

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THIAGO MOIA APOLONIO



**CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense*
CONTENDO PROTEÍNA NifA DELETADA NO DOMÍNIO GAF**

CURITIBA

2018

THIAGO MOIA APOLONIO

**CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Azospirillum brasilense*
CONTENDO PROTEÍNA NifA DELETADA NO DOMÍNIO GAF**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica pelo Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

**Orientador: Fábio de Oliveira Pedrosa
Co-orientador: Emanuel Maltempi de Souza**

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Apolonio, Thiago Moia

Caracterização de estirpes de *Azospirillum brasilense* contendo proteína NifA deletada no domínio GAF. / Thiago Moia Apolonio. – Curitiba, 2018.

88 p.: il. ; 30cm.

Orientador: Fábio de Oliveira Pedrosa

Co-orientador: Emanuel Maltempi de Souza

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. *Azospirillum brasilense* 2. Nitrogênio - Fixação I. Título II. Pedrosa, Fábio de Oliveira III. Souza, Emanuel Maltempi de IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 589.9



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **THIAGO MOIA APOLONIO** intitulada: **Caracterização de estirpes de *Azospirillum brasilense* contendo proteína NifA deletada no domínio GAF**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Março de 2018.

FABIO DE OLIVEIRA PEDROSA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARCELO MÜLLER DOS SANTOS

Avaliador Interno (UFPR)

MARCO AURELIO SCHÜLER DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (UEM)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido saúde e perseverança para a realização deste trabalho.

Aos meus pais e ao meu irmão pelo apoio, incentivo e compreensão da importância deste trabalho em minha vida.

Aos professores Fábio de Oliveira Pedrosa e Emanuel Maltempi de Souza pela orientação, discussões, e por terem contribuído de forma imensa para a minha formação científica.

Aos meus amigos e colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, especialmente do Núcleo de Fixação de Nitrogênio, pelo companheirismo e também pelos bons momentos de descontração.

Aos técnicos Roseli Prado, Valter Baura, Lucinéia Martins e Bruna pelo suporte essencial para a realização dos experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica e aos demais professores do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Ao CNPq e ao INCT da Fixação Biológica de Nitrogênio pelo apoio financeiro.

RESUMO

Azospirillum brasilense é uma bactéria fixadora de nitrogênio que se associa com diversas plantas de interesse agrícola, como milho e trigo, apresentando potencial de aplicação como biofertilizante. O processo denominado fixação biológica de nitrogênio, catalisado pelo complexo da nitrogenase, requer uma grande quantidade de energia pela hidrólise de 16 moléculas de ATP para cada molécula de N₂ reduzida e sua regulação a nível transcricional é centrada na atividade da proteína NifA, o ativador específico da transcrição dos genes *nif*. Esta proteína apresenta no seu domínio N-terminal (GAF) um papel regulatório, o qual previne a atividade de NifA na presença de amônio. Além disso, a regulação a nível pós-traducional da nitrogenase envolve a ADP-ribosilação e inativação reversível da proteína NifH sob altos níveis de amônio, reação catalisada pela enzima dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DraT). Neste trabalho foram construídas duas estirpes mutantes de *A. brasilense*, TAFP e TAHM, ambas contendo deleção cromossomal da região 5' do gene *nifA* correspondente ao domínio N-terminal de NifA. Quatro duplo-mutantes de ambas as estirpes foram selecionados baseado na capacidade de crescer na presença de sacarose. Ensaio de atividade da nitrogenase mostraram que a deleção cromossomal do domínio N-terminal de NifA resultou em uma proteína incapaz de ativar a transcrição dos genes *nif*, mesmo em baixos níveis de amônio, fenótipo confirmado pela ausência de expressão da fusão transcricional *nifB::lacZ*. Estes resultados sugerem que a região deletada do gene *nifA* parece ser importante para a estabilidade ou conformação ativa da proteína. As estirpes mutantes foram complementadas para atividade da nitrogenase com plasmídeos expressando a proteína nativa ou uma outra versão N-truncada de NifA. Transconjugantes de ambos os plasmídeos foram capazes de restaurar o fenótipo de fixação de nitrogênio e, além disso, aqueles possuindo a proteína N-truncada sendo expressa apresentaram atividade mesmo na presença de íons amônios. Os ensaios de complementação mostraram que outros pontos de truncamento resultam em uma NifA ativa mesmo na presença de amônio e são potenciais alvos para deleção cromossomal.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, *Azospirillum brasilense*, proteína NifA.

ABSTRACT

Azospirillum brasilense is a nitrogen-fixing bacterium which is associated with several plants of agricultural interest, such as corn and wheat, presenting potential application as biofertilizer. Biological nitrogen fixation, catalyzed by the nitrogenase complex, requires a large amount of energy by the hydrolysis of 16 ATP molecules for each reduced N₂ molecule and its transcriptional regulation level in *A. brasilense* is centered on the activity of NifA, the specific activator of *nif* genes transcription. This protein presents in its N-terminal domain (GAF) a regulatory role, which prevents NifA activity in the presence of ammonium. Furthermore, post-translational regulation level of nitrogenase activity involves ADP-ribosylation and reversible inactivation of NifH protein under high ammonium conditions, a reaction catalyzed by the dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase enzyme (DraT). In this work two mutant strains of *A. brasilense*, TAFP and TAHM, were constructed, both containing chromosomal deletion of the 5' region of the *nifA* gene corresponding to the N-terminal domain of NifA. Four double-mutants of both strains were selected based on their ability to grow in the presence of sucrose. Nitrogenase activity assays revealed that chromosomal deletion of NifA N-terminal domain resulted in a protein unable to activate the transcription of *nif* genes even at low ammonium levels, which was confirmed by the absence of *nifB::lacZ* transcriptional fusion expression. These results suggest that the deleted region of the *nifA* gene seems to be important for protein stability or active conformation. The mutant strains were complemented for nitrogenase activity with plasmids expressing the native or another N-truncated version of the NifA protein. Transconjugants from both plasmids were able to restore the nitrogen fixation phenotype and, in addition, those containing the N-truncated protein being expressed showed activity even in the presence of ammonium ions. Mutant complementation assays have shown that other truncation sites result in active NifA even in the presence of ammonium and are potential targets for chromosomal deletion.

Keywords: Biological Nitrogen Fixation, *Azospirillum brasilense*, NifA Protein.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Micrografia eletrônica de transmissão de <i>Azospirillum brasilense</i>	16
FIGURA 2 - Modelo estrutural das proteínas Fe e MoFe do complexo nitrogenase de <i>Azotobacter vinelandii</i>	19
FIGURA 3 - Modelo esquemático de ativação transcricional mediada pela ligação de uma EBP	23
FIGURA 4 - Modelo estrutural esquemático dos domínios funcionais da proteína NifA de <i>A. brasilense</i>	24
FIGURA 5 - Modelo de regulação da atividade da proteína NifA em resposta a amônio e na presença da proteína PII GlnB	27
FIGURA 6 - Modelo de regulação da atividade da proteína NifH pelas enzimas DraT e DraG em resposta aos níveis de amônio em <i>A. brasilense</i>	29
FIGURA 7 - Modelo estrutural esquemático da porção deletada da proteína NifA de <i>A. brasilense</i>	46
FIGURA 8 - Esquema geral da região do gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> utilizada para construção dos plasmídeos pTMA1 e pTMA2	47
FIGURA 9 - Esquema geral da região do gene <i>draT</i> de <i>A. brasilense</i> utilizada para construção dos plasmídeos pTMA3 e pTMA4	48
FIGURA 10 - Esquema geral de obtenção e clonagem do fragmento <i>nifA</i> UP-DOWN para construção do plasmídeo pTMA5	50
FIGURA 11 - Esquema geral de obtenção e clonagem do fragmento <i>draT</i> UP-DOWN para construção do plasmídeo pTMA6	51
FIGURA 12 - Confirmação da construção dos plasmídeos pTMA5 e pTMA6	52
FIGURA 13 - Esquema geral de construção do plasmídeo pTMA9.....	54
FIGURA 14 - Confirmação da construção dos plasmídeos pTMA9 e pTMA10	55
FIGURA 15 - Esquema geral de construção do plasmídeo pTMA12.....	57
FIGURA 16 - Esquema geral de construção do plasmídeo pTMA13	58
FIGURA 17 - Esquema da estratégia empregada para confirmação de mutantes simples	59

FIGURA 18 - Confirmação de mutantes simples da região 5' do gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i>	60
FIGURA 19 - Esquema da estratégia empregada para confirmação de duplo mutantes	61
FIGURA 20 - Confirmação de mutantes duplos contendo o gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> truncado na região 5'	62
FIGURA 21 - Determinação de atividade da nitrogenase da estirpe mutante TAFP contendo deleção da região 5' do gene <i>nifA</i>	65
FIGURA 22 - Determinação de atividade da nitrogenase da estirpe mutante TAHM contendo deleção da região 5' do gene <i>nifA</i>	66
FIGURA 23 - Ensaio de ativação transcricional <i>in vivo</i> da fusão <i>nifB::lacZ</i> pela proteína NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i>	67
FIGURA 24 - Determinação de atividade da nitrogenase da estirpe mutante TAFP (FP2 Δ N- <i>nifA</i>) complementada com os plasmídeos pTMA12 e pTMA13	70
FIGURA 25 - Determinação de atividade da nitrogenase da estirpe mutante TAHM (HM053 Δ N- <i>nifA</i>) complementada com os plasmídeos pTMA12 e pTMA13	71
FIGURA 26 - Determinação de atividade da nitrogenase da estirpe FP10 complementada com os plasmídeos pTMA12 e pTMA13	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Estirpes de bactérias utilizadas neste estudo	31
TABELA 2 - Plasmídeos utilizados neste estudo.....	32
TABELA 3 - Composição do meio NFbHP	34
TABELA 4 - Composição do meio LB	35
TABELA 5 - Composição do meio TB	35
TABELA 6 - Composição do meio SOC	36
TABELA 7 - Concentrações de antibióticos utilizadas nos cultivos	36
TABELA 8 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações da PCR.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AAA⁺ – ATPases associadas a várias atividades celulares

ADP – Adenosina difosfato

Amp^R – Resistência a ampicilina

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina sérica bovina

Cm^R – Resistência a cloranfenicol

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP's – Desoxinucleotídeos trifosfatos

D.O. – Densidade óptica

DraG – Dinitrogenase redutase glicohidrolase

DraT – Dinitrogenase redutase ADP-ribosil transferase

EBP – Proteínas ativadoras de transcrição (*enhancer-binding proteins*)

FBN – Fixação biológica do nitrogênio

GDH – Glutamato desidrogenase

GOGAT – Glutamato sintase

GS – Glutamina sintetase

IHF – Fator de interação do hospedeiro (*Integration Host Factor*)

kDa – Quilo Daltons

Km^R – Resistência a canamicina

MCS – Sítio de policlonagem

NAD⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADP⁺ – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

Nal^R – Resistência a ácido nalidíxico

ONPG – Orto-nitrofenil-β-galactosídeo

Pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

Rpm – Rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

Sm^R – Resistência a estreptomicina

Tc^R – Resistência a tetraciclina

UAS – Sequência ativadora à montante (*upstream activation sequence*)

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Gênero <i>Azospirillum</i>	15
1.2 Fixação biológica do nitrogênio	17
1.3 Complexo da nitrogenase	18
1.4 Genes <i>nif</i>	20
1.5 Assimilação de amônio	20
1.6 Regulação transcricional da nitrogenase	21
1.6.1 Proteína NifA	21
1.6.2 Estrutura e função dos domínios da proteína NifA	23
1.6.3 Regulação da atividade da proteína NifA	25
1.7 Regulação pós-traducional da nitrogenase	27
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Bactérias e plasmídeos	31
3.2 Meios de cultura, condições de cultivo e estoque de bactérias	34
3.2.1 Meios empregados para cultivo de <i>A. brasilense</i>	34
3.2.2 Meios empregados para cultivo de <i>E. coli</i>	35
3.3 Antibióticos	36
3.4 Técnicas de manipulação de DNA	37
3.4.1 Purificação de DNA genômico de <i>A. brasilense</i>	37
3.4.2 Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)	37
3.4.3 Extração plasmidial	37
3.4.4 Eletroforese em gel de agarose	38

3.4.5 Sequenciamento de DNA	38
3.4.6 Clivagem de DNA com enzimas de restrição	39
3.4.7 Ligação de fragmentos de DNA aos vetores	39
3.5 Transformação bacteriana por choque térmico	40
3.5.1 Preparo de células quimiocompetentes utilizando MgCl ₂ e CaCl ₂	40
3.5.2 Transformação bacteriana por choque térmico	40
3.6 Conjugação bacteriana	40
3.6.1 Conjugação bacteriana biparental	40
3.6.2 Conjugação bacteriana triparental	41
3.7 Estratégias de mutagênese dos genes <i>nifA</i> e <i>draT</i> de <i>Azospirillum brasilense</i>	41
3.8 Determinação de atividade da nitrogenase	43
3.9 Dosagem de proteínas totais	44
3.10 Determinação da atividade específica da β-galactosidase	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
4.1 Obtenção dos plasmídeos mutagênicos pTMA9 e pTMA10	46
4.2 Obtenção dos plasmídeos de complementação pTMA12 e pTMA13	55
4.3 Construção de estirpes mutantes de <i>A. brasilense</i> truncadas na região 5' do gene <i>nifA</i>	59
4.4 Construção de estirpes mutantes de <i>A. brasilense</i> deletadas no gene <i>draT</i>	62
4.5 Determinação de atividade da nitrogenase das estirpes mutantes na porção amino- terminal do gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i>	64
4.6 Ensaio de ativação transcricional pela proteína NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i>	66
4.7 Determinação de atividade da nitrogenase das estirpes mutantes complementadas com os plasmídeos pTMA12 e pTMA13	69
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
7. ANEXOS	85
Anexo A - Vetor pBluescript II KS (+/-) (Agilent Technologies)	85

Anexo B - Vetor pSUP202 (SIMON <i>et al.</i> , 1983)	86
Anexo C - Vetor pLAFR3.18 (MACHADO <i>et al.</i> , 1995).....	87
Anexo D - Vetor pET28a (Novagen)	88

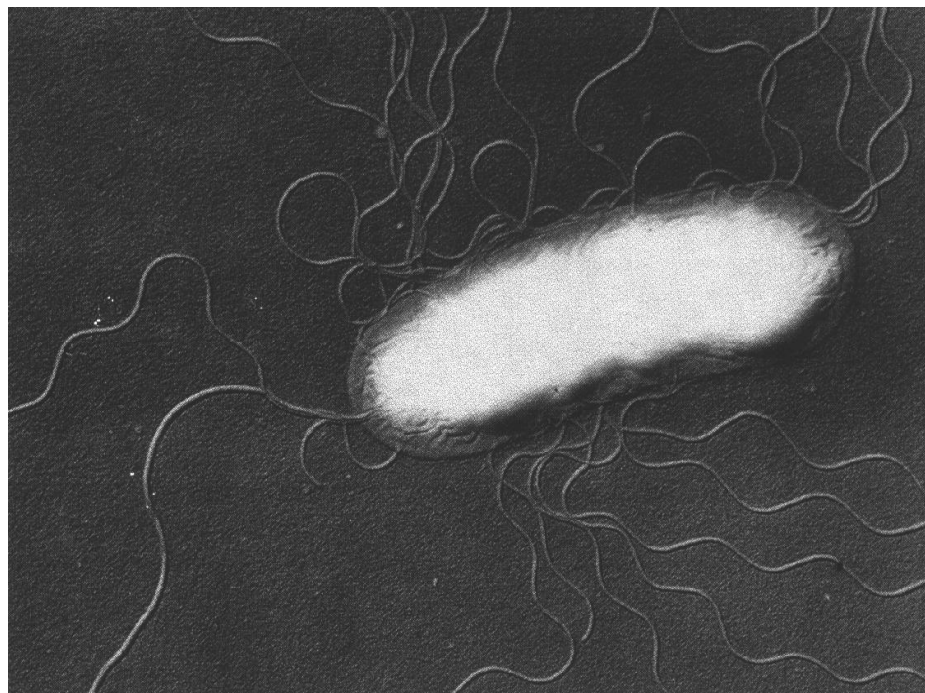
1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* é constituído por bactérias diazotróficas (capazes de fixar dinitrogênio), aeróbicas, Gram-negativas, curvas, móveis, microaerofílicas e endofíticas facultativas. Dependendo da espécie, a temperatura ótima de crescimento pode variar de 28 a 41°C (ECKERT *et al.*, 2001). Estes microrganismos podem ser encontrados associados com diversas plantas de interesse agrícola, incluindo o milho, trigo, sorgo e arroz (DÖBEREINER e DAY, 1976; DÖBEREINER, 1991; STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000; ECKERT *et al.*, 2001).

Azospirillum spp. pertence à subdivisão α das Proteobactérias (YOUNG, 1992) e comporta 20 espécies, atualmente: *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum* (TARRAND *et al.*, 1978), *Azospirillum halopraeferans* (REINHOLD *et al.*, 1987), *Azospirillum amazonense* (MAGALHÃES *et al.*, 1983), *Azospirillum irakense* (KHAMMAS *et al.*, 1989), *Azospirillum largimobile* (DEKHIL *et al.*, 1997), *Azospirillum doebereineriae* (ECKERT *et al.*, 2001) e *Azospirillum oryzae* (XIE e YOKOTA, 2005), *Azospirillum melinis* (PENG *et al.*, 2006), *Azospirillum canadense* (MEHNAZ *et al.*, 2007), *Azospirillum zea* (MEHNAZ *et al.*, 2007), *Azospirillum rugosum* (YOUNG *et al.*, 2008), *Azospirillum palatum* (ZHOU *et al.*, 2009), *Azospirillum picis* (LIN *et al.*, 2009), *Azospirillum thiophilum* (LAVRINENKO *et al.*, 2010), *Azospirillum formosense* (LIN *et al.*, 2012), *Azospirillum fermentarium* (LIN *et al.*, 2013), *Azospirillum humicireducens* (ZHOU *et al.*, 2013), *Azospirillum soli* (LIN *et al.*, 2015) *Azospirillum agricola* (LIN *et al.*, 2016). Dentre estas espécies, a mais estudada é *A. brasilense* (Figura 1).

Figura 1 - Micrografia eletrônica de transmissão de *Azospirillum brasilense*.



***Azospirillum brasilense* ATCC 29145 (~ 15.000 x) cultivada em meio MPSS ágar a 30°C durante 24 horas. O flagelo polar único e os flagelos laterais podem ser visualizados.**

Fonte: BERGEY *et al.*, 1984.

Bactérias do gênero *Azospirillum* apresentam um grande potencial de aplicação como biofertilizantes por promoverem o crescimento vegetal. Este efeito tem sido atribuído a diversos fatores, entre eles a fixação biológica de nitrogênio (DOBEREINER e DAY, 1976) e a produção de hormônios promotores do crescimento para as plantas, como auxinas, citocininas e giberelinas (BARBIERI e GALLI, 1993; OKON *et al.*, 1976; BASHAN *et al.*, 1989 e FAGES *et al.*, 1994). Como este trabalho relaciona-se à regulação do processo de fixação biológica de nitrogênio, apenas este fator será abordado nesta revisão bibliográfica.

Dentre as bactérias fixadoras de nitrogênio presentes na rizosfera das gramíneas, aquelas pertencentes ao gênero *Azospirillum*, em especial a espécie *Azospirillum brasilense*, tem sido amplamente estudada devido a sua ampla distribuição nos solos tropicais e subtropicais e pela capacidade de promover o crescimento vegetal. O uso de *Azospirillum brasilense* está diretamente relacionado com aumento da produtividade final, uma vez que promove o aumento na taxa de acúmulo de matéria seca, aumento de biomassa e altura, aceleração na taxa de germinação e benefícios no sistema radicular (DALLA SANTA *et al.*, 2004; HUNGRIA *et al.*, 2010; VOGEL *et al.*, 2013).

No Brasil, o uso de *Azospirillum brasilense* como biofertilizante em campo já foi aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para as culturas de milho e trigo. Considerando a substituição parcial (50%) do uso de fertilizantes nitrogenados, correspondente a cerca de 52 kg de N ha⁻¹ em 14,1 milhões de hectares para o milho e 35 kg de N ha⁻¹ em 2,4 milhões de hectares para o trigo, a economia estimada é de aproximadamente US\$ 1,2 bilhões por ano (HUNGRIA *et al.*, 2010). Dessa forma, o uso de inoculantes contendo *Azospirillum* poderia ajudar na redução do uso de fertilizantes químicos diminuindo os custos e a contaminação causada pelos mesmos.

