. subtilis* PROVÁVEL TRANSPORTADOR DE AMÔNIO

Query: 1 AMDFAGGTVVHINAAIAGLVGSYVIGKRIGFGKEAFKPHSLTLTMVGASLLWFRLVGF 58
 A+DFAGGTVVHI++ +AGLV + V+GKR A PH+L T +G +L+WF GF
 Sbjct: 155 ALDFAGGNVVHISSGVAGLVLAIVLGKR--KDGTASSPHNLIYTFLLGGALIWFGWFGF 210

Figura 11 - Comparação da seqüência parcial do gene *amtB* de *H. seropedicae* com seqüências dos microrganismos utilizados para a síntese dos "primers" com os quais o fragmento sequenciado foi obtido.

"Query" indica a seqüência de aminoácidos obtida a partir do fragmento amplificado. "Sbjct" indica a seqüência depositada no banco de dados. Entre a seqüência "query" e "sbjct" são indicados os aminoácidos idênticos ou de mesmo grupo (+).

Embora algumas condições tenham sido testadas, nenhum sinal de hibridização foi obtido. Esse resultado negativo pode ter sido devido ao tamanho do fragmento utilizado (176 pb) o que tornaria difícil a detecção da placa de lise contendo o gene *amtB*.

4.5.2 Hibridização do fragmento do gene *amtB* de *H. seropedicae* com o cosmídeo pEMB100

O gene *amtB* de vários organismos, como o de *E. coli* (van HEESWIJK *et al.*, 1996), *A. vinelandii* (MELETZUS *et al.*, 1998) e *A. caulinodans* (MICHEL-REYDELLET *et al.*, 1998), está situado a jusante do gene *glnK* (gene homólogo ao *glnB*). A fim de verificar a possibilidade do gene *amtB* estar localizado próximo ao gene *glnB*, um cosmídeo isolado contendo esta região do genoma de *H. seropedicae* foi analisado. O cosmídeo pEMB100 (BENEILLI *et al.*, 1997) contém a região do genoma de *H. seropedicae* capaz de complementar mutação *glnB512* de *K. pneumoniae*. Análise posterior indicou que pEMB100 possui um gene semelhante a *glnB* (BENEILLI *et al.*, 1997).

Para determinar se o transportador de amônio de *H. seropedicae* estava localizado neste cosmídeo, o fragmento do gene *amtB* de *H. seropedicae* clonado no pLN1 foi marcado com [³²P] e utilizado como sonda para hibridização contra pEMB100 digerido com as enzimas de restrição *Sal* I, *Eco* RI e *Pst* I. Nenhum sinal de hibridização foi identificado (resultados não apresentados), sugerindo que o gene *amtB* de *H. seropedicae* não está localizado neste plasmídeo. Talvez, diferentemente dos demais organismos citados, em *H. seropedicae* os genes *glnK* e *amtB* não estejam situados próximos um do outro. Entretanto, não é possível descartar a hipótese de que não houve hibridização devido ao pequeno tamanho do fragmento *amtB*.

4.5.3 Resgate do gene *amtB* de uma biblioteca genômica de *H. seropedicae* em cosmídeo pLAFR3 por PCR

A partir da seqüência parcial do gene *amtB* de *H. seropedicae* foi possível a construção de dois “primers” específicos (TNH41 e TNH42) para amplificar o restante do gene. Estes “primers” estão em orientação oposta: TNH41 está orientado em direção a extremidade 5’ do gene *amtB*, enquanto TNH42 está orientado na direção 3’ (Figura 12).



Figura 12 – Seqüência dos “primers” específicos sintetizados a partir da seqüência do fragmento do gene *amtB* clonado.

Em vermelho estão indicadas as seqüências dos “primers” TNH41 e TNH42 e sua localização dentro do fragmento do gene *amtB* de *H. seropedicae*. As setas indicam o sentido da síntese dos “primers”.

Estes oligonucleotídeos foram utilizados numa reação de PCR que apresentava como molde uma população de cosmídeos purificados de uma biblioteca genômica de *H. seropedicae* no vetor pLAFR3 (STEFFENS, 1994). Como cada um dos “primers” construídos partia da região central do gene para a extremidade, eles foram utilizados em conjunto com os “primers” reverso e universal, que se alinham nas extremidades do sítio de policlonagem do cosmídeo (figura 13).