1.2 Fixação biológica do nitrogênio

O nitrogênio é um dos elementos necessários para a síntese de proteínas, ácidos nucléicos e outras biomoléculas sendo, portanto, fundamental para manutenção da vida. As bactérias desenvolveram mecanismos de utilização de diversas fontes de nitrogênio, como amônio, glutamina, glutamato, NO₃⁻, NO₂⁻, além do gás dinitrogênio (N₂). Alguns desses compostos podem ser diretamente assimilados, entretanto, moléculas como NO₃⁻, NO₂⁻ e N₂ necessitam ser primeiramente reduzidas para depois serem assimiladas (REITZER, 2003).

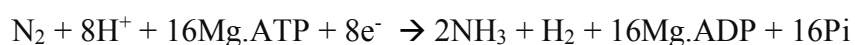
O gás dinitrogênio, N₂, compõe cerca de 78% da atmosfera terrestre, mas não é assimilável pela maioria dos organismos devido à sua baixa reatividade (KIM e REES, 1994). Apenas um pequeno grupo de procariotos, denominados diazotrofos, são capazes de reduzir o N₂ a NH₃, em um processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN) (BURRIS, 1991; YOUNG, 1992; BRILL, 1977), e assim disponibilizar nitrogênio em sua forma reduzida para utilização por outros organismos.

A fixação biológica de nitrogênio é de grande importância econômica, pois este elemento é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento de plantas (DIXON e KAHN, 2004). As culturas vegetais são incapazes de utilizar nitrogênio atmosférico diretamente, mas podem obter nitrogênio fixado a partir de duas fontes: microrganismos que convertem o nitrogênio atmosférico a amônio ou através de fertilizantes nitrogenados. Como já mencionado, além de elevar os custos da produção agrícola, os fertilizantes nitrogenados podem gerar uma série de danos ecológicos, incluindo a eutrofização de rios e lagos, acidificação do solo e emissão de óxidos de nitrogênio na atmosfera (DIXON e KAHN, 2004). Além disso, uma parcela significativa do total aplicado no solo (cerca de 50%) é perdida por ação de chuvas, erosão e atividade bacteriana (PEDROSA, 1987). Assim, existem potenciais ganhos a partir da redução da dependência de fertilizantes nitrogenados na agricultura nos países em

desenvolvimento (MUS *et al.*, 2016), e há um interesse significativo na expansão de pesquisas a respeito da fixação biológica de nitrogênio no que diz respeito à obtenção de um avanço em direção à sustentabilidade.

1.3 Complexo da Nitrogenase

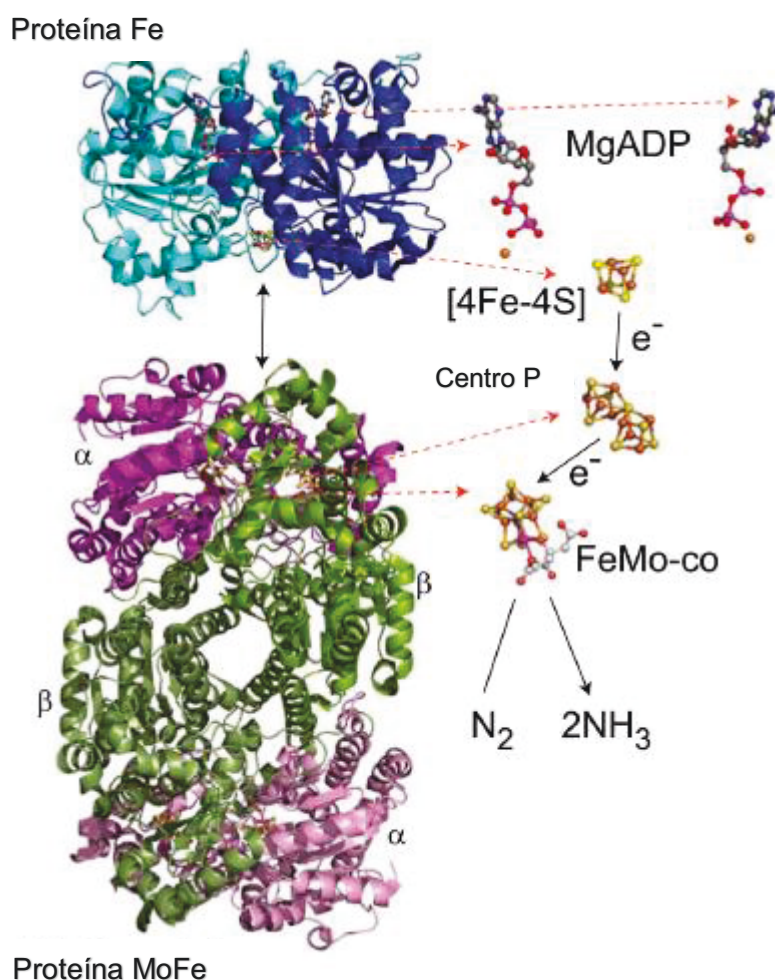
A fixação biológica de nitrogênio que envolve a redução do N₂ a NH₃ é catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase (SIMPSON e BURRIS, 1984). Este processo requer grande quantidade de energia obtida por hidrólise de MgATP a MgADP + Pi, como representado pela seguinte reação:



Nitrogenases são metaloenzimas sensíveis a oxigênio com estrutura e mecanismos de catálise conservados, podendo ser subdivididas em três grupos diferentes de acordo com as suas composições metálicas: molibdênio (Mo)-, vanádio (V)- e ferro-dependente nitrogenases (EADY, 1996). A forma mais comum e melhor caracterizada é a nitrogenase dependente de molibdênio (Mo) (HU e RIBBE, 2011). Esta nitrogenase é composta por duas proteínas: proteína ferro-molibdênio (MoFe) (dinitrogenase ou NifDK), um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ de 240 kDa e a proteína ferro (Fe) (dinitrogenase redutase ou NifH), um homodímero γ_2 de 64 kDa (MOURE *et al.*, 2013) (Figura 2).

A proteína Fe funciona como um doador de elétrons para a proteína MoFe, sendo que para cada elétron transportado, há a hidrólise de duas moléculas de ATP (SEEFELDT *et al.*, 2009). Após a ligação de duas moléculas de MgATP na proteína Fe, esta sofre uma mudança conformacional que permite sua associação com a proteína MoFe, sendo possível a transferência de um elétron. Em seguida, a proteína Fe oxidada e ligada a MgADP, dissocia-se da proteína MoFe para ser ligada novamente a MgATP e reiniciar o ciclo, que é repetido até atingir o número de elétrons necessários para reduzir o substrato (LUKOYANOV *et al.*, 2012).

Figura 2 – Modelo estrutural das proteínas Fe e MoFe do complexo nitrogenase de *Azotobacter vinelandii*.



A proteína Fe é um dímero γ_2 com cada subunidade mostrada com um tom de azul. A proteína MoFe é um tetramero $\alpha_2\beta_2$, com as subunidades α em rosa e as β em verde. A proteína MoFe liga-se a duas proteínas Fe e cada unidade $\alpha\beta$ funciona como uma unidade catalítica. Uma proteína Fe está representada associando-se a uma unidade $\alpha\beta$ da proteína MoFe. As posições relativas das duas moléculas de MgADP, o centro metálico [4Fe-4S] da proteína Fe e os centros P [8Fe-7S] e cofator FeMo (FeMo-co) [7Fe-Mo-9S-homocitrato-C] da proteína MoFe estão mostrados. O fluxo de elétrons é do centro [4Fe-4S] ao centro P para o cofator FeMo. No esquema os elementos apresentam as seguintes cores: C em cinza, O em vermelho, N em azul, Fe em laranja, S em amarelo e Mo em magenta. Fonte: Adaptado (SEEFELDT *et al.*, 2009).

O complexo da nitrogenase também é capaz de reduzir diversos outros substratos além do gás N_2 (BOTHE *et al.*, 2006). O substrato mais utilizado para avaliar a atividade da nitrogenase *in vivo* e *in vitro* é o acetileno (C_2H_2), que é reduzido a etileno C_2H_4 . Quando nenhum outro substrato está presente, a nitrogenase é capaz de reduzir os prótons presentes na solução a H_2 (BARNEY *et al.*, 2004).

1.4 Genes *nif*

Em *A. brasilense* o operon *nifHDK* codificando para ambos os componentes da nitrogenase foi isolado baseado na similaridade de sequência com os genes *nifHDK* de *Klebsiella pneumoniae* (QUIVIGER *et al.*, 1982; PERROUD *et al.*, 1985). Vários genes *nif* e *fix* adicionais envolvidos no processamento e transporte de elétrons para o complexo enzimático da nitrogenase, biossíntese de cofatores, bem como regulação da fixação de nitrogênio, foram isolados. Com exceção para os genes *nifA* e *nifB* transcritos separadamente, todos os demais genes *nif* encontrados ocupam um cluster maior de mais de 30kb, contendo os genes *nifHDK* (LIANG, Y.Y.; KAMINSKI, P.A.; ELMERICH C., 1991).

A transcrição dos genes *nif* depende de promotores contendo uma sequência conservada (CTGGYAYR-N₄-TTGCA) nas regiões -25/-24 e -13/-12 em relação ao início de transcrição (FISCHER, 1994). Estes promotores são reconhecidos por uma forma da holoenzima RNA polimerase contendo o fator σ^{54} ou σ^N e requerem a proteína NifA como ativador transcricional (MERRICK, 1992).

1.5 Assimilação de amônio

O amônio obtido a partir do processo de fixação biológica de nitrogênio pelo complexo da nitrogenase pode ser assimilado através de duas vias, uma envolvendo a ação sequencial das enzimas glutamina sintetase (GS) (Reação 1) e glutamato sintase (GOGAT) (Reação 2), e outra envolvendo a enzima glutamato desidrogenase (GDH) (Reação 3), uma via alternativa em muitas bactérias, incluindo as enterobactérias (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). Os produtos dessas vias servem como doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas.

Reação 1



Reação 2



Reação 3



A primeira via (GS – GOGAT) é a principal responsável pela assimilação de amônio em condições limitantes deste composto e é a via predominante em *A. brasilense* (FIBACH-PALDI *et al.*, 2012). Na primeira reação uma molécula de amônio é incorporada em uma molécula de glutamato para formar glutamina em uma reação dependente de ATP e catalisada pela enzima glutamina sintetase. Em seguida, há a transferência do grupo amida da glutamina para uma molécula de α -cetoglutarato (2-oxoglutarato) produzindo duas moléculas de glutamato, em uma reação dependente de NADPH e catalisada pela enzima glutamato sintase. A segunda via de assimilação de amônio (GDH) encontra-se ativa quando a concentração de amônio é alta, pois a GDH possui um alto K_m para íons amônio (MERRICK e EDWARDS, 1995). Nesta reação há a síntese de glutamato a partir de α -cetoglutarato e NH_4^+ em uma única etapa. Em *A. brasilense* a via GS-GOGAT é a via predominante de assimilação de amônio independente da fonte de nitrogênio utilizada para crescimento (WESTBY *et al.*, 1987).

1.6 Regulação transcricional da nitrogenase

1.6.1 Proteína NifA

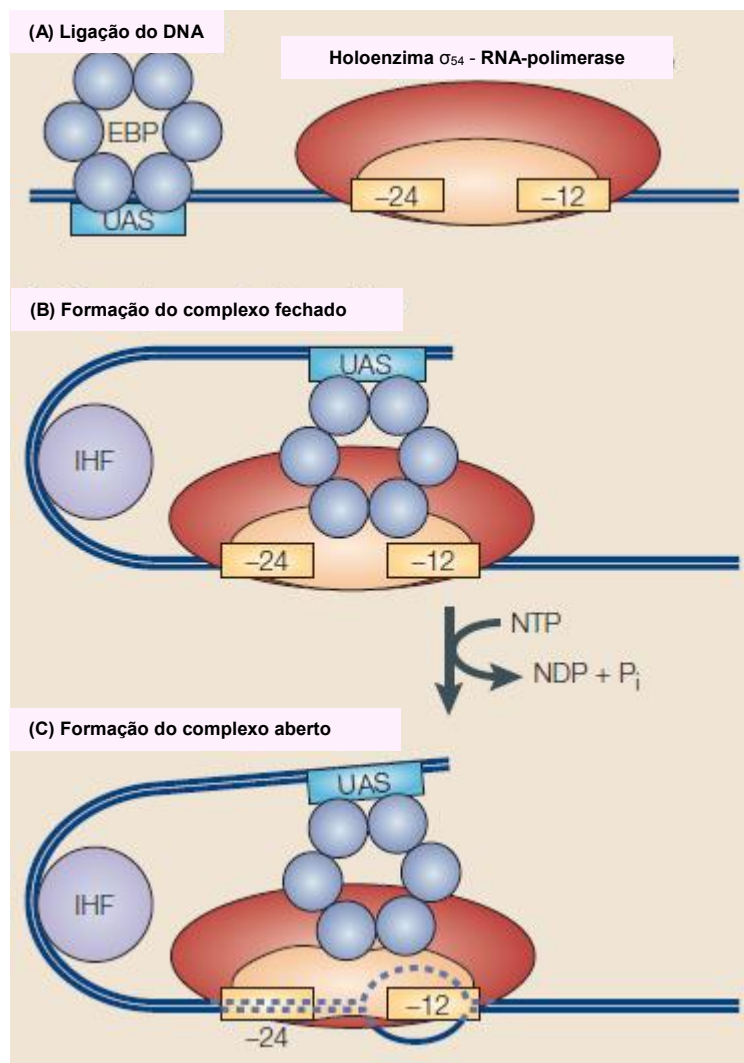
A proteína NifA pertence à família das EBP's (*enhancer-binding proteins*), envolvida na ativação da transcrição de genes em resposta a estímulos celulares. Esta proteína é ativadora transcricional dos genes *nif* nas Proteobactérias diazotróficas (MERRICK e EDWARDS, 1995) e pertence à família de ativadores transcricionais dependentes de σ^{54} (SHINGLER, 1996), que inclui a proteína NtrC. Para isso, a proteína NifA se liga a uma região UAS (*upstream activation sequence*), caracterizada pelo motivo TGTN₁₀ACA (sendo N qualquer nucleotídeo), no promotor dos genes *nif* localizada à montante do sítio de início da transcrição (BUCK *et al.*, 1987; MORETT e BUCK, 1988).

O processo de transcrição dependente do fator σ^{54} envolve etapas de ligação de proteínas ao DNA e a formação do complexo aberto da RNA polimerase (Figura 3). Para isso, fator σ^{54} associa-se de forma reversível com a RNA polimerase e o complexo reconhece uma sequência consenso promotora localizada a -12 e -24 pares de base do sítio de início da transcrição (Figura 3A). A iniciação da transcrição ocorre pela interação física da holoenzima σ^{54} -RNA polimerase

à uma proteína EBP, neste caso, a proteína NifA, que é facilitada pela ligação do ativador (mostrado como um oligômero azul) à uma sequência de ativação (UAS) localizada pelo menos 100 pb à montante do local de início da transcrição. Para que esta ligação se estabeleça, o DNA forma uma dobra e, em alguns casos, outras proteínas de ligação ao DNA, como as IHF (*integration host factor*) são requeridas para que haja a formação deste complexo fechado (Figura 3B) (DIXON e KHAN, 2004).

Na ausência da proteína ativadora, a holoenzima σ^{54} -RNA polimerase forma complexos fechados onde o DNA do promotor é fita dupla e que raramente sofrem isomerização espontânea para formar complexos abertos. A hidrólise de nucleotídeos (por exemplo, ATP) exercida pela EBP fornece energia e promove a reestruturação do complexo fechado para formação do complexo aberto, no qual as fitas de DNA da região a ser transcrita estão desnaturadas (Figura 3C) (DIXON e KHAN, 2004).

Figura 3 – Modelo esquemático de ativação transcricional mediada pela ligação de uma EBP.



A ligação da proteína ativadora EBP (por exemplo, NifA) a uma sequência UAS do DNA (3A) permite a iniciação da transcrição pela interação física com a holoenzima σ^{54} -RNA polimerase (3B) ligada no promotor localizado a -24/-12 bases do início da transcrição, logo após a formação do complexo aberto (3C).

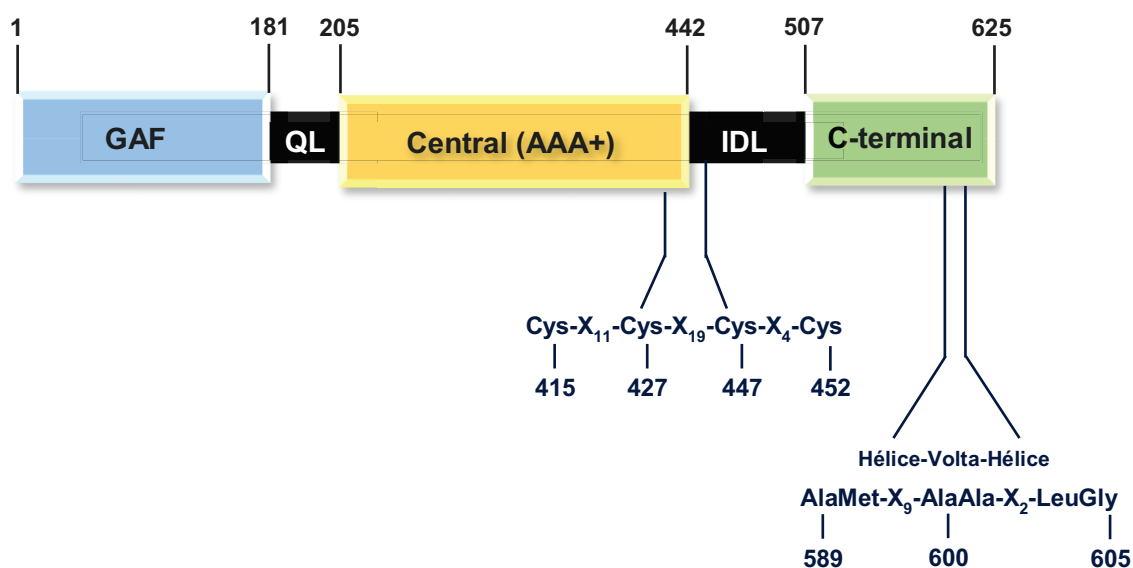
Fonte: Adaptado (DIXON e KHAN, 2004).

1.6.2 Estrutura e função dos domínios da proteína NifA

As proteínas dessa família possuem uma estrutura semelhante contendo três domínios funcionais separados por duas regiões de interdomínio (FISCHER *et al.*, 1988; DRUMMOND *et al.*, 1986), sendo um domínio N-terminal, um domínio central catalítico, e um domínio C-

terminal. O domínio amino-terminal (N-terminal), que apresenta um motivo GAF, é bastante variável entre os microrganismos, refletindo a diversidade de mecanismos de regulação dessa proteína entre as diferentes espécies (FISCHER, 1994). Em *A. brasilense* este domínio é responsável pelo controle negativo da atividade da proteína em resposta aos níveis de íons amônio (ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C., 1996). O domínio N-terminal é conectado por uma região de interdomínio, denominada QL (*Q-linker*), ao domínio central, que possui em média 240 aminoácidos e é bastante conservado em toda sua extensão (MORETT e SEGOVIA, 1993), apresentando função na interação com o fator σ^{54} da RNA polimerase, além de possuir um motivo AAA+ de hidrólise de ATP (GONZÁLEZ *et al.*, 1998). O domínio carboxi-terminal (C-terminal), possui entre 65 e 130 resíduos de aminoácidos e contém o motivo hélice-volta-hélice de ligação ao sítio UAS do DNA (MORETT, E.; CANNON, W.; BUCK, M., 1988). Em *A. brasilense*, os domínios central e C-terminal são ligados pela região interdomínio (IDL). No fim do domínio central e início da região interdomínio IDL há um motivo contendo resíduos de cisteínas, provavelmente envolvidos com a sensibilidade ao oxigênio (FISCHER, 1994). A Figura 4 abaixo ilustra os domínios funcionais componentes da proteína NifA de *A. brasilense*.

Figura 4 – Modelo estrutural esquemático dos domínios funcionais da proteína NifA de *A. brasilense*.



O domínio amino-terminal contendo o motivo GAF destacado em azul claro corresponde ao domínio regulatório de NifA. Em amarelo está representado o domínio central de ligação e hidrólise de ATP. O domínio carboxi-terminal que contém o motivo de ligação ao DNA encontra-se destacado em verde claro. Em azul escuro estão indicadas as regiões

conservadas de cisteínas e hélice-volta-hélice. Os números em preto indicam a posição dos aminoácidos na proteína NifA.

1.6.3 Regulação da atividade da proteína NifA

A regulação da atividade das proteínas NifA em relação aos níveis de oxigênio e amônio de diversos microrganismos varia significativamente, embora apresentem estruturas parecidas. Dependendo do tipo de regulação presente, as proteobactérias podem ser divididas em dois grupos: o primeiro compreende bactérias cuja regulação de NifA envolve a ação de uma proteína sensora denominada NifL, como observado em γ -proteobactérias (BERGER *et al.*, 1994); e o segundo, do qual fazem parte as α e β -proteobactérias (exceto *Azoarcus*), onde a regulação de NifA ocorre de forma independente de NifL (DIXON *et al.*, 1997).

Em *K. pneumoniae* e *A. vinelandii*, a atividade da proteína NifA é inibida pela proteína NifL pela formação de um complexo inativo em resposta a altas concentrações de oxigênio ou íons amônio (DIXON *et al.*, 1997). O controle da atividade inibitória de NifL sobre a proteína NifA é mediado pela proteína da família P_{II}, GlnK (JACK *et al.*, 1999), no entanto, o mecanismo de interação entre NifL e GlnK parece não ser conservado. Isto pois, em *K. pneumoniae*, por exemplo, a interação entre NifA e GlnK leva à ativação de NifA, independentemente do estado de uridililação de GlnK (HE *et al.*, 1998). Já para *A. vinelandii*, essa interação produz uma NifA inativa, cuja inibição é aliviada pela forma uridililada de GlnK, que impede sua interação com NifL (RUDNICK *et al.*, 2002).

Em *H. seropedicae* e *A. brasilense* não foi detectada a proteína NifL. Nestes organismos a proteína NifA tem sua atividade controlada negativamente pelos níveis de oxigênio e pela concentração de amônio (ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C., 1996; SOUZA *et al.*, 1999). Estudos realizados com a proteína NifA de *H. seropedicae* truncada em seu domínio N-terminal mostraram que a mesma é capaz de ativar a expressão de uma fusão *nifH::lacZ* tanto na presença quanto na ausência de íons amônio (MONTEIRO *et al.*, 1999a; SOUZA *et al.*, 1999). Além disso, foi observado que a regulação pelos níveis de íons amônio é retomada em *E. coli* quando a proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae* é complementada *in trans* com seu domínio N-terminal (MONTEIRO *et al.*, 1999b). Estes resultados indicam que o domínio N-terminal possa estar envolvido na resposta aos níveis de nitrogênio celular (MONTEIRO *et al.*, 1999a e SOUZA *et al.*, 1999).

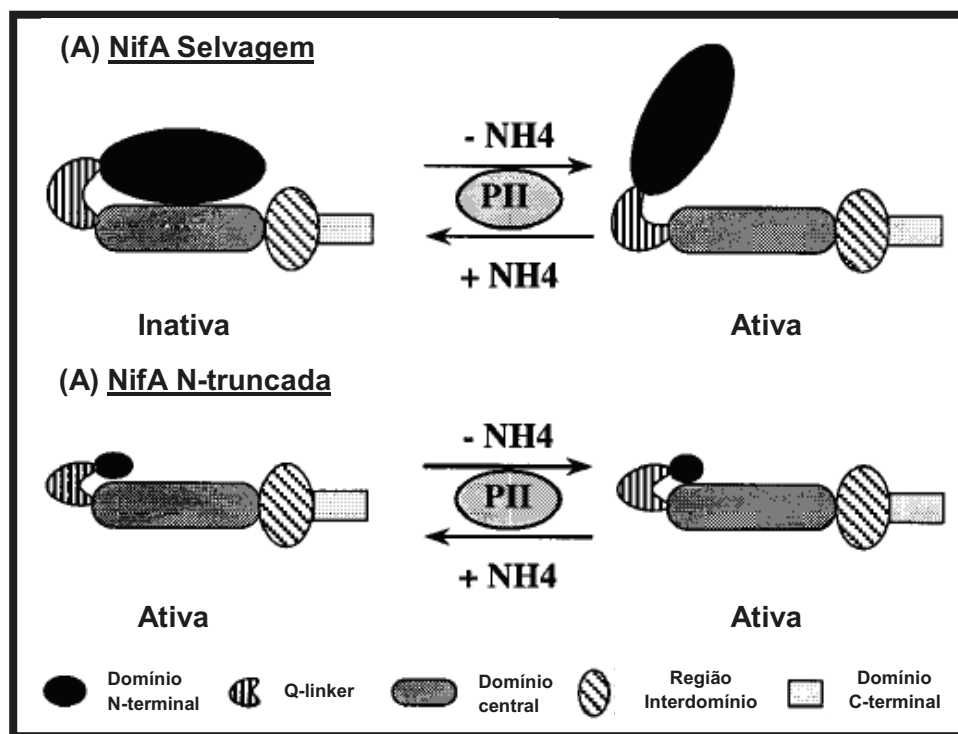
Em *A. brasilense*, a proteína NifA é expressa tanto na presença quanto na ausência de nitrogênio fixado, entretanto, sua atividade requer a presença da proteína P_{II} GlnB. Em

experimento realizado por Araújo e colaboradores (2004) foi mostrado que a proteína NifA só foi capaz de ativar a expressão de uma fusão *nifH::lacZ* em *E. coli* quando a proteína GlnB estava presente. Por outro lado, a proteína NifA truncada em seu domínio N-terminal é ativa independente da presença da proteína GlnB e dos níveis de nitrogênio fixado (ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C., 1996).

Em *A. brasilense* várias deleções da região N-terminal de NifA foram construídas e a atividade da nitrogenase foi restaurada quando as formas N-truncadas de NifA são inseridas em um mutante *nifA*, indicando que a porção N-terminal não é essencial para sua atividade (ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C., 1996) (Figura 5). As formas N-truncadas de NifA também são capazes de restaurar o fenótipo de fixação de nitrogênio no mutante *glnB*. Além disso, em experimento de regulação *in trans* do domínio N-terminal sobre a forma N-truncada de NifA de *A. brasilense* realizado por Nishikawa e colaboradores (2010), não foi observado efeito negativo sobre a atividade transcricional. Estes dados levaram a formulação da hipótese de que em *A. brasilense* a região N-terminal de NifA inibe a atividade da proteína em condições de excesso de nitrogênio e que em condições de fixação de nitrogênio GlnB-UMP se ligaria à NifA removendo o efeito inibitório do domínio N-terminal.

Por outro lado, a proteína NifA de *A. brasilense* sem o domínio N-terminal é menos ativa que a selvagem em condições de fixação de nitrogênio, sugerindo que esse domínio possa ser necessário para uma atividade ótima, provavelmente por manter os outros domínios em uma conformação mais favorável ou por aumentar a estabilidade da proteína (ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C., 1996).

Figura 5 - Modelo de regulação da atividade da proteína NifA em resposta a amônio e na presença da proteína PII GlnB.



A proteína NifA selvagem (5A) é ativa somente na ausência de íons amônio. Nesta condição, a proteína P_{II} é necessária para prevenir a inibição do domínio N-terminal. Na presença de íons amônio, o domínio N-terminal inibe o resto da proteína, provavelmente devido ao fato de que a proteína P_{II} não é capaz de manter a NifA em sua forma ativa. Por outro lado, a proteína N-truncada (5B) é ativa mesmo na presença de íons amônio ou na ausência de P_{II}.

Fonte: Adaptado (ARSENE *et al.*, 1996).

1.7 Regulação pós-traducional da nitrogenase

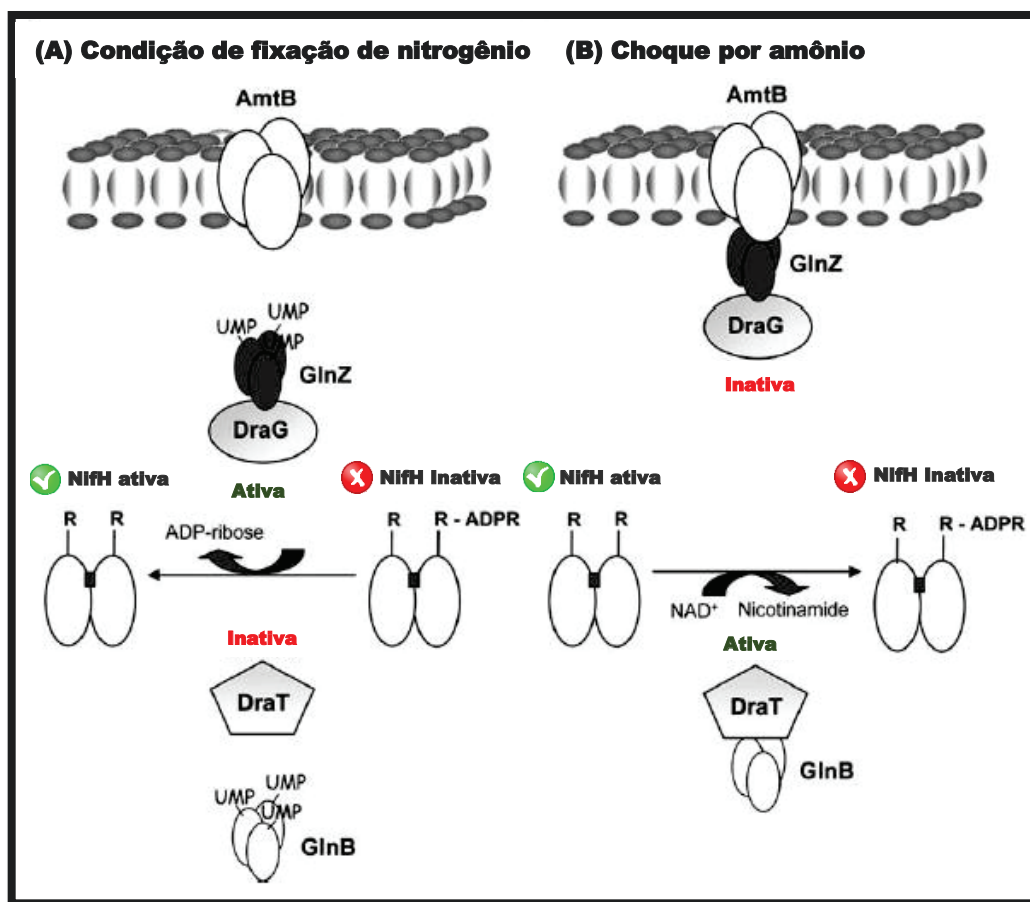
Como discutido anteriormente, a fixação biológica de nitrogênio é um processo que demanda um alto gasto energético, necessitando de pelo menos 16 mols de ATP para cada molécula de dinitrogênio reduzida. Dessa forma, este processo é regulado tanto a nível transcricional, mediado pela proteína NifA, quanto a nível pós-traducional em *A. brasilense*. O controle pós-traducional da atividade do complexo da nitrogenase tem sido estudado em uma gama de diazotrofos e fornece um mecanismo rápido e reversível pelo qual os microrganismos podem responder a mudanças transitórias no ambiente (HUERGO *et al.*, 2012a). Este complexo é inibido de forma reversível em resposta à adição de íons amônio ao meio de cultivo em vários microrganismos diazotróficos. A atividade da nitrogenase é restaurada assim que o amônio

adicionado é consumido pelo metabolismo bacteriano. Este fenômeno é conhecido como desligamento e religamento da nitrogenase (*switch off/on*) (ZUMFT e CASTILLO, 1978).

O mecanismo mais bem caracterizado de regulação pós-traducional da nitrogenase ocorre através de ADP-ribosilação de um resíduo de arginina (Arg101) do dímero da dinitrogenase redutase, que impede a associação da mesma com a dinitrogenase, inibindo, portanto, os ciclos de transferência de elétrons. Esta reação é catalisada pela dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DraT), um monômero de 30 kDa que utiliza uma molécula de NAD^+ como doador de grupo ADP-ribose. O grupo ADP-ribosil ligado à proteína Fe é removido pela dinitrogenase redutase glicohidrolase (DraG), o que promove a reativação do complexo da nitrogenase (MOURE *et al.*, 2013; MURRELL *et al.*, 1988).

O modelo de regulação pelas enzimas DraT e DraG parece envolver a interação direta das mesmas com as proteínas sinalizadoras P_{II}. Em *A. brasilense*, onde são codificadas duas proteínas P_{II}, GlnB e GlnZ, um modelo desse sistema foi proposto por Huergo e colaboradores (2006a). Sob condições de fixação de nitrogênio as proteínas GlnB e GlnZ estão totalmente uridililadas e localizadas no citosol, assim como as enzimas DraT e DraG. Neste caso, DraG encontra-se ativa e complexada com a proteína GlnZ, enquanto DraT é inativa e não pode modificar a proteína NifH, que é ativa (Figura 6A). Quando os níveis de amônio extracelular aumentam, a proteína GlnB desuridililada associa-se com DraT, que passa a ser ativa e catalisar a ADP-ribosilação e subsequente inativação da proteína Fe. Ao mesmo tempo, a enzima DraG é sequestrada para a membrana e associa-se com a proteína transportadora AmtB via GlnZ desuridililada (Figura 6B) (HUERGO *et al.*, 2006a).

Figura 6 – Modelo de regulação da atividade da proteína NifH pelas enzimas DraT e DraG em resposta aos níveis de amônio em *A. brasilense*.



Sob condições de fixação de nitrogênio (6A), a proteína GlnB encontra-se uridililada e não interage com a enzima DraT, que não é capaz de inativar a proteína NifH. Enquanto isso, a enzima DraG encontra-se associada com GlnZ uridililada no citosol. Por outro lado, quando há um choque por amônio (6B), a DraT é encontrada interagindo com GlnB desuridililada e catalisa a inativação da enzima NifH pela transferência de um grupo ADP-ribosil a um resíduo de arginina conservado do dímero. DraG, por sua vez, é sequestrada pelo transportador de amônio AmtB encontrado na membrana via GlnZ.

Fonte: Adaptado (HUERGO *et al.*, 2006a).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse projeto é construir estirpes de *A. brasilense* contendo o gene *nifA* truncado na região 5' e sem o gene *draT*, capazes de fixar nitrogênio constitutivamente e excretar amônio.

2.2 Objetivos específicos

- a) Construir o plasmídeo contendo o gene *nifA* de *A. brasilense* deletado na porção 5';
- b) Construir o plasmídeo contendo o gene *draT* de *A. brasilense* deletado;
- c) Selecionar e caracterizar estirpes de *A. brasilense* mutantes cromossomais deletadas na porção N-terminal do gene *nifA*;
- d) Selecionar e caracterizar estirpes de *A. brasilense* mutantes cromossomais deletadas no gene *draT*;
- e) Determinar a atividade da nitrogenase dos mutantes duplos em diferentes condições fisiológicas;
- f) Determinar a ativação transcricional *in vivo* da fusão *nifB::lacZ* pela proteína NifA N-truncada dos mutantes contendo deleção cromossomal da região 5' do gene *nifA*;
- g) Determinar a complementação das estirpes contendo deleção na porção N-terminal do gene *nifA* com plasmídeos expressando a proteína nativa e uma outra versão N-truncada de NifA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Bactérias e Plasmídeos

Na Tabela 1 estão descritas as estirpes de bactérias utilizadas nesse estudo.

Tabela 1 – Estirpes de bactérias utilizadas neste estudo

Estirpe	Características	Referência
<i>Escherichia coli</i>		
TOP10	<i>F⁻ mcrA</i> Δ (<i>mcrR-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1</i> <i>endA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara, leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ^- <i>rpsL nupG</i> λ^-	Invitrogen
S17.1	Tra ⁺ (Sm ^R)	SIMON <i>et al.</i> , 1983
HB101	colE1 oriV; RP4tra ⁺ RP4oriT (Cm ^R)	KESSLER <i>et al.</i> , 1992
<i>Azospirillum brasilense</i>		
FP2	Estirpe selvagem, SP7 Nif ⁺ (Nal ^R Sm ^R)	PEDROSA e YATES, 1984
FP10	FP2 <i>nifA</i> ⁻ (Nal ^R Sm ^R)	PEDROSA e YATES, 1984
HM053	FP2 <i>glnA</i> ⁻ (Nal ^R Sm ^R)	MACHADO <i>et al.</i> , 1991
TAFP	FP2 Δ N- <i>nifA</i> (Nal ^R Sm ^R)	Este trabalho
TAHM	HM053 Δ N- <i>nifA</i> (Nal ^R Sm ^R)	Este trabalho

Na Tabela 2 estão listados os plasmídeos utilizados nesse trabalho.

Tabela 2 – Plasmídeos utilizados neste estudo

Plasmídeos	Características	Referência
pBlueScript II KS(+)	Plasmídeo de alto número de cópias para clonagem (Amp ^R)	Agilent Technologies
pSUP202	Mob (Amp ^R Cm ^R Tc ^R)	SIMON <i>et al.</i> , 1983
pLAFR3.18	Vetor de ampla faixa hospedeira com sítio de policlonagem do vetor pTZ18R (Cm ^R Tc ^R)	MACHADO <i>et al.</i> , 1995
pET28a	Vetor para expressão a partir do promotor T7. Expressa a proteína com fusão His-tag Nterminal (Km ^R)	Novagen
pMH1701	Contém o cassete <i>sacB</i> -Km (Km ^R)	HYNES <i>et al.</i> , 1989
pEMS140	Contém a fusão transcricional <i>nifB::lacZ</i> em pPW452 (Tc ^R)	REGO <i>et al.</i> , 2006
pLAnifApET	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> clonado em vetor pET28a (Km ^R)	ARAÚJO, 2008
pCNT7CCT	Expressa a proteína NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i> a partir de promotor T7 (vetor pT7-7) (Km ^R)	NISHIKAWA, 2010
pTMA1	Contém fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Nde</i> I de 390 pb, que possui a região Δ N- <i>nifA</i> UP clonada no vetor pBlueScript II KS(+) no sítio <i>Eco</i> RV (Amp ^R)	Este trabalho
pTMA2	Contém fragmento <i>Nde</i> I/ <i>Sal</i> I de 468 pb, que possui a região Δ N- <i>nifA</i> DOWN clonada no vetor pBlueScript II KS(+) no sítio <i>Eco</i> RV (Amp ^R)	Este trabalho
pTMA3	Contém fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Kpn</i> I de 268 pb, que possui a região <i>draT</i> UP clonada no vetor pBlueScript II KS(+) no sítio <i>Eco</i> RV (Amp ^R)	Este trabalho

pTMA4	Contém fragmento <i>KpnI/SalI</i> de 356 pb, que possui a região <i>draT</i> DOWN clonada no vetor pBlueScript II KS(+) no sítio <i>EcoRV</i> (Amp^{R})	Este trabalho
pTMA5	Contém fragmento <i>BamHI/SalI</i> de 846 pb, que possui a região $\Delta\text{N-}nifA$ UP fusionada à $\Delta\text{N-}nifA$ DOWN, clonado no vetor pBlueScript II KS(+) no sítio <i>EcoRV</i> (Amp^{R})	Este trabalho
pTMA6	Contém fragmento <i>BamHI/SalI</i> de 603 pb, que possui a região <i>draT</i> UP fusionada à <i>draT</i> DOWN, clonado no vetor pBlueScript II KS(+) no sítio <i>EcoRV</i> (Amp^{R})	Este trabalho
pTMA7	Contém fragmento <i>BamHI/SalI</i> de 846 pb, que possui a região $\Delta\text{N-}nifA$ UP fusionada à $\Delta\text{N-}nifA$ DOWN, clonado no vetor pSUP202 entre os sítios de restrição <i>BamHI</i> e <i>SalI</i> (Amp^{R} Cm^{R})	Este trabalho
pTMA8	Contém fragmento <i>BamHI/SalI</i> de 603 pb, que possui a região <i>draT</i> UP fusionada à <i>draT</i> DOWN, clonado no vetor pSUP202 entre os sítios de restrição <i>BamHI</i> e <i>SalI</i> (Amp^{R} Cm^{R})	Este trabalho
pTMA9	Contém o fragmento <i>BamHI</i> de <i>sacBKm</i> clonado no plasmídeo pTMA7 digerido com a enzima de restrição <i>BamHI</i> (Amp^{R} Cm^{R} Km^{R})	Este trabalho
pTMA10	Contém o fragmento <i>BamHI</i> de <i>sacBKm</i> clonado no plasmídeo pTMA8 digerido com a enzima de restrição <i>BamHI</i> (Amp^{R} Cm^{R} Km^{R})	Este trabalho
pTMA11	Contém o gene <i>nifA</i> N-truncado de <i>A. brasilense</i> clonado em vetor pET28a (Km^{R})	Este trabalho
pTMA12	Contém o gene <i>nifA</i> N-truncado de <i>A. brasilense</i> clonado no plasmídeo pLAFR3.18 (Cm^{R} Tc^{R})	Este trabalho

pTMA13	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>A. brasilense</i> clonado no plasmídeo pLAFR3.18 (Cm ^R Tc ^R)	Este trabalho
--------	---	---------------

3.2 Meios de cultura, condições de cultivo e estoque de bactérias

3.2.1 Meios empregados para cultivo de *A. brasilense*

As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas a 30°C em meio NFbHP (MACHADO *et al.*, 1991) e sob agitação de 120 rpm. Este meio consiste em meio NFb suplementado com solução de fosfatos em uma proporção de 50 mL para 1 L volume final (Tabela 3 – Composição do meio NFbHP).