Os insertos dos cosmídeos apresentam um tamanho médio de 25 kilo bases (kb). Assim, a amplificação de fragmentos do gene *amtB* seria facilitada se este estiver clonado nas proximidades do sítio de hibridização dos “primers” reverso ou universal, pois se ele estiver localizado numa região mediana, a

distância entre os dois “primers” que participarão da reação de PCR será muito grande, dificultando a amplificação.

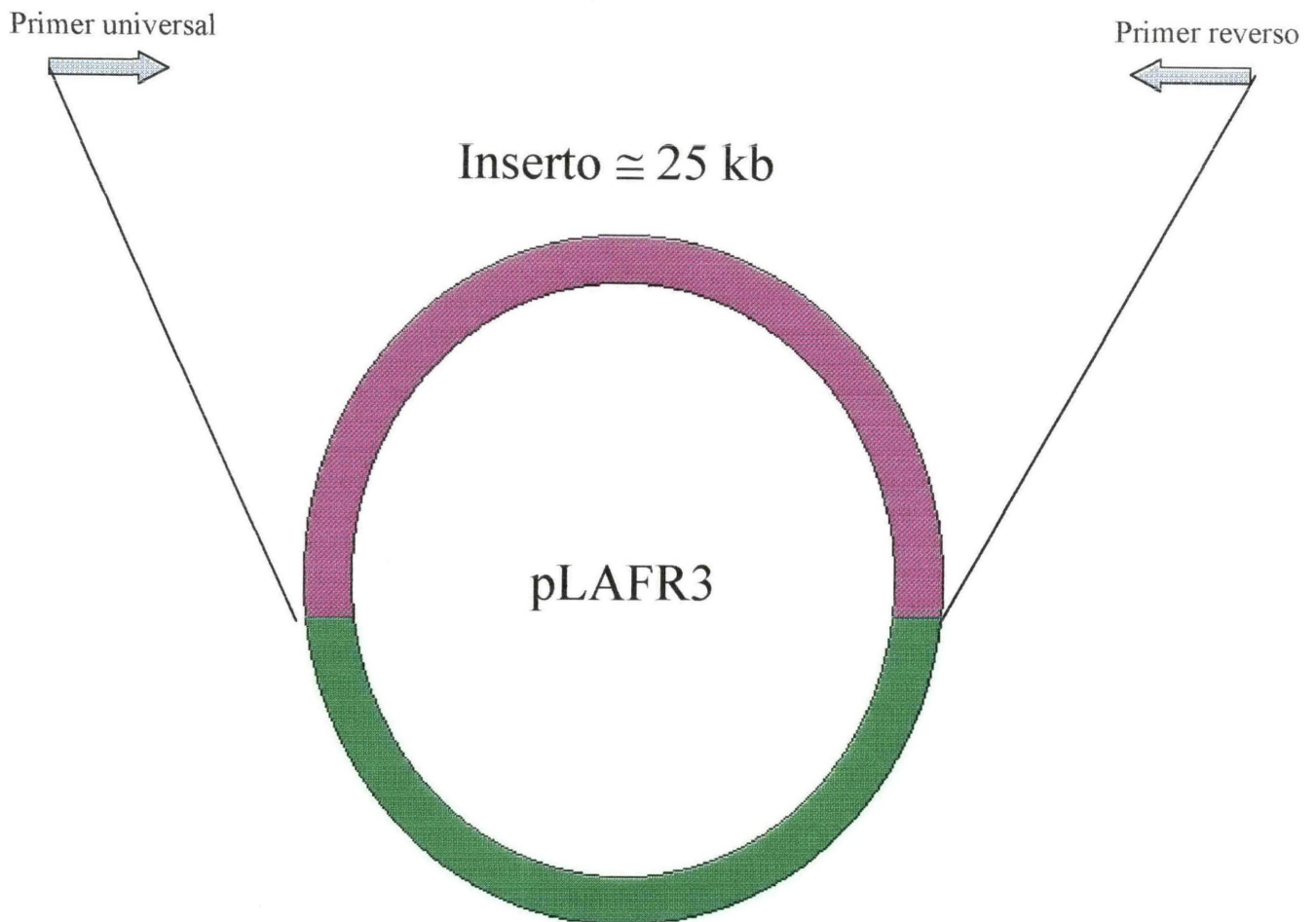


Figura 13 - Esquema do cosmídeo pLAFR3.

As flechas indicam onde se alinham os “primers” reverso e universal. O segmento em roxo refere-se ao inserto. Os “primers” específicos para o gene *amtB* alinham-se nesta região em posições aleatórias, conforme o posicionamento do gene.