Tabela 3 – Composição do meio NfbHP

Elemento	gramas/litro
KH ₂ PO ₄	4,0
K ₂ HPO ₄	6,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 . 10 ⁻¹
NaCl	1,0 . 10 ⁻¹
CaCl ₂	2,0 . 10 ⁻²
Ácido nitrilo triacético	5,6 . 10 ⁻²
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,0 . 10 ⁻²
Lactato de Sódio	5,0
Biotina	1,0 . 10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2,0 . 10 ⁻³
MnSO ₄ .H ₂ O	2,35 . 10 ⁻³
H ₃ BO ₃	2,8 . 10 ⁻³
CuSO ₄ .5H ₂ O	8,0 . 10 ⁻⁵
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,4 . 10 ⁻⁴

Como fonte de nitrogênio foi utilizada solução de NH₄Cl 1 M diluída para as concentrações finais de 5 mM, 10 mM e 20 mM no meio (condições de alto amônio). Também foi utilizada solução de glutamato 1 M diluída para concentração final de 0,5 mM no meio

(condição de baixo amônio). As soluções de fosfatos, cloreto de amônio e glutamato foram autoclavadas separadamente e adicionadas frias ao meio anteriormente à inoculação.

O meio NFbHP sólido foi obtido adicionando-se ágar bacteriológico na concentração de 15 g/L ao meio líquido. Dez por cento da mistura de fosfatos foi adicionada ao meio sólido antes da autoclavação para evitar hidrólise do ágar devido a possíveis variações no pH. O meio NFbHP semi-sólido foi obtido através da mistura dos meios líquido e sólido na proporção de 89:11 no momento do uso, respectivamente.

3.2.2 Meios empregados para cultivo de *E. coli*

Para cultivo das estirpes TOP10 e S17.1 de *Escherichia coli* em meio líquido foram utilizados os meios Luria-Bertani Broth (LB), Terrific Broth (TB) e SOC. As culturas em meio líquido foram incubadas a 37°C sob agitação de 160 rpm em incubadora rotativa (*shaker*) New Brunswick C25.

O meio LB (SAMBROOK *et al*, 1989) apresenta a seguinte composição:

Tabela 4 – Composição do meio LB

Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L
pH	7,0

Para cultivo em meio sólido (LA) adicionou-se 15 g/L de ágar ao meio LB.

O meio TB (SAMBROOK *et al*, 1989) apresenta a seguinte composição:

Tabela 5 – Composição do meio TB

Triptona	12 g/L
Extrato de levedura	24 g/L
Glicerol	4 mL/L

O meio SOC (SAMBROOK *et al.*, 1989) apresenta a seguinte composição:

Tabela 6 – Composição do meio SOC

Triptona	20 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Glucose	3,6 g/L
NaCl	0,6 g/L
KCl	0,186 g/L
MgCl ₂	0,94 g/L
MgSO ₄	1,2 g/L
pH	7,0

As estirpes de *E. coli* foram estocadas em glicerol 50% a -20°C. As estirpes de *A. brasilense* foram estocadas em frascos de vidros de 10 mL contendo 4 mL de meio NFbHPN-lactato sólido inclinado, a temperatura ambiente.

3.3 Antibióticos

As concentrações finais dos antibióticos utilizados nesse estudo estão descritas na Tabela 7 e foram adicionados aos meios de culturas de acordo com a resistência da estirpe ou do plasmídeo.

Tabela 7 – Concentrações de antibióticos utilizadas nos cultivos

Antibiótico	Concentração final para culturas de <i>E. coli</i>	Concentração final para culturas de <i>A. brasilense</i>
Ácido Nalidíxico (Nal)	10 µg/mL	10 µg/mL
Ampicilina (Amp)	250 µg/mL	-
Canamicina (Km)	100 µg/mL	200 µg/mL
Cloranfenicol (Cm)	30 µg/mL	30 µg/mL
Estreptomicina (Sm)	20 µg/mL	80 µg/mL
Tetraciclina (Tc)	10 µg/mL	10 µg/mL

3.4 Técnicas de manipulação de DNA

3.4.1 Purificação de DNA genômico de *A. brasilense*

A extração de DNA genômico de *A. brasilense* foi realizada a partir de uma cultura saturada. Para isso, cem microlitros de uma cultura fresca de *A. brasilense* foram inoculados em 10 mL de meio NFbHP contendo NH₄Cl a 20 mM, sendo feita uma incubação de 18 horas a 30°C sob agitação de 120 rpm. Ao final do crescimento, a cultura foi transferida para tubos do tipo Eppendorf e estes então foram centrifugados a 13.000 rpm durante 1 minuto. Em seguida, as células foram lavadas com 1 mL de tampão TES (Tris-HCl pH 8,0 50 mM, EDTA pH 8,0 20 mM, NaCl 200 mM) e ressuspensas em 500 µL de TES. Às células adicionou-se 2 µL de uma solução de lisozima a 100 mg/mL, seguido de incubação a 30°C por uma hora. Após esse período, foram adicionados SDS (1% m/v) e proteinase K (50 µg/mL), a mistura foi homogeneizada e incubada a 30°C por 16 horas. O sistema foi extraído quatro vezes com 500 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), e duas vezes com solução de clorofórmio. O sobrenadante aquoso foi separado e então adicionado de 2 volumes de etanol absoluto para precipitação do DNA genômico, o qual foi separado por centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 80% (v/v) e, após secagem a vácuo, ressuspensão em 80 µL de água ultrapura estéril.

3.4.2 Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)

A amplificação de DNA foi realizada utilizando o sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR) (MULLIS e FALOONA, 1987). Para a maioria das reações utilizou-se um sistema ao qual é adicionado 20 pmol de cada *primer*, 0,2 mM de uma solução de dNTPs, tampão para *Pfu* na concentração de 1X no volume final de reação, 1,5 mM de cloreto de magnésio, 1,5 U de *Pfu* X7 DNA polimerase e água ultrapura para completar o volume final para 50 µL. Como DNA molde foram utilizados 20 ng de DNA genômico extraído da estirpe FP2 de *A. brasilense* (derivada da estirpe Sp7) e, alternativamente, culturas de células fervidas foram usadas como DNA molde nas reações de PCR. Em alguns casos fez-se necessário o uso de DMSO (10 % ao volume final), afim de otimizar as amplificações.

3.4.3 Extração plasmidial

A extração de plasmídeos foi realizada pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989) com algumas modificações. Alíquotas de 1,5 mL de células de *E. coli* contendo o

plasmídeo de interesse e cultivadas até a saturação em meio líquido foram coletadas e centrifugadas a 14.500 rpm por 1 minuto. O sedimento resultante da centrifugação foi ressuspendido em 150 µL de solução GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM pH 8,0 e Tris-HCl 25 mM pH 8,0). A lise das células foi realizada através da adição de 150 µL de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,18 M), e, para neutralização do pH, foram adicionados 150 µL de KacF (acetato de Potássio 3 M, ácido fórmico 1,8 M, pH 4,8). Após incubação em banho de gelo por 15 minutos, o DNA cromossomal, proteínas e fragmentos celulares foram precipitados por centrifugação durante 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e tratado pela adição de 100 µL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) aos tubos, os quais foram agitados e centrifugados por 10 minutos a 14.500 rpm. O sobrenadante foi então coletado, transferido para um novo tubo e o DNA plasmidial precipitado pela adição de 2 volumes de etanol 96%. Após homogeneização vigorosa e centrifugação por 15 minutos a 14.500 rpm, o DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo ou a temperatura ambiente e ressuspendido em 30 µL de água ultrapura.

3.4.4 Eletroforese em gel de agarose

Para análise dos fragmentos de DNA foi utilizado gel de agarose horizontal, como descrito por Sambrook *et al.* (1989) com modificações. As concentrações empregadas variaram de 1 a 2%, em tampão TBE 1X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM pH 8,0) ou TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,3 e EDTA 1 mM), dependendo do objetivo da eletroforese. As amostras foram misturadas com tampão FSUDS (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA pH 8,0, 0,025% azul de bromofenol, 0,025% xileno cianol, 0,1% SDS e 20% Ficol) e a corrida foi realizada a 60 V por um período variável de acordo com a concentração do gel e os tamanhos dos fragmentos a serem separados. O DNA foi visualizado, após tratamento com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 15-30 minutos, em transluminador de luz ultravioleta (315 nm). O perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

3.4.5 Sequenciamento de DNA

Fragmentos de DNA de interesse foram sequenciados pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxinucleotídeos marcados com fluoróforos (SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R., 1977). Para a maioria das reações de sequenciamento foram utilizados 2 µL de tampão *Save Money* 10X, 1 µL de solução de dideoxinucleotídeos (BigDye® Terminator

v3.1), 0,5 μL de *primer forward* ou *reverse* a 10 pmol/ μL e água ultrapura para completar volume de 10 μL de reação. A massa de plasmídeo utilizada nas reações de sequenciamento variou entre 200-500 ng de DNA. Alternativamente, produtos de PCR foram utilizados como DNA molde e, nestes casos, a massa adicionada variou de acordo com o tamanho do produto. Os parâmetros de amplificação foram definidos de acordo com os iniciadores utilizados. Para a maioria dos casos os parâmetros utilizados foram: um ciclo de 1 minuto a 95°C; 30 ciclos incluindo uma etapa de 15 segundos a 95°C e outra de 4 minutos a 60°C; e extensão final de 5 minutos a 60°C. O produto da reação de sequenciamento, acrescido de 10 μL de água ultrapura, foi precipitado para remoção de restos de *primers*, dNTPs e alguns sais. Para isso, foram adicionados 2 μL de acetato de amônio 7,5 M e 66 μL de etanol 96%. Em seguida, foi feita uma incubação a -80°C durante 30 minutos e o produto precipitado foi recuperado por centrifugação a 14.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Por fim, o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco, e utilizado para análise em sequenciador automático ABI-PRISM 1500 (Applied Biosystems).

3.4.6 Clivagem de DNA com enzimas de restrição

Endonucleases de restrição foram adquiridas da Thermo Fisher Scientific ou New England Biolabs. As condições de reação, bem como quantidade de DNA, enzima e tampão, foram aquelas sugeridas pelo fabricante. Para confirmação de tamanho de fragmentos clonados foram utilizados sistemas de reação de 10 μL . Sistemas de 100 μL foram utilizados para purificação dos fragmentos gerados. As clivagens foram confirmadas através de eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TAE 1X).

3.4.7 Ligação de fragmentos de DNA aos vetores

Para reações de ligação foram empregados sistemas contendo uma mistura de DNA plasmidial linearizado e DNA inserto em uma proporção 1:5, 1 μL de tampão T4 DNA ligase 10X, 1 a 2 U de enzima T4 DNA ligase (Fermentas) e água ultrapura para completar volume final de 10 μL de reação. A temperatura de incubação da mistura variou de 16-20°C por não mais do que 18 horas.

3.5 Transformação bacteriana por choque térmico

3.5.1 Preparo de células quimiocompetentes utilizando MgCl₂ e CaCl₂

Células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 e S17.1 foram preparadas seguindo o método utilizando cloreto de magnésio e cloreto de cálcio (CHAN *et al.*, 2013). Inicialmente uma cultura de *E. coli* crescida até a saturação foi utilizada como inóculo em 100 mL de meio LB em um frasco do tipo Erlenmeyer de 1 L em uma proporção de 1:100. O cultivo foi realizado a 30°C a 120 rpm até que a cultura atingisse uma D.O._{595nm} entre 0,3 e 0,4. Após o período de incubação, a cultura foi dividida em 2 tubos falcon de 50 mL e foi feita uma centrifugação a 4.000 rpm, 4°C por 10 minutos. O precipitado resultante foi ressuscitado em 15 mL de solução MgCl₂ 0,1M. Após ressuspensão lenta das células foi realizada uma nova centrifugação a 4.000 rpm, 4°C por 10 minutos, sendo o sedimento ressuscitado em 25 mL de solução CaCl₂ 0,1M e incubado em banho de gelo durante 30 minutos. Centrifugou-se a suspensão novamente a 4.000 rpm, 4°C por 10 minutos, seguida de ressuspensão cuidadosa em 4 mL de uma solução CaCl₂ 0,1M com 20% de glicerol. Aliquotas de 100 µL foram feitas e estocadas em freezer a -80°C até o momento de uso.

3.5.2 Transformação bacteriana por choque térmico

Para transformação bacteriana, plasmídeos ou reações de ligação foram adicionados a uma suspensão de 100 µL de células quimiocompetentes pelo método descrito no Item 3.5.1. Após homogeneização cuidadosa do DNA nas células, o sistema foi incubado por 30 minutos em banho de gelo. Ao final do tempo de incubação, as células foram submetidas a choque térmico (90 s a 42 °C, 120 s no gelo) e recuperadas através de adição de 900 µL de meio SOC e incubação a 37 °C por 1 h. Após a recuperação aproximadamente 200 µL da suspensão foram plaqueados em meio LA contendo os respectivos antibióticos e indicadores para seleção de clones de cada transformação.

3.6 Conjugação bacteriana

3.6.1 Conjugação biparental

Os plasmídeos recombinantes a serem transferidos para as estirpes de *A. brasilense* foram primeiramente transformados em *E. coli* S17.1 (tra⁺). As estirpes de *A. brasilense* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas previamente até a saturação nos meios NFbHPN-lactato e LB, respectivamente, contendo os antibióticos para a seleção. No dia da

conjugação, 10 µL da cultura de *E. coli* saturada foram utilizados para inocular 2 mL de meio LB sem antibióticos e 100 µL da cultura de *A. brasilense* saturada foram utilizados para inocular 2 mL de meio NFbHPN-lactato sem antibióticos. As bactérias repicadas foram crescidas sob agitação durante 5 horas a 37°C e 30°C, respectivamente. Após o final do tempo de incubação foram feitas misturas das culturas de *E. coli* e *A. brasilense* em duas proporções distintas. Em uma placa contendo meios LA/NFbHPN-lactato em uma proporção 1:1, foram depositadas, em forma de gotas, misturas de 100 µL/2 µL e 50 µL/5 µL de *A. brasilense* e *E. coli*, respectivamente. Após incubação das placas a 30°C durante 20 horas, a massa de células foi coletada, ressuspensa em microtubos contendo 1 mL de meio NFbHPN-lactato e plaqueada em placas contendo meio NFbHPN sólido e os antibióticos adequados.

3.6.2 Conjugação triparental

As estirpes de *E. coli* TOP10 e HB101 contendo os plasmídeos mutagênico mobilizável e conjugativo (pRK600), respectivamente, foram crescidas previamente em meio LB a 37°C contendo os antibióticos de seleção. De forma análoga, as estirpes receptoras de *A. brasilense* foram cultivadas até a saturação em meio NFbHPN-lactato a 30°C. Após crescimento das estirpes, 10 µL da cultura de *E. coli* foram utilizados para inocular 10 mL de meio LB sem antibióticos e os seguintes volumes das culturas de *A. brasilense* foram utilizados para inocular 20 mL de meio NFbHPN-lactato sem antibióticos: 150, 300, 500 e 750 µL. Após aproximadamente 3 horas de crescimento da cultura de *E. coli* e 6 horas de crescimento das culturas de *A. brasilense*, estas foram misturadas em duas proporções distintas. Em uma placa contendo meios LA/NFbHPN-lactato em uma proporção 1:1, foram depositadas, em forma de gotas de aproximadamente 200 µL, misturas de 5 mL/2,5 mL/2,5 mL e 9 mL/0,5 mL/0,5 mL de *A. brasilense*, TOP10 e HB101, respectivamente, que foram previamente centrifugadas por 10 minutos a 5.000 rpm. Após incubação das placas a 30°C durante 20 horas, a massa de células foi coletada, ressuspensa em microtubos contendo 1 mL de meio NFbHPN-lactato e plaqueada em placas contendo meio NFbHPN-lactato sólido e os antibióticos adequados.

3.7 Estratégias de mutagênese dos genes *nifA* e *draT* de *Azospirillum brasilense*

A estratégia de mutagênese utilizada para deleção do gene *draT* e da porção N-terminal do gene *nifA* de *A. brasilense* residiu na amplificação das regiões localizadas à montante (UP) e à jusante (DOWN) das regiões alvo de deleção através da técnica de PCR, conforme descrito

no Item 3.4.2. A sequência utilizada para o planejamento dos oligonucleotídeos iniciadores empregados na mutagênese do gene *nifA* de *A. brasilense* encontra-se depositada no GenBank sob código de acesso X60714.1. A sequência do gene *draT* utilizada encontra-se depositada no mesmo banco de dados sob código de acesso M87319.1. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reações de amplificação encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações da PCR

Nome	Sequência (5'→3')	Sítio de restrição
<i>nifA</i> _UP_FOR	<u>GGATCCT</u> CCTCCGGCATAACCGTC	<i>Bam</i> HI
<i>nifA</i> _UP_REV	AAC <u>CATATG</u> CGACACCCCCTGCTCAA	<i>Nde</i> I
<i>nifA</i> _DOWN_FOR	CG <u>CATATG</u> TTCGCATGCAGAAGG	<i>Nde</i> I
<i>nifA</i> _DOWN_REV	CAGG <u>TTCGACG</u> TCCGGTCTTGATGGTC	<i>Sal</i> I
<i>draT</i> _UP_FOR	<u>GGATCCT</u> TGCCTCGTCTTGCGGT	<i>Bam</i> HI
<i>draT</i> _UP_REV	CCAG <u>GTTACCG</u> TCCGCCATCGC	<i>Kpn</i> I
<i>draT</i> _DOWN_FOR	GAC <u>GTTACCG</u> TGGGTGCCGCTCA	<i>Kpn</i> I
<i>draT</i> _DOWN_REV	GGG <u>TTCGACAT</u> CTCGGTGTCGTCG	<i>Sal</i> I

Para definir a melhor temperatura de anelamento dos *primers* foi realizada inicialmente uma reação de PCR contendo um gradiente de temperatura variando entre 52,3-71,6°C. Os parâmetros utilizados para amplificar as regiões de interesse, após definida a melhor temperatura de anelamento, foram: um ciclo de 4 minutos a 95°C; 30 ciclos incluindo uma etapa de 15 segundos a 94°C, outra de 15 segundos a 71,6°C e outra de 15 segundos a 72°C; e extensão final de 5 minutos a 72°C.

Os fragmentos resultantes da amplificação das regiões à montante e à jusante (entre 200 e 500 pb) da região codificadora dos genes, foram adicionados ao vetor pSUP202 empregado na mutagênese. A inserção dessas regiões teve como objetivo aumentar o grau de homologia entre o vetor construído e o genoma de *A. brasilense*, favorecendo, portanto, a recombinação homóloga necessária para a obtenção dos mutantes. Um marcador de seleção negativa, *sacB*, primeiramente descrito por Philippe Gay e colaboradores em 1983, também foi adicionado ao vetor mutagênico (“vetor suicida”), uma vez que possibilita o uso de uma pressão de seleção negativa para o isolamento de bactérias que tenham sofrido a deleção da região de interesse. O cassete contendo o gene *sacB*, isolado a partir do vetor pMH1701 (HYNES *et al.*, 1989), também inclui um gene de resistência à canamicina (*sacBKm*), o que permite a seleção de bactérias que tenham sofrido integração do plasmídeo em seu genoma.

Após a construção dos plasmídeos mutagênicos, estes foram transferidos para as estirpes FP2 e HM053 (MACHADO *et al.*, 1991) de *A. brasilense* pela técnica de conjugação biparental descrita no Item 3.6.1. A seleção de bactérias transconjugantes, isto é, que sofreram o primeiro evento de recombinação, foi feita utilizando as seguintes concentrações dos seguintes antibióticos: canamicina 200 µg/mL (resistência conferida pelo cassete *sacBKm*), cloranfenicol 30 µg/mL (marca de resistência do plasmídeo) e ácido nalidíxico 10 µg/mL (marca de resistência da bactéria). Neste momento, o plasmídeo integra-se ao genoma da bactéria através de recombinação homóloga entre o gene selvagem e o fragmento UP ou DOWN contido no plasmídeo.

A confirmação dos mutantes simples foi feita através de uma reação de PCR que resultou na detecção de duas cópias do gene alvo, sendo uma cópia selvagem e uma cópia deletada (inserida no vetor). Em seguida, as estirpes de *A. brasilense* contendo o plasmídeo foram cultivadas em meio NFbHPN-lactato líquido sem o antibiótico canamicina e repicadas por duas vezes. No último cultivo, 200 µL da cultura crescida foram plaqueados em meio NFbHPN-lactato sólido contendo 10% de sacarose. Nessa etapa é possível a seleção de colônias que sofreram o segundo evento de recombinação, o qual é caracterizado pela saída do plasmídeo do genoma carregando parte do gene a ser deletado. A expressão do gene *sacB* é letal em *A. brasilense*, já que, na presença de sacarose, resulta em um acúmulo de polímeros de frutose no espaço periplasmático, levando a lise das células (STEINMETZ *et al.*, 1983). A confirmação dos duplos mutantes foi feita em duas etapas. Na primeira, colônias crescidas na presença de sacarose foram testadas quanto à capacidade de crescer na presença de canamicina. Colônias sensíveis a esse antibiótico perderam o cassete *sacBKm* e são possíveis duplo recombinantes. Na segunda etapa, aquelas colônias sensíveis a canamicina identificadas na primeira etapa, foram submetidas à reação de PCR para confirmação da presença apenas da cópia deletada do gene.

3.8 Determinação de atividade da nitrogenase

Os ensaios para determinação de atividade da nitrogenase foram realizados pelo método de redução do acetileno a etileno, conforme descrito por Dilworth (1966) e Schollhorn e Burris (1967), e modificado por Klassen e colaboradores (1997). Para isso, as estirpes de *A. brasilense* de interesse foram inicialmente cultivadas em meio NFbHP contendo NH₄Cl 10 mM como fonte de nitrogênio na presença de antibióticos. Ao final do tempo de incubação foram utilizados 20-50 µL das culturas crescidas como inóculo em frascos contendo 4 mL de meio NFbHP semi-sólido (sem antibióticos) na presença de 0,5 mM de glutamato (condição de baixo

nitrogênio) ou 10 mM de NH_4Cl (condição de alto nitrogênio). Após cultivo a 30°C por cerca de 24 horas, os frascos foram vedados com rolhas de borracha (*suba-seal*) e injetados de acetileno gasoso com uma seringa (10% do volume da fase gasosa do frasco), sendo realizada uma nova incubação a 30°C por 1 hora. Em seguida, amostras de 500 μL da fase gasosa foram coletadas para análise do etileno formado por cromatografia em cromatógrafo Varian Star 3400 CX equipado com uma coluna de Porapak N e detector de ionização de chama. Para o cálculo de atividade específica da nitrogenase foi utilizado um padrão de etileno fornecido pela White Martins S.A. e, ao final da coleta das amostras gasosas dos frascos, estes foram vigorosamente homogeneizados para determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Bradford. A atividade da nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por minuto por miligrama de proteína na cultura.

3.9 Dosagem de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais de culturas foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976). Antes do início de cada ensaio de determinação da concentração de proteínas, foi feita uma curva padrão utilizando uma solução estoque de BSA (albumina sérica bovina) 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para isso foram usadas diversas concentrações da proteína padrão (0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ – 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e as leituras foram feitas em triplicata de amostra em placas de ELISA contendo 96 poços. Ao volume de 30 μL de cada amostra no poço de leitura foram adicionados 170 μL de reativo de Bradford e, em seguida, efetuada a leitura de absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. A curva padrão foi gerada plotando os valores de concentração de proteína na abscissa contra os valores encontrados para média das absorbâncias na ordenada.

Após a determinação da curva padrão de BSA foi feita a dosagem de proteínas totais de culturas de bactérias. Para isso, 50 μL do homogeneizado obtido após agitação vigorosa das culturas em frascos semi-sólidos, foram transferidos para placa de ELISA e adicionados de 50 μL de solução NaOH 0,2 M. Em seguida, a placa foi incubada a 37°C durante uma hora para lise e, assim como para a curva padrão, foram feitas triplicatas de amostras. Após o tempo de incubação, 30 μL do produto de lise foram transferidos para uma nova placa de ELISA e adicionados de 170 μL de reativo de Bradford. A leitura das amostras foi efetuada em espectrofotômetro a 595 nm e, partindo da média das absorbâncias encontradas em cada ponto, foi possível de determinação a concentração de proteínas totais das culturas utilizando a equação da reta gerada pela curva padrão de BSA.

3.10 Determinação da atividade específica da β -galactosidase

Para determinação da atividade específica de β -galactosidase, as estirpes de *A. brasilense* de interesse foram inicialmente conjugadas com o plasmídeo pEMS140 contendo a fusão *nifB::lacZ* utilizando a técnica de conjugação biparental descrita no Item 3.6.1. As estirpes conjugadas com o plasmídeo pEMS140 (triplicata de colônias) foram previamente crescidas em meio NFbHP líquido contendo NH_4Cl 10 mM na presença dos antibióticos tetraciclina e ácido nalidíxico. Ao final do período de crescimento, 50 μL de cada cultura foram utilizados para inocular 4 mL de meio NFbHP semi-sólido contendo glutamato 0,5 mM ou NH_4Cl 10 mM na ausência de antibióticos. Após o cultivo das bactérias a 30°C durante aproximadamente 24 horas, os frascos foram vedados com tampas de borracha (*suba-seal*) e agitados vigorosamente em vórtex para homogeneização das culturas.

Alíquotas de 100 μL das culturas homogeneizadas (duplicata) foram adicionadas em tubos de 2 mL contendo 900 μL de tampão Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 mM, KCl 10 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, β -mercaptoetanol 50 mM e SDS 0,0027%, pH 7,0). Em seguida, foram adicionados 25 μL de clorofórmio e os tubos foram agitados em vórtex durante 5 segundos. Como branco de reação foi preparado um tubo contendo 900 μL de tampão Z e 100 μL de meio NFb-lactato ao invés de cultura, e este foi utilizado para zerar o equipamento durante a leitura. Para equilibrar a temperatura, os tubos foram transferidos para banho-maria a 30°C por 10 minutos e, em seguida, o início da reação enzimática foi disparado pela adição de 200 μL do substrato ONPG (*o*-nitrofenil β -D-galactosídeo 4 mg/mL, preparado em tampão Z). Após a adição de ONPG no primeiro tubo, o tempo de reação foi cronometrado e a reação foi interrompida após aparecimento de uma coloração amarelada através da adição de 500 μL de Na_2CO_3 1 M. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 13.400 rpm durante 5 minutos para retirada dos “*debris*” celulares e 200 μL do sobrenadante foram utilizados para determinar a absorbância do cromóforo *o*-nitrofenol a 415 nm em triplicata de amostra.

Alíquotas de 50 μL das culturas homogeneizadas foram utilizadas para determinar a concentração de proteínas totais, conforme descrito no Item 3.9. A atividade específica de β -galactosidase foi dada em nmol de ONP produzido por minuto por miligrama de proteína da cultura.

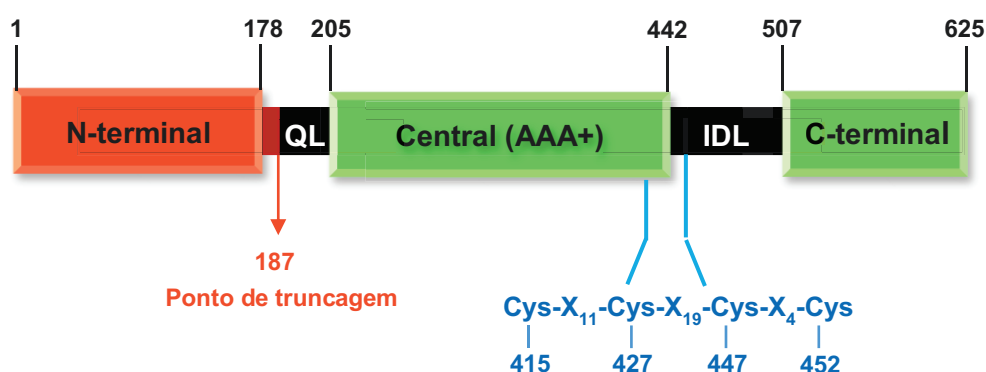
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção dos plasmídeos mutagênicos pTMA9 e pTMA10

Após a análise das regiões genômicas de interesse, planejamento e síntese dos oligonucleotídeos iniciadores, conforme descrito na Tabela 8, foram iniciadas as etapas de clonagem e subclonagem para construção dos plasmídeos mutagênicos contendo o gene *nifA* truncado na porção amino-terminal e o gene *draT* deletado. Para isso, os fragmentos resultantes da amplificação das regiões localizadas à montante (UP) e à jusante (DOWN) das regiões alvo de deleção (conforme descrito no Item 3.7) foram clonados individualmente no vetor pBluescript II KS (+) digerido com a enzima *EcoRV* (vetor *blunt*), gerando os plasmídeos pTMA1 e pTMA2 (Figura 8) ou pTMA3 e pTMA4 (Figura 9).

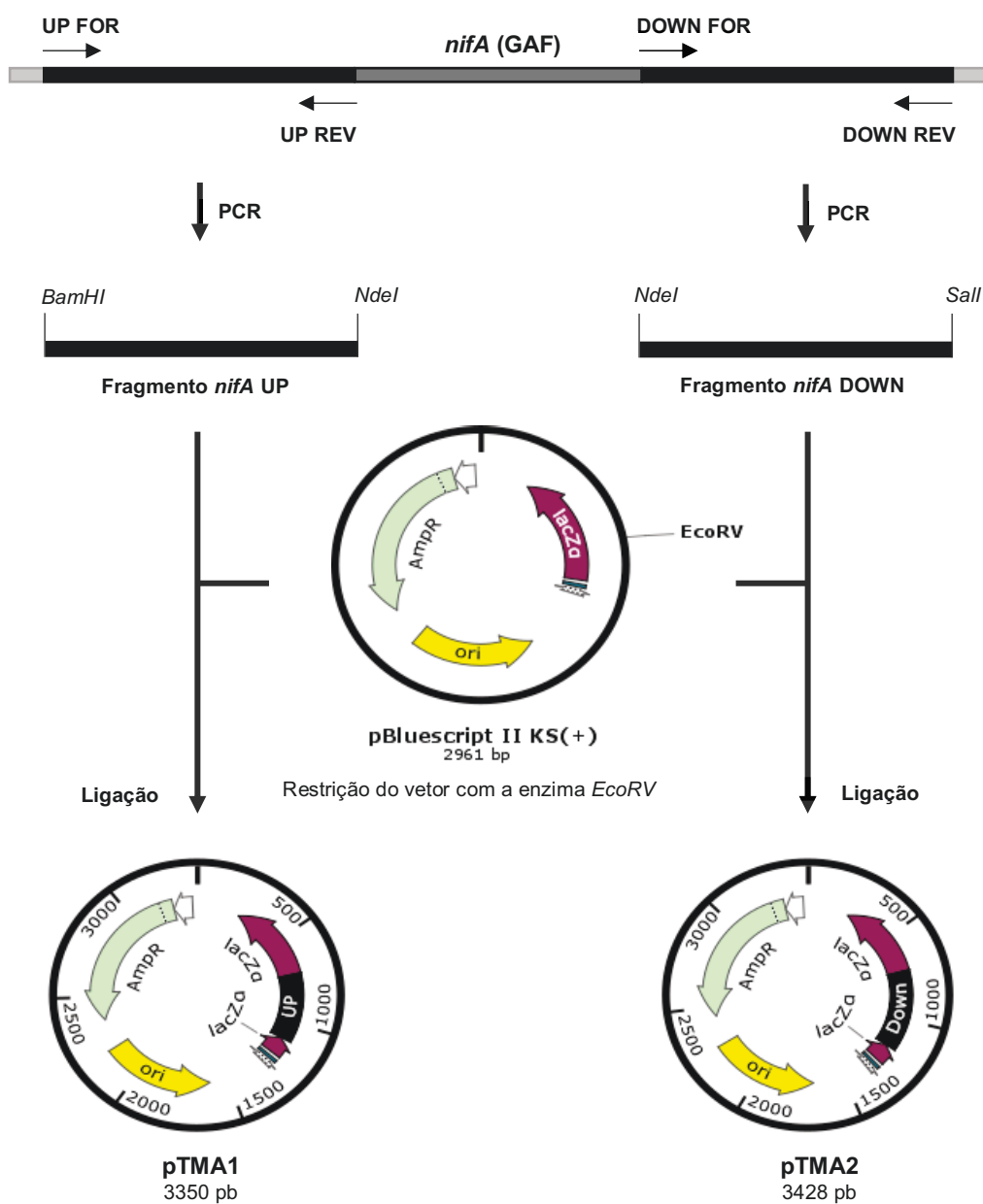
A estratégia de mutagênese do gene *nifA* de *A. brasilense* empregada visou a construção de uma proteína truncada entre os resíduos de aminoácidos 2-187 (Figura 7), os quais correspondem ao domínio N-terminal e aos primeiros aminoácidos da região de interdomínio QL, iniciando a tradução a partir do décimo resíduo do QL. O número de aminoácidos deletados referentes à porção *draT* do operon *draTG* de *A. brasilense* foi de 249.

Figura 7 – Modelo estrutural esquemático da porção deletada da proteína NifA de *A. brasilense*.



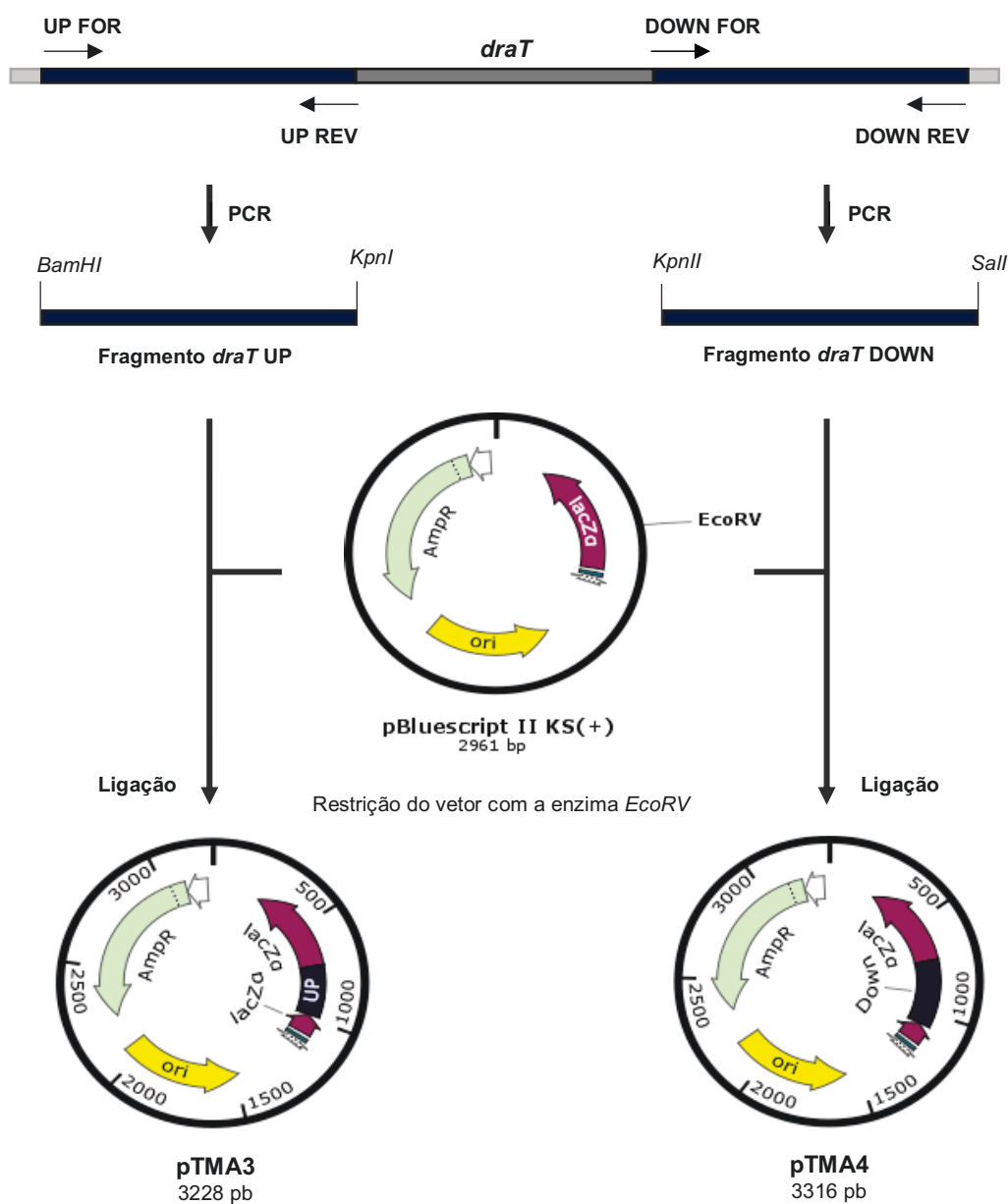
Em vermelho estão destacados o domínio amino-terminal e os aminoácidos iniciais da região de interdomínio QL que foram alvos de mutagênese. A deleção dessas regiões leva à construção de uma proteína NifA truncada entre os resíduos de aminoácidos 2-187. Em verde estão destacados os outros dois domínios funcionais não modificados (central e carboxi-terminal). Em azul estão indicadas as regiões conservadas de cisteínas. Os números em preto indicam a posição dos aminoácidos na proteína NifA.

Figura 8 – Esquema geral da região do gene *nifA* de *A. brasilense* utilizada para construção dos plasmídeos pTMA1 e pTMA2.



Em preto estão destacadas as regiões localizadas à montante e à jusante da porção N-terminal do gene *nifA* que foram amplificadas a partir do genoma da estirpe FP2 selvagem (derivada da estirpe Sp7) de *A. brasilense* e clonadas no vetor pBluescript II KS (+) linearizado *blunt* com a enzima *Eco*RV, originando os plasmídeos pTMA1 e pTMA2, respectivamente. A região destacada em cinza escuro corresponde à porção do gene a ser deletada. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos fragmentos estão representados por setas e os sítios de restrição de interesse no vetor e nos fragmentos estão indicados.

Figura 9 – Esquema geral da região do gene *draT* de *A. brasilense* utilizada para construção dos plasmídeos pTMA3 e pTMA4.



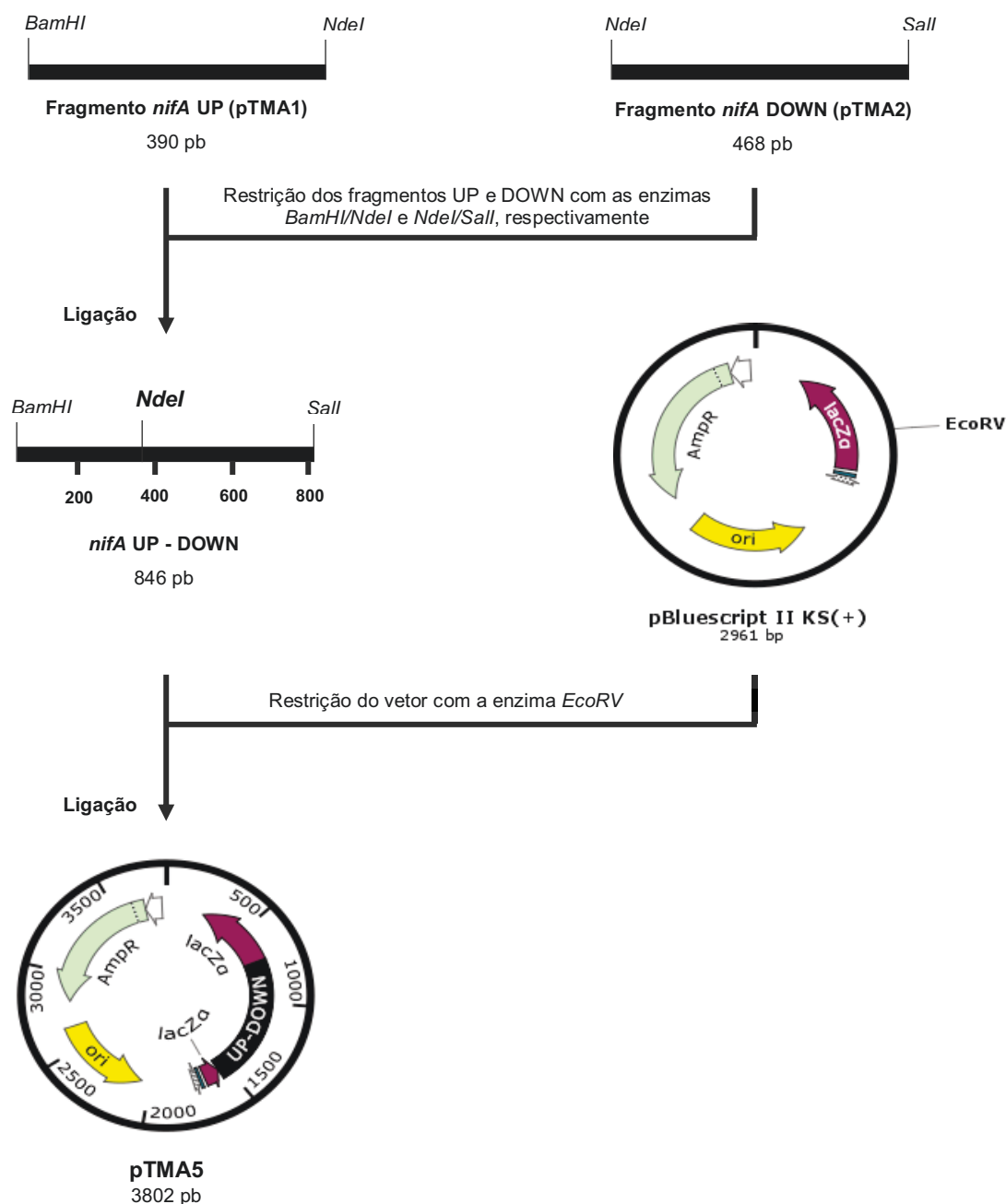
Em azul escuro estão destacadas as regiões localizadas à montante e à jusante do gene *draT* que foram amplificadas a partir do genoma da estirpe FP2 selvagem (derivada da estirpe Sp7) de *A. brasilense* e clonadas no vetor pBluescript II KS (+) linearizado *blunt* com a enzima *EcoRV*, originando os plasmídeos pTMA3 e pTMA4, respectivamente. A região destacada em cinza escuro corresponde ao gene a ser deletado. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos fragmentos estão representados por setas e os sítios de restrição de interesse no vetor e nos fragmentos estão indicados.