Como a orientação do gene dentro do inserto não é conhecida, foi necessário fazer quatro diferentes reações: com o “primer” universal e TNH41; universal e TNH42; reverso e TNH41; e reverso e TNH42. Diversas bandas de DNA amplificado foram obtidas em cada reação (figura 14).

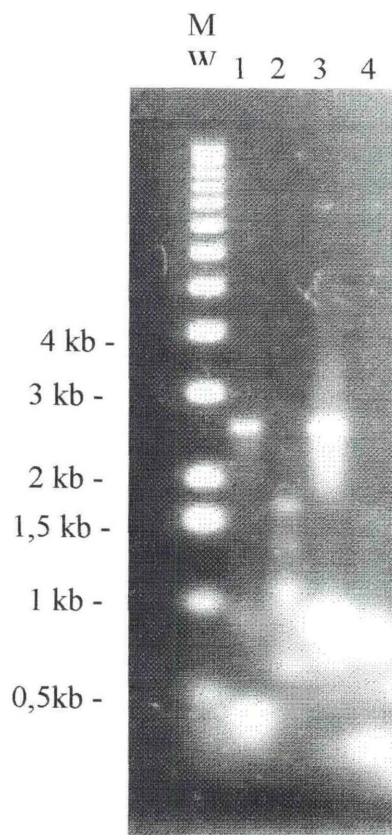


Figura 14– Produtos de amplificação obtidos a partir da biblioteca genômica de *H. seropedicae* em cosmídeo pLAFR3, utilizando os “primers” TNH41 e TNH42.

Eletrofores em gel de agarose 1,0% TAE 1X.

MW indica padrão de massa molecular (1 kB ladder).

A amostra 1 representa os produtos amplificados com os “primers” universal e TNH41.

A amostra 2 representa os produtos amplificados com os “primers” reverso e TNH42.

A amostra 3 representa os produtos amplificados com os “primers” reverso e TNH41.

A amostra 4 representa os produtos amplificados com os “primers” universal e TNH42.

Para confirmar se tratava-se realmente de fragmentos do gene *amtB* os produtos de PCR foram separados em gel de agarose, transferidos para uma membrana de nylon e hibridizados contra o plasmídeo pLN1 (contém parte do gene *amtB* de *H. seropedicae*) marcado com [³²P]. Todos os amplificados hibridizaram com a sonda, sugerindo que os produtos do PCR faziam parte do gene de interesse (resultados não apresentados). Estes amplificados foram submetidos à ligação em terminal cego com o vetor pTZ19R. A ligação foi transformada em *E. coli* estirpes XL1Blue e 7118 e obteve-se quatro clones, sendo um de cada reação. A seleção dos clones (item 3.13) foi feita através da resistência a ampicilina conferida pelo vetor e através da coloração das colônias em meio MacConkey.

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos e sequenciados. O sequenciamento dos fragmentos amplificados com o "primer" reverso foi realizado com o universal e vice-versa, evitando assim, a existência de duas regiões de hibridização destes oligonucleotídeos situadas no mesmo plasmídeo, uma vez que o vetor pTZ19R já apresenta as seqüências complementares a ambos os "primers". As seqüências obtidas foram comparadas com o banco de dados. A análise desta comparação mostrou que os fragmentos apresentavam alta homologia com genoma de *E. coli* (resultados não apresentados). Isto deve-se provavelmente a uma contaminação com o DNA desta bactéria no momento da extração dos cosmídeos, uma vez que a biblioteca genômica de *H. seropedicae* em cosmídeo pLAFR3 está mantida em *E. coli*.

A hibridização pode ter ocorrido nos sítios de ligação dos "primers", já que tanto os fragmentos amplificados, como o pLN1 possuem estas seqüências (os sítios dos "primers" reverso e universal, com os quais os fragmentos foram amplificados estão presentes no vetor pTZ19R, do qual descende o pLN1 e, além disso, os "primers" específicos utilizados foram obtidos a partir do fragmento *amtB* clonado no pLN1).

Muito embora não tenha sido possível neste trabalho a clonagem e o sequenciamento completo do gene *amtB* de *H. seropedicae*, nossos resultados mostram que este gene está presente no genoma deste organismo corroborando

resultados bioquímicos e fisiológicos obtidos anteriormente no laboratório (KLASSEN *et al.*, 1997). Análise da seqüência do fragmento obtido indicam que esse gene para transporte de amônio possui alta homologia com o gene *amtB* de *E. coli*, pelo menos na sua região central.