A confirmação das clonagens foi feita por meio de reações da restrição dos plasmídeos extraídos com as enzimas *PstI* e *HindIII* presentes no vetor pBluescript II KS (+), afim de verificar a liberação de inserto de tamanho esperado. A digestão dos plasmídeos pTMA1 e pTMA2 com essas enzimas deve liberar os insertos clonados de 390 e 468 pb, respectivamente, além da banda do vetor linearizado de aproximadamente 3 kb. Os fragmentos liberados pela digestão dos plasmídeos pTMA3 e pTMA4 com as enzimas *PstI* e *HindIII* devem possuir tamanhos de 268 e 356 pb, respectivamente.

Após a confirmação de clones por meio do padrão de restrição, estes foram submetidos à reação de sequenciamento, cujos produtos foram analisados por meio do programa Bioedit e da ferramenta ‘‘*Alignment*’’ do programa MEGA6, afim de identificar a presença dos sítios de restrição inseridos nos fragmentos através da amplificação com os *primers* mutagênicos (Tabela 8) e também para checar o aparecimento de possíveis mutações indesejáveis. Os plasmídeos extraídos a partir dos clones selecionados por sequenciamento foram digeridos com as enzimas de restrição *BamHI* e *NdeI* ou *NdeI* e *Sall*, afim de liberar os fragmentos UP e DOWN da porção N-terminal do gene *nifA*, respectivamente. De forma análoga, as enzimas *BamHI* e *KpnI* ou *KpnI* e *Sall* foram utilizadas para liberar os fragmentos UP e DOWN do gene *draT*, respectivamente.

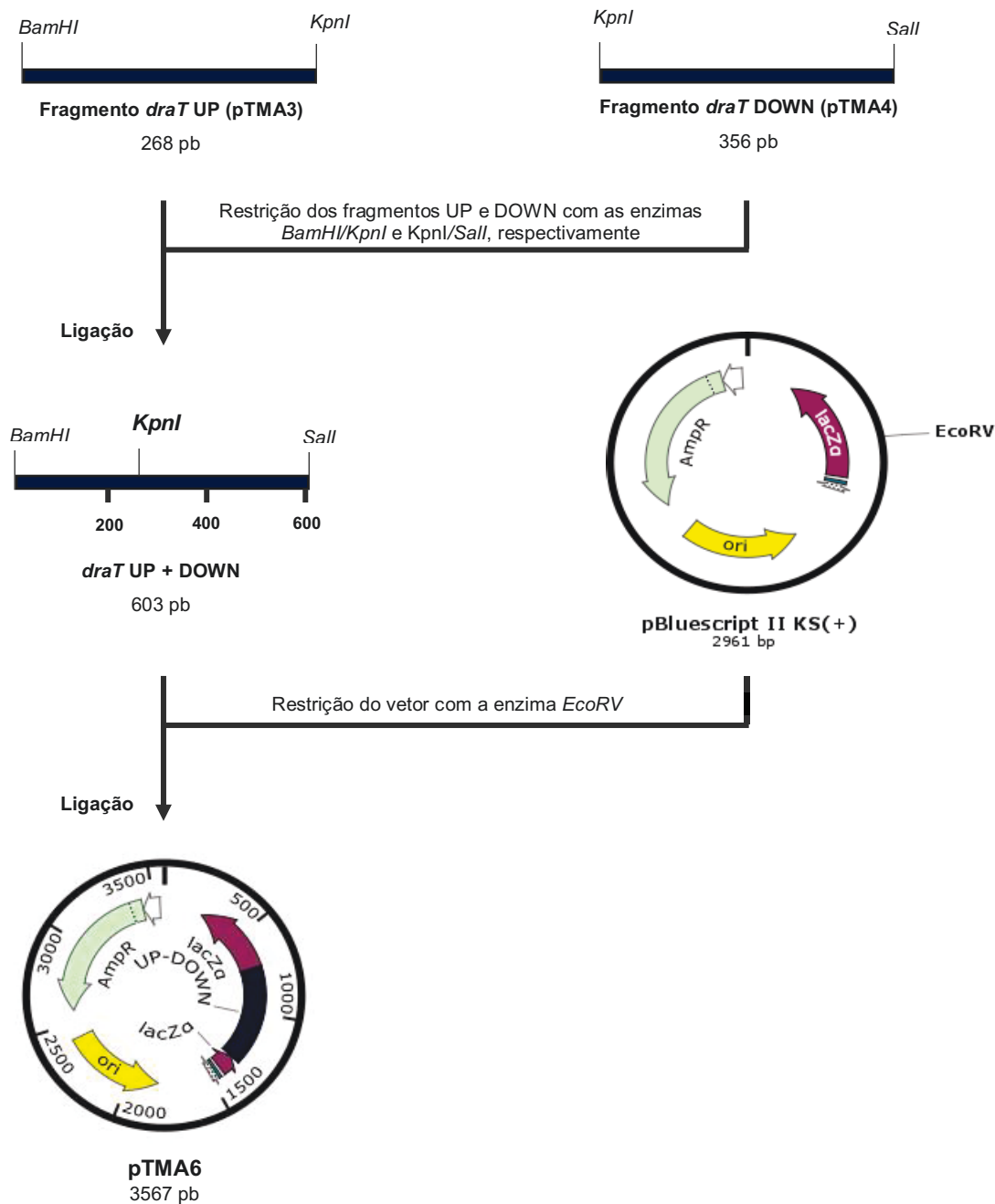
Os fragmentos UP e DOWN de cada gene foram purificados do gel utilizando *kit* comercial de extração (*AxyPrep DNA Gel Extraction Kit*) e então ligados, conforme ilustrado nas Figuras 10 e 11. Uma nova reação de PCR utilizando os *primers* externos *nifA* UP FOR/*nifA* DOWN REV ou *draT* UP FOR/*draT* DOWN REV foi feita, de modo a permitir a seleção e amplificação dos fragmentos ligados *nifA* UP-DOWN e *draT* UP-DOWN, respectivamente. Em seguida, estes foram clonados no vetor pBluescript II KS (+) digerido com a enzima *EcoRV* (vetor *blunt*) gerando os plasmídeos pTMA5 (Figura 10) e pTMA6 (Figura 11).

Figura 10 – Esquema geral de obtenção e clonagem do fragmento *nifA* UP-DOWN para construção do plasmídeo pTMA5.



Os plasmídeos contendo as regiões localizadas à montante (pTMA1) e à jusante (pTMA2) da porção N-terminal do gene *nifA* clonadas foram digeridos com as enzimas de restrição *BamHI/NdeI* e *NdeI/Sall*, respectivamente. Os fragmentos liberados foram ligados utilizando T4 DNA ligase e o fragmento *nifA* UP-DOWN de 846 pb resultante da ligação foi clonado no vetor pBluescript II KS (+) linearizado *blunt* com a enzima *EcoRV*, gerando o plasmídeo pTMA5.

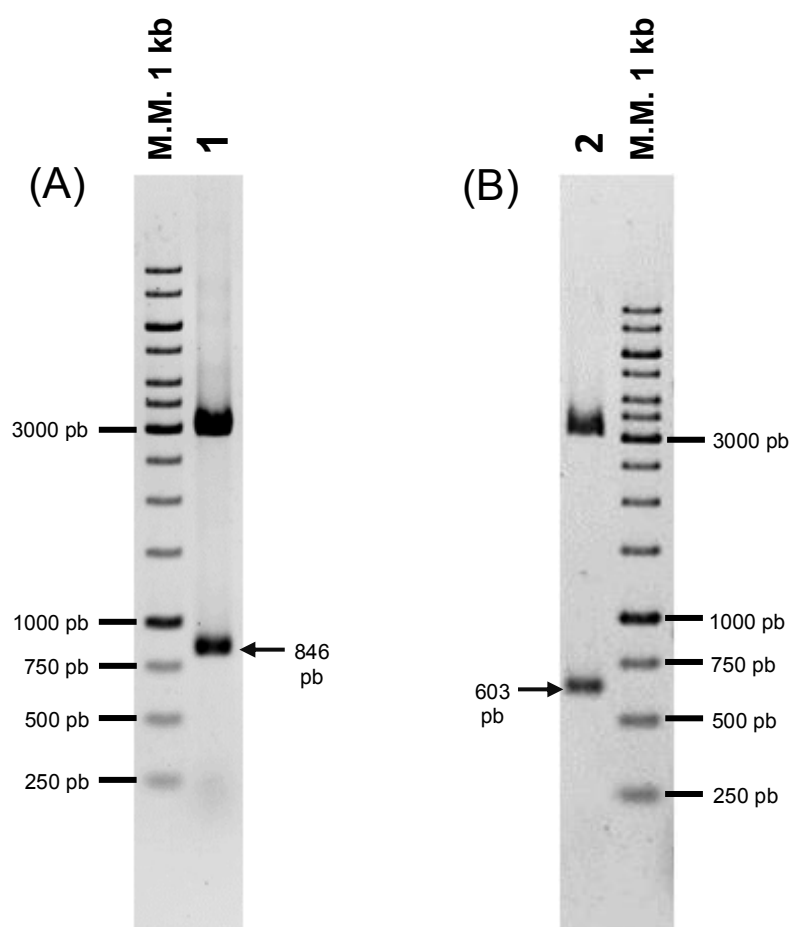
Figura 11 – Esquema geral de obtenção e clonagem do fragmento *draT* UP-DOWN para construção do plasmídeo pTMA6.



Os plasmídeos contendo as regiões localizadas à montante (pTMA3) e à jusante (pTMA4) do gene *draT* clonadas foram digeridos com as enzimas de restrição *BamHI/KpnI* e *KpnI/Sall*, respectivamente. Os fragmentos liberados a partir da digestão foram ligados utilizando T4 DNA ligase. O fragmento *draT* UP-DOWN de 603 pb resultante da ligação foi clonado no vetor pBluescript II KS (+) linearizado *blunt* com a enzima *EcoRV*, gerando o plasmídeo pTMA6.

A confirmação das clonagens foi feita por meio de digestão dos plasmídeos extraídos utilizando as enzimas *Bam*HI e *Sal*I, cujos sítios foram inseridos nos fragmentos clonados no vetor pBluescript II KS (+). A digestão dos plasmídeos pTMA5 e pTMA6 com essas enzimas deve liberar os insertos *nifA* UP-DOWN e *draT* UP-DOWN de tamanhos iguais a 846 e 603 pb, respectivamente, além da banda do vetor linearizado de aproximadamente 3 kb. O resultado da análise de restrição descrita acima para confirmação de clones está representada na Figura 12.

Figura 12 – Confirmação da construção dos plasmídeos pTMA5 e pTMA6.

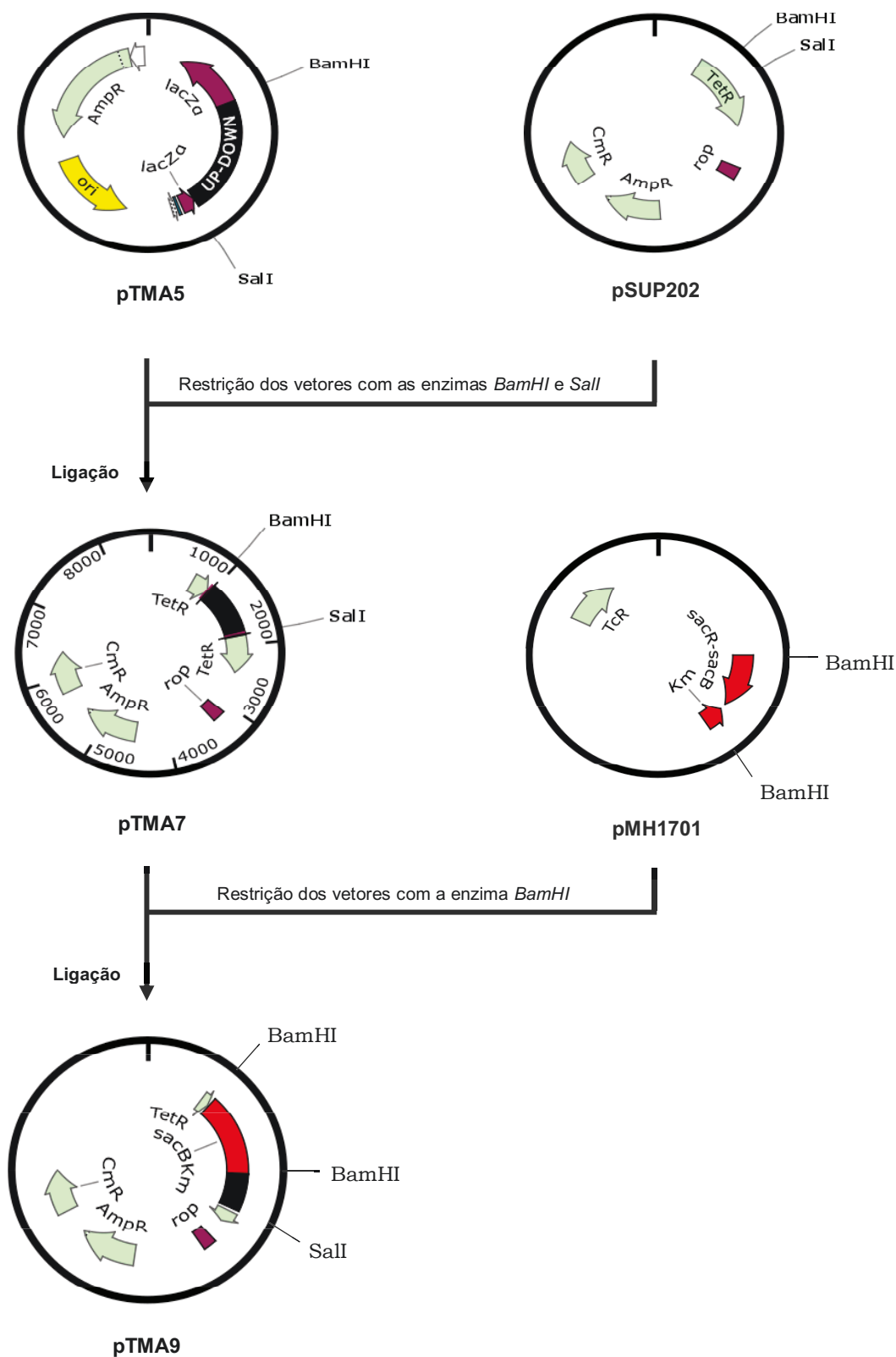


Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TAE 1X do produto da restrição dos plasmídeos pTMA5 (A) e pTMA6 (B) com as enzimas *Bam*HI e *Sal*I, afim de confirmar a clonagem dos fragmentos UP-DOWN dos genes *nifA* e *draT* no vetor pBluescript II KS (+), respectivamente. M.M.: marcador molecular (Fermentas); linha 1: plasmídeo pTMA5; linha 2: plasmídeo pTMA6.

Após a confirmação da integridade dos fragmentos clonados em pBluescript II KS (+) por análise de restrição e sequenciamento, estes foram subclonados no plasmídeo pSUP202 digerido com as enzimas *BamHI* e *Sall*, gerando os plasmídeos pTMA7 (Figura 13) e pTMA8. Uma vez que estes sítios encontram-se em uma região do vetor pSUP202 que contém o gene que confere resistência à tetraciclina (Tc^{10}), colônias transformadas com plasmídeo recombinante nesses sítios não apresentam resistência a este antibiótico e puderam ser selecionadas. Por fim, o plasmídeo pMH1701 foi digerido com a enzima de restrição *BamHI*, de modo a liberar o fragmento de DNA *sacBKm*. Este fragmento foi então ligado aos plasmídeos pTMA7 e pTMA8 digeridos com a mesma enzima, originando os plasmídeos mutagênicos pTMA9 (Figura 13) e pTMA10, respectivamente.

A confirmação da identidade dos plasmídeos pTMA9 e pTMA10 foi feita por meio da restrição dos mesmos com as enzimas *BamHI* e *Sall*. Os fragmentos liberados correspondem ao vetor pSUP202 linearizado (cerca de 7,8 kb), ao fragmento *sacBKm* (cerca de 4,0 kb) e às regiões UP-DOWN de *nifA* (846 pb) (Figura 14A) ou *draT* (603 pb) (Figura 14B). Em seguida, foi iniciada a etapa de conjugação dos plasmídeos para as estirpes FP2 e HM053 (excretora de amônio) (MACHADO *et al.*, 1991) de *A. brasilense*, conforme descrito no Item 3.6.

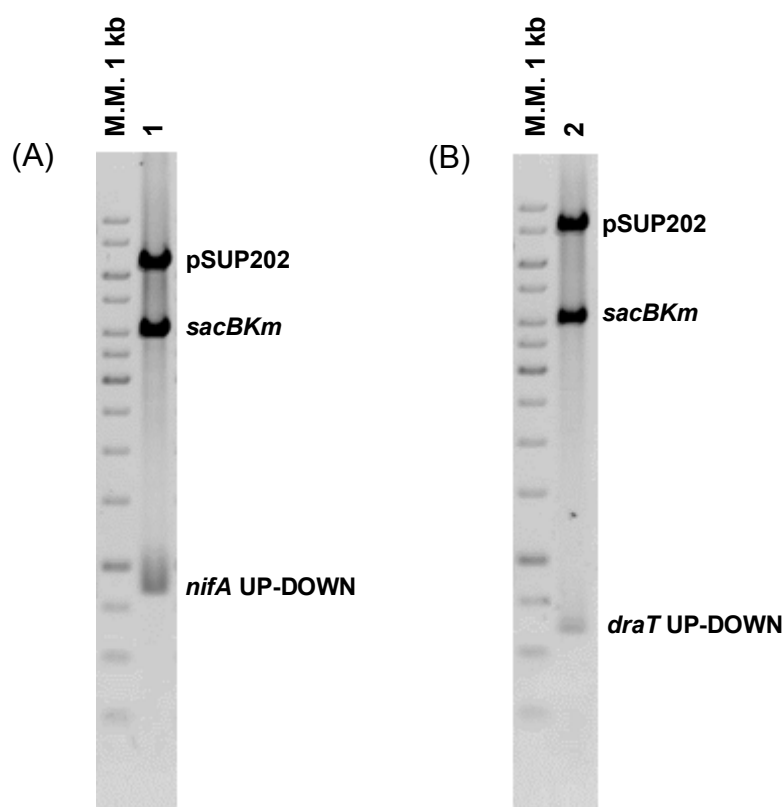
Figura 13 – Esquema geral de construção do plasmídeo pTMA9.



O fragmento *nifA* UP-DOWN obtido a partir da digestão do plasmídeo pTMA5 com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sal*I foi subclonado no vetor pSUP202 digerido com as mesmas enzimas, originando o plasmídeo pTMA7. Em seguida, o plasmídeo pMH1701 foi

digerido com a enzima *Bam*HI, afim de liberar o cassete de DNA *sacBKm*, que por sua vez foi ligado ao vetor pTMA7 linearizado com a mesma enzima. O plasmídeo resultante, pTMA9, foi utilizado para construção do mutante. O plasmídeo pTMA10 foi obtido de forma análoga.

Figura 14 – Confirmação da construção dos plasmídeos pTMA9 e pTMA10.



Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TAE 1X do produto da restrição dos plasmídeos pTMA9 (A) e pTMA10 (B) com as enzimas *Bam*HI e *Sall*, afim de confirmar a identidade dos plasmídeos construídos. M.M.: marcador molecular (Fermentas); linha 1: plasmídeo pTMA9; linha 2: plasmídeo pTMA10.

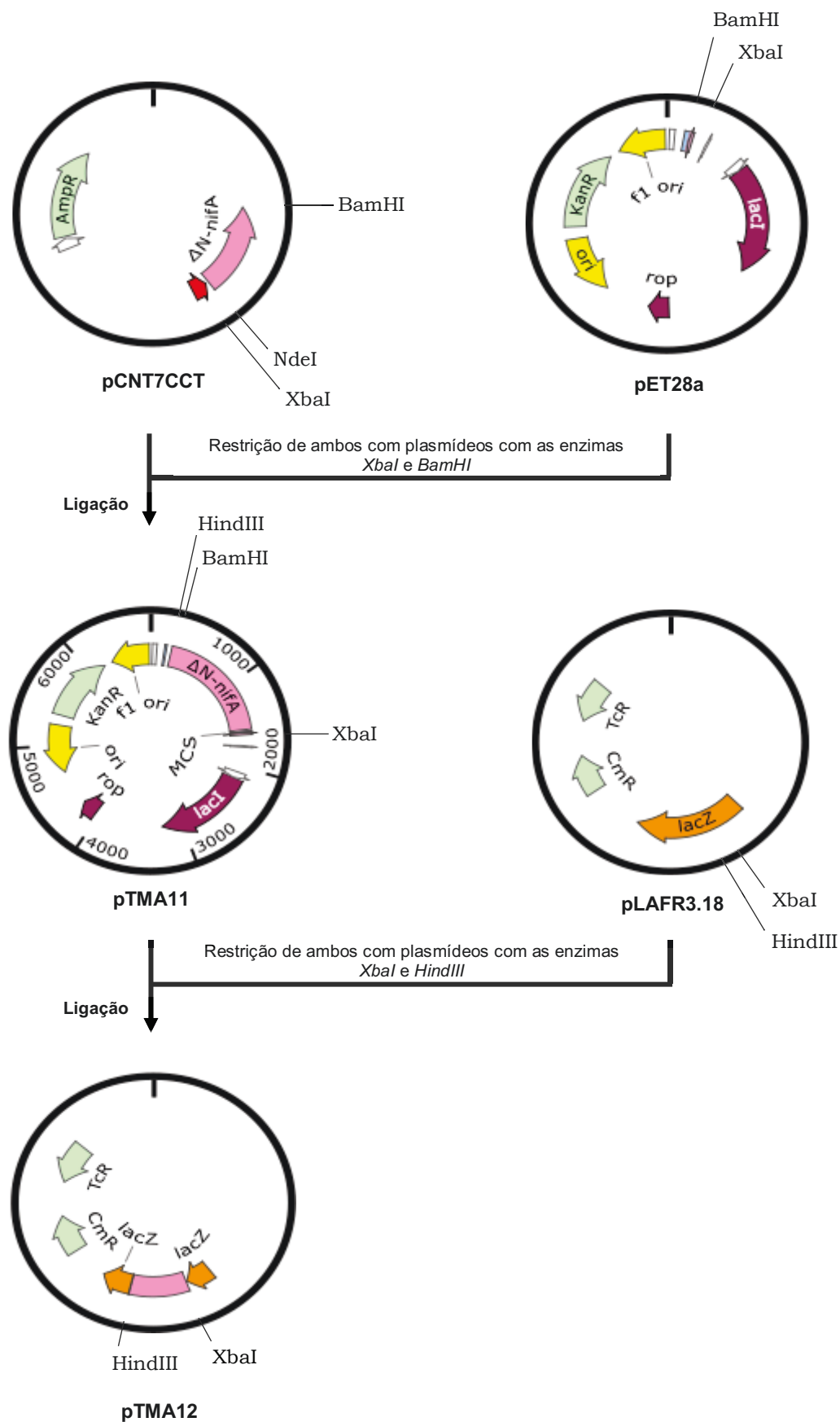
4.2 Obtenção dos plasmídeos de complementação pTMA12 e pTMA13

Para os ensaios de complementação das estirpes mutantes de *A. brasilense* contendo o gene *nifA* truncado na região 5' construídas neste trabalho, foram construídos dois plasmídeos: o primeiro contendo o gene *nifA* de *A. brasilense* (FP2) completo e outro contendo o mesmo gene N-truncado em uma outra posição (sem os primeiros 201 aminoácidos), ambos clonados no plasmídeo pLAFR3.18. Este plasmídeo foi escolhido por apresentar estabilidade em *A.*

brasiliense. Primeiramente, o plasmídeo pCNT7CCT (NISHIKAWA, 2010) contendo o gene *nifA* já deletado em seu domínio N-terminal e sem a maior parte da região de interdomínio QL, foi digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *BamHI* e o fragmento obtido de aproximadamente 1,3 kb foi subclonado no vetor pET28a digerido com as mesmas enzimas, originando o plasmídeo pTMA11. Após confirmação da clonagem por meio do padrão de restrição esperado, o plasmídeo pTMA11 foi digerido com as enzimas *XbaI* e *HindIII*, e o produto da digestão foi subclonado no plasmídeo pLAFR3.18 digerido com as mesmas enzimas, originando o plasmídeo pTMA12 (Figura 15).

O plasmídeo pLAnifApET (ARAÚJO, 2008) contendo o gene *nifA* inteiro de *A. brasilense* já clonado em pET28a, foi digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII*, e o fragmento resultante da restrição foi subclonado no plasmídeo pLAFR3.18 digerido com as mesmas enzimas, originando o plasmídeo pTMA13 (Figura 16). Após a confirmação da identidade dos novos plasmídeos pTMA12 e pTMA13 construídos por análise de restrição com as enzimas *XbaI/HindIII* utilizadas para clonagem, estes foram transferidos para as estirpes *A. brasilense* de interesse pelo método de conjugação biparental descrito no Item 3.6.1.

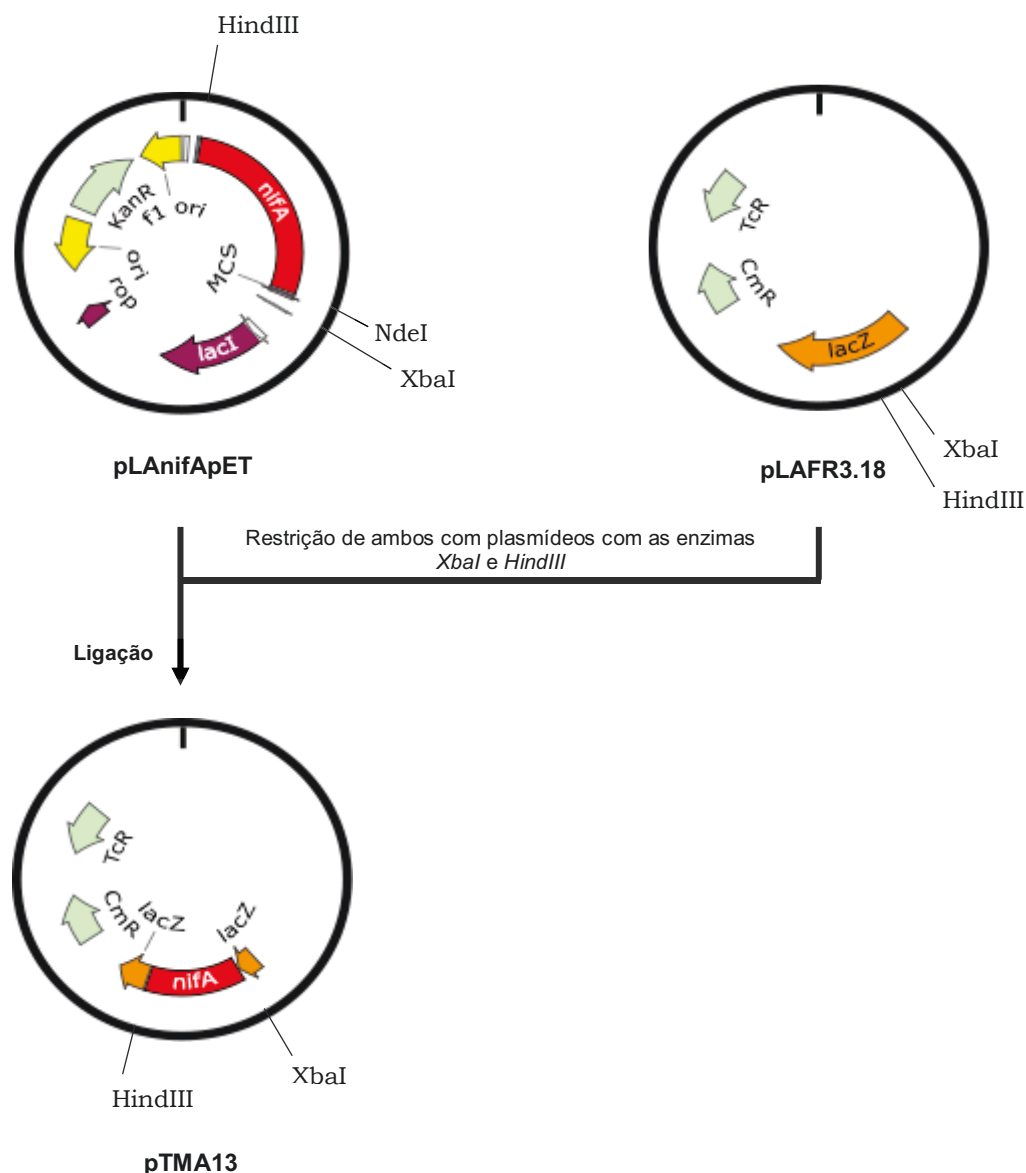
Figura 15 – Esquema geral de construção do plasmídeo pTMA12.



O plasmídeo PCNT7CCT (NISHIWAKA, 2010) contendo o gene *nifA* N-truncado (deleção dos primeiros 603 nucleotídeos) foi cortado com as enzimas de restrição *XbaI* e

*Bam*HI, e o fragmento de aproximadamente 1,3 kb liberado foi ligado ao vetor pET28a também cortado com essas enzimas, originando o plasmídeo pTMA11. Este último, por sua vez, foi cortado com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III e o produto da digestão ligado ao vetor pLAFR3.18 digerido com as mesmas enzimas, gerando o plasmídeo pTMA12. Este plasmídeo possuía o gene *nifA* de *A. brasilense* N-truncado sob controle do promotor *lacZ*.

Figura 16 – Esquema geral de construção do plasmídeo pTMA13.



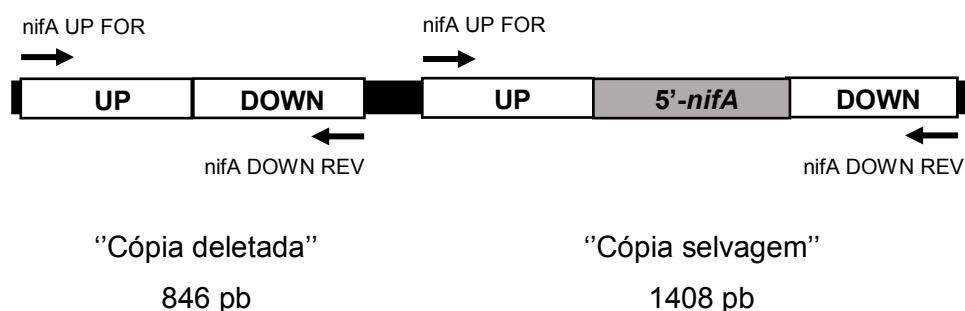
O plasmídeo pLANifApET (ARAÚJO, 2008) contendo o gene *nifA* inteiro clonado em pET28a foi cortado com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III, e o fragmento liberado foi ligado ao vetor pLAFR3.18 cortado com as mesmas enzimas. O plasmídeo originado foi denominado pTMA13 e possuía o gene *nifA* de *A. brasilense*, sob controle do promotor *lacZ*.

4.3 Construção de estirpes mutantes de *A. brasilense* truncadas na região 5' do gene *nifA*

Visando a construção de estirpes de *A. brasilense* capazes de fixar nitrogênio constitutivamente, foi realizada a deleção cromossomal da porção amino-terminal da proteína NifA responsável pela regulação a nível transcricional da fixação biológica de nitrogênio em resposta aos níveis de íons amônio via GlnB. Para isso, o plasmídeo mutagênico pTMA9 (pSUP- Δ N-*nifA*-*sacB*) foi transformado na estirpe S17.1 de *E. coli*, conforme descrito no Item 3.5. Após a transformação, uma colônia isolada foi usada para a conjugação do plasmídeo para as estirpes receptoras FP2 (selvagem) e HM053 (excretora de amônio) (MACHADO *et al.*, 1991) de *A. brasilense*, conforme método descrito no Item 3.6.1.

Os possíveis transconjugantes resistentes aos antibióticos canamicina 200 μ g/mL e cloranfenicol 30 μ g/mL foram analisados quanto a ocorrência do primeiro evento de recombinação homóloga, onde o plasmídeo é integrado ao genoma da bactéria. Para a confirmação dos mutantes simples foi feita uma reação de PCR utilizando os *primers* externos *nifA* UP FOR/*nifA* DOWN REV, afim de identificar a presença da cópia deletada do gene correspondente aos fragmentos UP-DOWN ligados, além da cópia selvagem (Figura 17).

Figura 17 – Esquema da estratégia empregada para confirmação de mutantes simples.

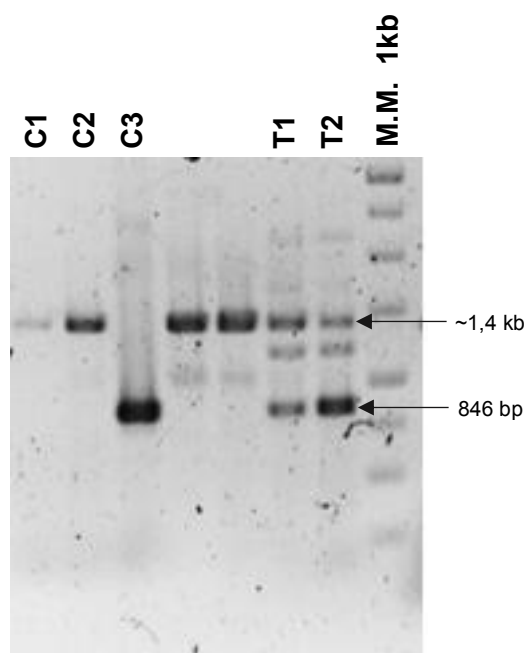


A confirmação de transconjugantes de *A. brasilense* contendo a cópia deletada da região 5' do gene *nifA* foi feita por meio de reação de PCR utilizando os *primers* *nifA* UP FOR/*nifA* DOWN REV. A seleção de bactérias que possuíam o plasmídeo mutagênico integrado em seu genoma foi feita por meio da detecção da presença de duas cópias da região gênica alvo de deleção: selvagem e deletada.

Após a reação de PCR para confirmação de mutantes simples, foi possível identificar uma colônia da estirpe FP2 e uma colônia da estirpe HM053 contendo as cópias selvagem (1408 pb) e deletada (846 pb) da porção N-terminal do gene *nifA* (Figura 18). As colônias

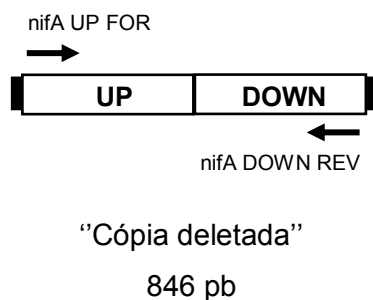
transconjugantes confirmadas por PCR foram então submetidas ao segundo evento de recombinação homóloga, conforme descrito no Item 3.7. Colônias capazes de crescer em meio contendo sacarose 10% e que apresentaram sensibilidade ao antibiótico canamicina, foram submetidas à reação de PCR utilizando os mesmos *primers* empregados anteriormente (*nifA* UP FOR/*nifA* DOWN REV) para confirmar a deleção da região alvo do gene (Figura 19).

Figura 18 – Confirmação de mutantes simples da região 5' do gene *nifA* de *A. brasilense*.



Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TAE 1X do produto de PCR para confirmação de mutantes simples das estirpes FP2 e HM053 contendo o plasmídeo pTMA9. M.M.: marcador molecular (Fermentas); C1: controle da amplificação da região 5' do gene *nifA* da estirpe FP2 (cópia selvagem); C2: controle da amplificação da região 5' do gene *nifA* da estirpe HM053 (cópia selvagem); C3: controle da amplificação do fragmento *nifA* UP-DOWN a partir do plasmídeo pTMA9 (cópia deletada); T1: colônia transconjugante da estirpe FP2 contendo as cópias selvagem (1408 pb) e deletada (846 pb) da porção N-terminal do gene *nifA*; T2: colônia transconjugante da estirpe HM053 contendo as cópias selvagem (1408 pb) e deletada (846 pb) da porção N-terminal do gene *nifA*.

Figura 19 – Esquema da estratégia empregada para confirmação de duplo mutantes.

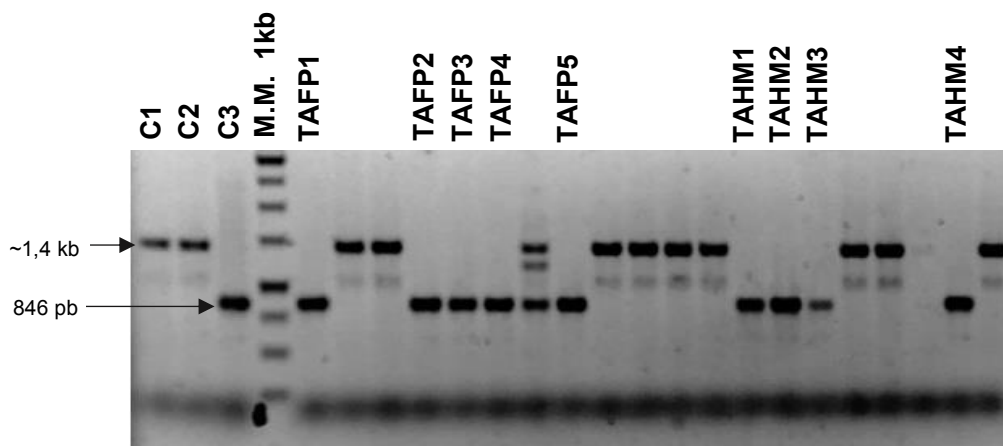


A confirmação de duplo mutantes de *A. brasilense* contendo a deleção da região 5' do gene *nifA* foi feita por meio de reação de PCR utilizando os primers *nifA* UP FOR/*nifA* DOWN REV. A seleção de novas bactérias mutantes que sofreram o segundo evento de recombinação homóloga foi feita por meio da detecção da presença somente da cópia deletada da região alvo no genoma.

Após a reação de PCR para confirmação de duplo mutantes foi possível identificar dez colônias da estirpe FP2 e 8 colônias da estirpe HM053 contendo somente a cópia deletada da porção N-terminal do gene *nifA* de 846 pb. A frequência obtida para construção da estirpe mutante em relação à reversão para o genótipo selvagem durante o segundo evento de recombinação homóloga foi de aproximadamente 50%. A Figura 20 mostra o resultado da confirmação da deleção da região 5' do gene *nifA* para as estirpes FP2 e HM053 de *A. brasilense*.

Duas colônias confirmadas por PCR para cada uma das novas estirpes mutantes construídas foram analisadas por reação de sequenciamento (conforme descrito no Item 3.4.5) para verificar a correta deleção da porção amino-terminal do gene *nifA*. Como *templates* foram utilizados os produtos de amplificação ilustrados na Figura 20 e os *primers* foram os mesmos empregados anteriormente (*nifA* UP FOR/*nifA* DOWN REV). As sequências obtidas foram então submetidas a um alinhamento local utilizando o algoritmo *blastx* do NCBI. O resultado da análise produziu um alinhamento entre a sequência experimental obtida a partir do sequenciamento e a sequência da proteína NifA (ativador transcricional específico dos genes *nif*) de *Azospirillum brasilense* (Sp7) depositada em banco de dados, com 100% de identidade. Após confirmação de identidade, as novas estirpes mutantes, denominadas TAFP (FP2 Δ N-*nifA*) e TAHM (HM053 Δ N-*nifA*), foram submetidas aos ensaios de caracterização fisiológica.