Além disso, nossos resultados comprovam a validade da estratégia utilizada para a clonagem de genes de interesse a partir da seqüência de genes homólogos.

5. CONCLUSÕES

- Um fragmento de DNA de *H. seropedicae* foi amplificado por PCR, utilizando “primers” construídos para amplificar transportadores de amônio;
- A seqüência do fragmento de DNA amplificado mostrou similaridade com outros transportadores de amônio, indicando a presença de um transportador de amônio em *H. seropedicae* similar aqueles descritos para *E. coli*, *B. subtilis* e *M. tuberculosis*;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLEER, 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.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. Intl. J. Sys. Bact., Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F.; DOBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. Symbiosis, Rehavot, v. 13, p. 65-73, 1992.

BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. Selection of *Herbaspirillum seropedicae* spp. strains associated with rice seedlings amended with ¹⁵N-labelled fertilise. In: International symposium on sustainable agriculture for the tropics – the role of biological nitrogen fixation (1995: Angra dos Reis). **Resumos...** Angra dos Reis: EMBRAPA, p.202-203, 1995.

BENELLI, E. M., SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Evidence for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. J. Bacteriol, v. 179, p. 4623-4626, 1997.

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

- BREWIN, B.; WOODLEY, P.; DRUMMOND, M. The basis of ammonium release in *nifL* mutants of *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol, v. 181, p. 7356-7362, 1999.
- BROWN, M. S.; SEGAL, A.; STADTMAN, E. R. Modulation of glutamine synthetase adenylylation and deadenylylation is mediated by metabolic transformation of the P_{II} -regulatory protein. Proc Natl Acad Sci USA, v. 68, p. 2949-2953, 1971.
- BUENO, R.; PAHEL, G.; MAGASANIK, B. Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., v.164, p. 816-822, 1985
- de MEL, V. S. J.; KAMBEROV, E. S.; MARTIN, P. D.; ZHANG, J.; NINFA, A. J.; EDWARDS, B. F. P. Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of the P_{II} protein from *E. coli*. J. Mol. Biol., v. 243, p. 796-798, 1994.
- DRUMMOND, M.; CLEMENTS, J.; MERRICK, M.; DIXON, R. Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. Nature, v. 301, p. 302-307, 1983.
- EADY, R. R. Enzymology of free-living diazotrophs. In: BROUGHTON, W.J. ; PÜHLER, A., ed. Nitrogen fixation. Oxford, Clarendon Press, v. 4, p. 1-49, 1986.
- FISCHER, H. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. Microbiol. Rev., v. 58, p. 352-386, 1994.
- FU, H.; BURRIS, R. H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. J Bacteriol, v. 171, p. 3168-3175, 1989.

- HAWKES, T.; MERRICK, M.; DIXON, R. Interaction of purified NtrC protein with nitrogen regulated promoters from *Klebsiella pneumoniae*. Mol. Gen. Genet., v. 201, p. 492-498, 1985.
- KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. The *Escherichia coli* P_{II} signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. J Biol Chem, Baltimore, v. 270, p. 17797-17807, 1995.
- KEENER, J.; KUSTU, S. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NtrB and NtrC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NtrC. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 85, p. 4976-4980, 1988.
- KLASSEN, G.; Contribuição à fisiologia da fixação de nitrogênio em estirpes de *Herbaspirillum seropedicae*. Tese de Mestrado. Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 114p., 1994.
- KLASSEN, PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. Can. J. Microbiol, v. 43, p. 887-891, 1997
- KLEINER, D. Bacterial ammonium transport. FEMS Microbiol. Rev., v. 32, p. 87-100, 1985.
- KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In Brown, T. A., Essential Molecular Biology : A Pratical Approach, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, p.185-208, 1991.
- 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. Res., v. 29, p. 1599-1602, 1995.

MAGASANIK, B. Regulation of transcription of the *glnALG* operon of *Escherichia coli* by protein phosphorylation. Biochimie, v. 71, p. 1005-1012, 1989.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 545p, 1982.

MARTIN, D.; REINHOLD-HUREK, B. Molecular analysis of three P_{II}-like signal transmitter proteins in the diazotroph *Azoarcus* sp. BH72. In: 12th International congress on nitrogen fixation (1999: Foz de Iguacu). **Resumos...** 12th International congress on nitrogen fixation – book of abstracts, p.102, 1999.

MEAD, D. A.; SZCZESNA-SKORUPA, E; KEMPER, B. Single-strand DNA “blue” T7 promoter plasmids: a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. Protein Engineering, Eynsham, v. 1, p. 67-74, 1986.

MELETZUZ, D.; RUDNICK, P.; DOETSCH, N.; GREEN, A.; KENNEDY, C. Characterization of the *glnK-Amt* operon of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. v.180, p. 3260-3264, 1998.

MERRICK, M.; HILL, S.; HENNECKE, H.; HAHN, M.; DIXON, R.; KENNEDY, C. Repressor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. Mol.Gen.Genet., Berlin, v.185, p.75-81, 1982.

MERRICK, M. J. Nitrogen control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of the *ntrA* gene and analogies between *ntrC* and *nifA*. EMBO J., v. 2, p. 39-44, 1983.

MERRICK, M. J. & EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. Microbiol. Reviews, v. 59, p. 604-622, 1995.

- MESSING, M. J.; GRONENBORN, B.; MULLER-HILL, B.; HOFSCHEIDER, P. H. Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a *HindIII* fragment of the *lac* regulatory region in M13 replicative form "in vitro". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Washington, v. 74, p. 3642-3646, 1977.
- MICHEL-REYDELLET, N.; DESNOUES, N.; de ZAMAROCZY, M.; ELMERICH, C.; KAMINSKI, P.A. Characterization of the *glnK-Amt* operon and involvement of *Amt* in methylammonium in *Azorhizobium caulinodans*. Mol Gen Genet. v. 258, p. 671-677, 1998.
- MICHEL-REYDELLET, N.; KAMINSKI, A. *Azorhizobium caulinodans* P_{II} and GlnK proteins control nitrogen fixation and ammonia assimilation. J. Bacteriol., v. 181, p. 2655-2658, 1999.
- PEDROSA, F.; YATES, G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr (gln)* type gene products. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc. Lett., Amsterdam), v. 23, p. 95-101, 1984
- POSTGATE, J. R. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge: Cambridge University Press, 252p., 1982
- REITZER, L. J.; MAGASANIK, B. Expression of *glnA* in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. Proc Natl Acad Sci USA, Washington, v. 82, p. 1979-1983, 1985.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SOUPENE, E.; HE, L.; YAN, D.; KUSTU, S. Ammonia acquisition in enteric bacteria: Physiological role of the ammonium/methylammonium transport B (*AmtB*) protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA v.95, p. 7030-7034, 1998.

SOUZA, E. M. Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*. Tese Doutorado. Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 264 p., 1990.

SOUZA, E. M.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. Deletions analysis of the promoter region of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae*. In: Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. TIKHONOVICH, I. A.; NIKOLAI, A. P.; VASSILY, I. R.; WILLIAM, E. N. eds. X International Congress in Nitrogen Fixation. St. Petersburg, p.260, 1995.

STEFFENS, M. B. R. Clonagem, Isolamento e Caracterização do gene *recA* de *Herbaspirillum seropedicae* Estirpe Z78. Tese de doutorado – Departamento de Bioquímica – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 221p., 1994.

TATÉ, R.; RICCIO, A.; MERRICK, M.; PATRIARCA, E. J. The *Rhizobium etli amtB* gene coding for an NH_4^+ transporter is down-regulated early during bacterioid differentiation. Mol. Plant-Microbe Interact, v. 11, p. 188-198, 1998.

TATÉ, R.; CERMOLA, M.; RICCIO, A.; IACCARINO, M.; MERRICK, M.; FAVRE, R.; PATRIARCA, E. J. Ectopic expression of the *Rhizobium etli amtB* gene affects the symbiosome differentiation process and nodule development. Mol. Plant-Microbe Interact, v. 12, p. 515-525, 1999.

van DOMELLEN, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J.; de ZAMAROCZY, M. (Methyl) ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol, v. 180, p. 2652-2659, 1998.

van HEESWIJK, W.; HOVING, S.; MOLENAR, D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. An alternative P_{II} protein the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol, v. 21, p. 133-146, 1996.

- YAKUNIN, F.; HALLENBECK, P. C. *amtB* is necessary for NH_4^+ induced nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation in *Rhobobacter capsulatus*. In: 12th International congress on nitrogen fixation (1999: Foz de Iguacu). **Resumos...** 12th International congress on nitrogen fixation – book of abstracts, p.100, 1999.
- YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: G.Stacey, R. H. Burris and H. J. Evans (eds). Biological Nitrogen Fixation. London: Chapman & Hall, New York, p. 43-86, 1992.