Figura 20 – Confirmação de mutantes duplos contendo o gene *nifA* de *A. brasilense* truncado na região 5’.



Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TAE 1X do produto de PCR para confirmação de mutantes duplos das estirpes FP2 e HM053 de *A. brasilense* contendo o gene *nifA* truncado na porção N-terminal. M.M.: marcador molecular (Fermentas); C1: controle da amplificação da região 5’ do gene *nifA* da estirpe FP2 (cópia selvagem); C2: controle da amplificação da região 5’ do gene *nifA* da estirpe HM053 (cópia selvagem); C3: controle da amplificação do fragmento *nifA* UP-DOWN a partir do plasmídeo pTMA9 (cópia deletada); TAFP1, TAFP2, TAFP3, TAFP4 e TAFP5: mutantes duplos da estirpe FP2 contendo somente a cópia deletada da porção N-terminal do gene *nifA*; TAHM1, TAHM2, TAHM3 e TAHM4: mutantes duplos da estirpe HM053 contendo somente a cópia deletada da porção N-terminal do gene *nifA*.

4.4 Construção de estirpes mutantes de *A. brasilense* deletadas no gene *draT*

A proposta de construir estirpes de *A. brasilense* capazes de fixar nitrogênio constitutivamente e excretar amônio reside em relaxar os pontos de regulação transcricional dos genes *nif* pela deleção do domínio N-terminal regulatório de NifA, e também pela deleção do gene *draT* que codifica para a enzima dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase, a qual é responsável pelo controle pós-traducional da nitrogenase via ADP-ribosilação em condições de alto amônio. Visando a caracterização do fenótipo da deleção do gene *draT* em *A. brasilense*, o plasmídeo mutagênico pTMA10 (pSUP- Δ *draT*-*sacB*) construído foi transformado na cepa S17.1 doadora de *E. coli*, conforme descrito no Item 3.5 e, após a transformação, foram iniciadas as tentativas de conjugação do plasmídeo para as estirpes receptoras FP2 e HM053 de *A. brasilense*.

Como tentativa inicial de transferência do plasmídeo foi utilizado o protocolo de conjugação biparental descrito no Item 3.6.1. Após 5 dias de incubação das placas em estufa a 30°C não foi observado o aparecimento de colônias transconjugantes de *A. brasilense*. O experimento foi então repetido algumas vezes, entretanto, os resultados foram semelhantes. Com base nisto, foram feitas diversas modificações no protocolo, de modo a aumentar a eficiência da conjugação bacteriana. A primeira delas foi testar diferentes estágios de crescimento (D.O.s) das culturas, as quais ainda foram misturadas em diferentes proporções, visando encontrar a proporção ideal entre células doadoras e receptoras. Também foram utilizados volumes de culturas maiores e misturados em diferentes proporções (chegando ao volume final de 50 mL após mistura) como tentativa de aumentar a eficiência de transferência do plasmídeo. Além disso, foram testados vários períodos de incubação da gota de conjugação, variando de 20 a 48 horas. O método de conjugação triparental baseado na utilização de uma estirpe “*helper*” (Item 3.6.2) que auxilia na transferência do plasmídeo da estirpe doadora para a receptora, também foi uma das técnicas empregadas na tentativa de obter estirpes de *A. brasilense* transconjugantes contendo a cópia deletada do gene *draT*. Em nenhuma das tentativas de inserção do plasmídeo mutagênico no genoma das bactérias foi obtido êxito, dessa forma, não foi possível construir estirpes mutantes de *A. brasilense* deletadas no gene *draT*.

A ausência de recombinação homóloga entre o gene *draT* deletado contido no plasmídeo mutagênico e o gene *draT* selvagem no genoma da bactéria pode ser resultante de uma possível baixa frequência de recombinação, provavelmente por se tratar de uma região de difícil recombinação homóloga. Uma alternativa seria aumentar a expressão de enzimas envolvidas na maquinaria de recombinação homóloga, como a proteína de papel central RecA, que leva à troca de fitas entre DNAs homólogos, e também das proteínas do complexo RecBCD, que possuem atividades nucleásica, ATPase e de helicase.

Colônias transconjugantes contendo o gene *draT* deletado podem também não ter sido obtidas devido à inviabilidade da deleção deste gene para a bactéria, isto é, um possível favorecimento da expressão da forma deletada do gene em relação à forma selvagem pode ser letal para as estirpes testadas de *A. brasilense*. Neste caso, portanto, a construção da estirpe mutante não é favorecida.

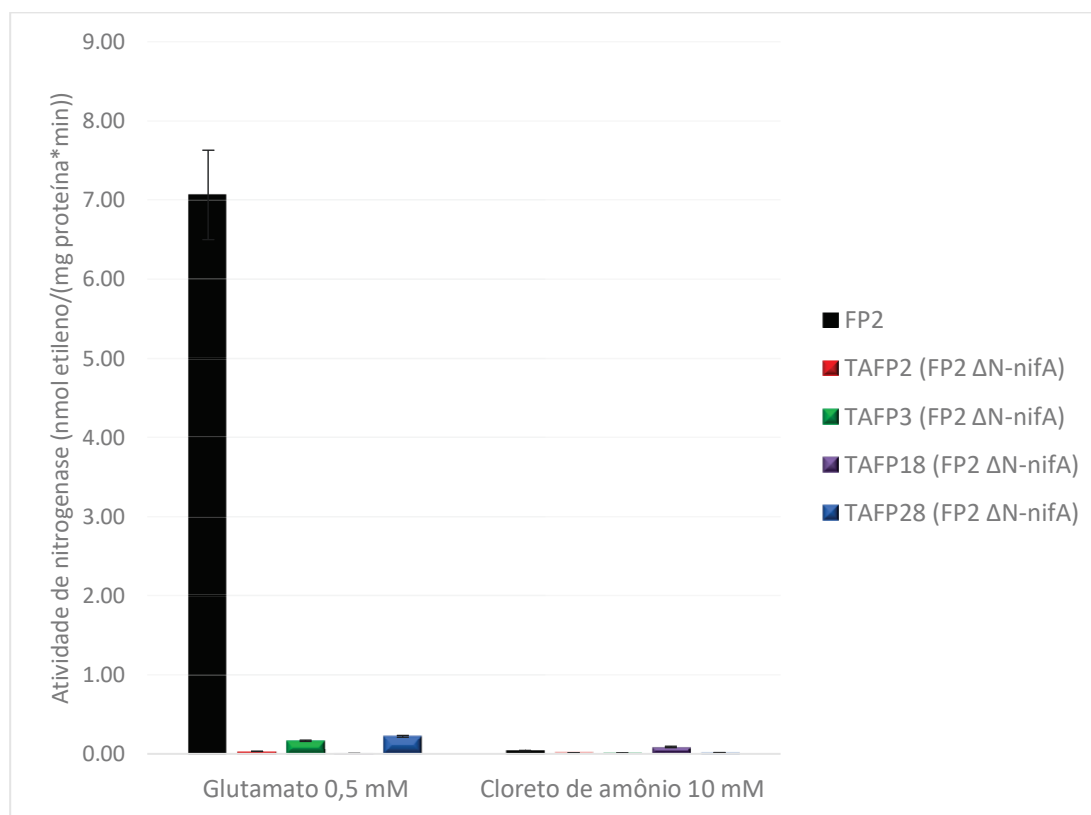
4.5 Determinação de atividade da nitrogenase das estirpes mutantes na porção amino-terminal do gene *nifA* de *A. brasilense*

Para verificar se a mutação na porção N-terminal do gene *nifA* afetaria a regulação transcricional da fixação biológica de nitrogênio em resposta à disponibilidade de íons amônio, ensaios de determinação de atividade da nitrogenase foram conduzidos utilizando o método de redução do acetileno a etileno, conforme descrito no Item 3.8. A atividade de nitrogenase das estirpes mutantes TAFP (FP2 Δ N-*nifA*) e TAHM (HM053 Δ N-*nifA*) de *A. brasilense* foi determinada e comparada com as estirpes parentais FP2 e HM053, respectivamente. No ensaio inicial foram testadas duas condições: baixo (0,5 mM de glutamato) e alto amônio (10 mM de NH₄Cl). Os resultados obtidos para atividade de nitrogenase encontram-se nas Figura 21 e 22.

Os resultados encontrados mostraram que a deleção cromossomal do domínio GAF da proteína NifA produz estirpes de *A. brasilense* incapazes de fixar nitrogênio, mesmo em baixos níveis de amônio. Em comparação com suas respectivas estirpes selvagens, que apresentaram atividade de redução de acetileno a etileno, tanto os isolados de TAFP (Figura 21) quanto os isolados de TAHM (Figura 22) apresentaram perda quase que total da capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, o que sugere que a porção deletada do domínio amino-terminal de NifA é importante para a estabilidade ou conformação ativa da proteína em *A. brasilense*.

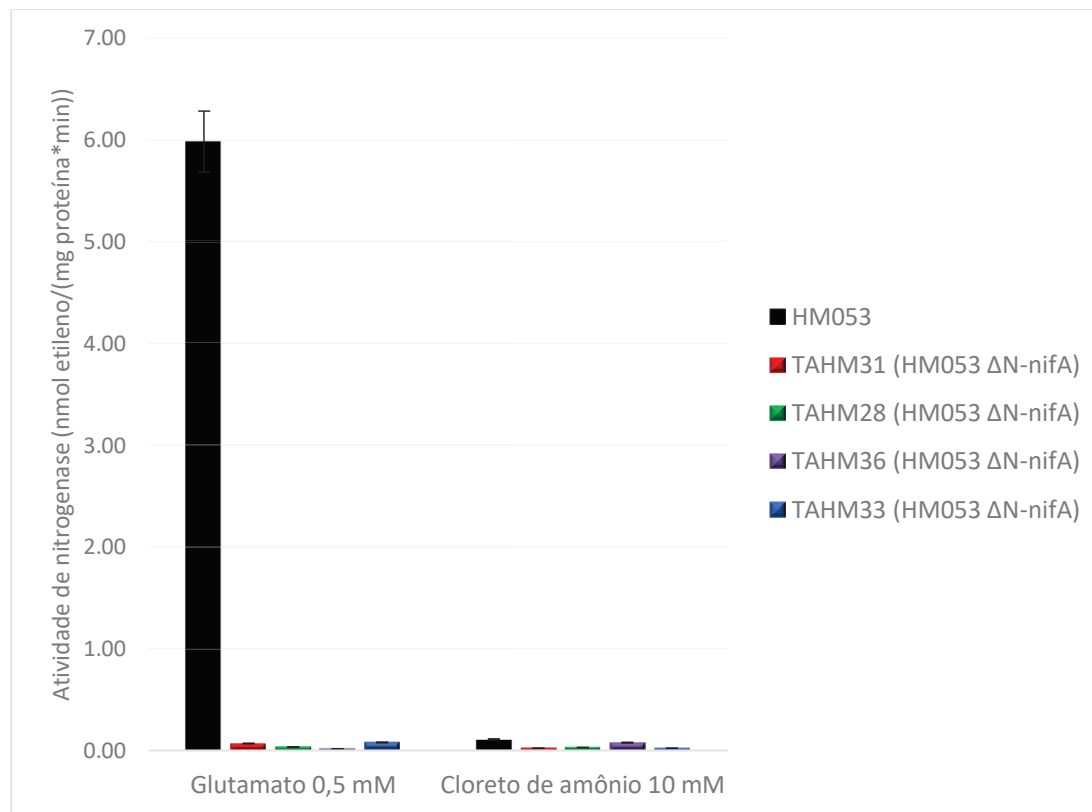
Visando confirmar a hipótese de que a deleção cromossomal da região N-terminal de NifA gera uma proteína sem atividade, a expressão do gene *nifB* nas estirpes mutantes de *A. brasilense* foi determinada utilizando-se a fusão transcricional *nifB::lacZ*. Uma vez que a expressão dos genes estruturais *nifHDK* da nitrogenase, bem como do gene *nifB*, está sob controle da proteína NifA, a expressão do gene repórter *lacZ* devido à ativação do promotor *nifB* pode ser tomada como medida da atividade da proteína NifA.

Figura 21 – Determinação de atividade da nitrogenase da estirpe mutante TAFP contendo deleção da região 5' do gene *nifA*.



Quatro isolados da estirpe mutante TAFP contendo deleção da região 5' do gene *nifA* foram submetidos ao ensaio de nitrogenase. A estirpe parental FP2 de *A. brasilense* foi adicionada como controle experimental. Os ensaios foram realizados em meio NFbHP-lactato semi-sólido contendo 0,5 mM de glutamato (condição de baixo amônio) ou 10 mM de NH₄Cl (condição de alto amônio). Após a formação de película no meio (aproximadamente 24 horas), os frascos foram vedados e injetados de acetileno com um volume correspondente a 10% da fase gasosa. Após incubação por 2 horas a 30°C, 0,5 mL da fase gasosa coletada dos frascos foi analisada em cromatógrafo gasoso. A atividade de nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por miligrama de proteína da cultura por minuto. No gráfico estão indicados os desvios padrão em torno da média de um experimento representativo realizado em duplicata.

Figura 22 – Determinação de atividade da nitrogenase da estirpe mutante TAHM contendo deleção da região 5' do gene *nifA*.



Quatro isolados da estirpe mutante TAHM contendo deleção da região 5' do gene *nifA* foram submetidos ao ensaio de nitrogenase. A estirpe parental HM053 de *A. brasilense* foi adicionada como controle experimental. Os ensaios foram realizados em meio NFbHP-lactato semi-sólido contendo 0,5 mM de glutamato (condição de baixo amônio) ou 10 mM de NH₄Cl (condição de alto amônio). Após a formação de película no meio (aproximadamente 24 horas), os frascos foram vedados e injetados de acetileno com um volume correspondente a 10% da fase gasosa. Após incubação por 2 horas a 30°C, 0,5 mL da fase gasosa coletada dos frascos foi analisada em cromatógrafo gasoso. A atividade de nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por miligrama de proteína da cultura por minuto. No gráfico estão indicados os desvios padrão em torno da média de um experimento representativo realizado em duplicata.

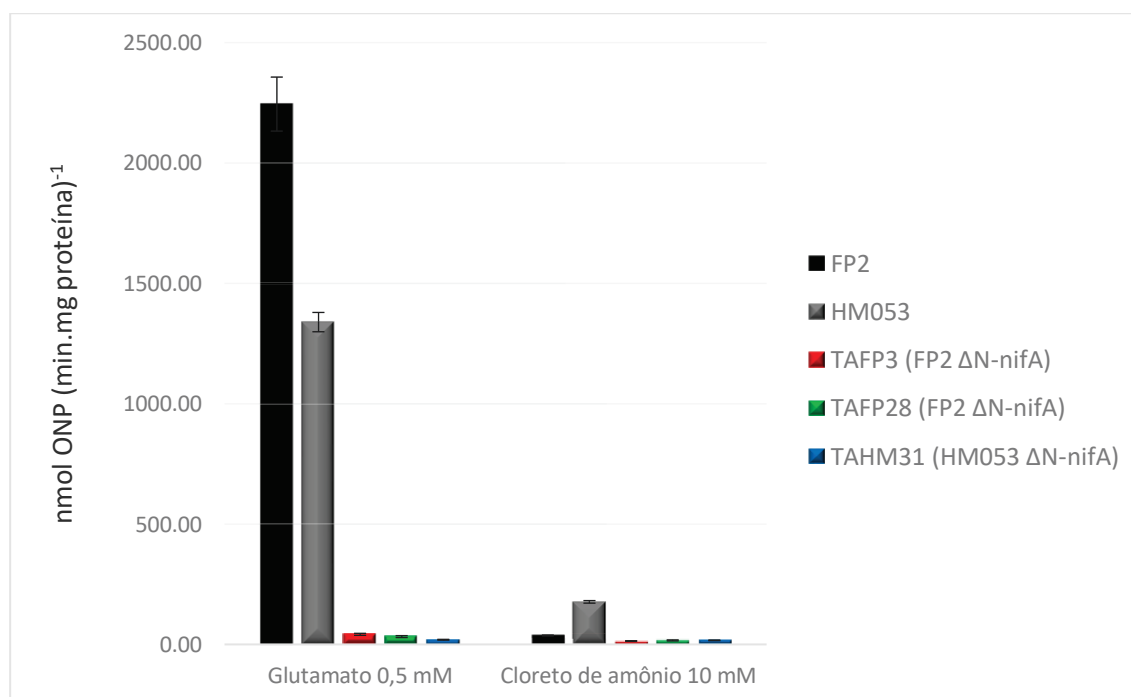
4.6 Ensaio de ativação transcricional *in vivo* pela proteína NifA N-truncada de *A. brasilense*

A proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* foi testada quanto a capacidade de ativar *in vivo* a transcrição dos genes *nif*. Para este ensaio o plasmídeo pEMS140 (REGO *et al*, 2006) contendo uma fusão transcricional *nifB::lacZ* (*Herbaspirillum seropedicae*) foi transferido para as estirpes mutantes (TAFP e TAHM) e parentais (FP2 e HM053) de *A. brasilense* pelo método de conjugação biparental descrito no Item 3.6.1. Colônias transconjugantes capazes de crescer

na presença do antibiótico tetraciclina foram submetidas ao ensaio de determinação de atividade específica da β -galactosidase, conforme detalhado no Item 3.10. O gene *nifB* tem sua expressão regulada por NifA de maneira muito semelhante aos genes estruturais da nitrogenase (genes *nifHDK*) (MACHADO *et al.*, 1996). Se a proteína NifA N-truncada expressa em *A. brasilense* for ativa, a ativação do promotor *nifB* levará a síntese da proteína β -galactosidase.

Devido à regulação parcial negativa de NifA em resposta a presença de oxigênio (FADEL-PICHETH, *et al.*, 1999), provavelmente envolvida com a sensibilidade dos resíduos de cisteínas localizados entre região de interdomínio IDL e o domínio C-terminal à oxigenação (FISCHER, 1994), os ensaios de ativação transcricional foram conduzidos em frascos contendo meio semi-sólido, condição favorável à transcrição da fusão *nifB::lacZ*. Além disso, duas condições foram testadas: baixo (0,5 mM de glutamato) e alto amônio (10 mM de NH_4Cl). Os resultados obtidos para atividade específica de β -galactosidase encontram-se na Figura 23.

Figura 23 –Ensaio de ativação transcricional *in vivo* da fusão *nifB::lacZ* pela proteína NifA N-truncada de *A. brasilense*.



Dois isolados da estirpe mutante TAFP (FP2 Δ N-*nifA*) (TAFP3 e TAFP28) e um isolado da estirpe mutante TAHM (HM053 Δ N-*nifA*) (TAHM31) foram transformados com o plasmídeo pEMS140 (*nifB::lacZ*), além das estirpes parentais FP2 e HM053 (controles experimentais), respectivamente. Os ensaios de ativação transcricional *in vivo* pela proteína NifA N-truncada expressa a partir do cromossomo foram realizados em meio semi-sólido contendo 0,5 mM de glutamato (condição de baixo amônio) ou 10 mM de

NH₄Cl (condição de alto amônio). Os resultados obtidos para atividade específica de β-galactosidase foram expressos em nmol de ONP produzido por minuto por miligrama de proteína da cultura. No gráfico estão indicados os desvios padrão em torno da média de um experimento representativo realizado em triplicata biológica.

Os resultados do ensaio de ativação transcricional do gene de fusão *nifB::lacZ* indicam que a proteína NifA das estirpes FP2 e HM053 foi capaz de ativar a transcrição do gene *nifB* em condição fixação de nitrogênio (baixo amônio), constatada pelas atividades específicas da proteína β-galactosidase. Em contrapartida, não foi observada ativação da transcrição do gene *lacZ* pela proteína NifA N-truncada das estirpes mutantes em nenhuma das condições testadas. Este resultado sugere que a deleção cromossomal da porção amino-terminal do gene *nifA* de *A. brasilense* leva à síntese de uma proteína com uma possível baixa estabilidade e, portanto, incapaz de ativar a transcrição dos genes *nif* envolvidos na fixação biológica de nitrogênio. Através do ensaio de ativação transcricional não é possível afirmar, entretanto, se a ausência de atividade de NifA é decorrente de uma falha transcricional da própria proteína, que pode estar sendo expressa em baixos níveis, ou se a mesma é degradada após ser traduzida por ser não-funcional.

De acordo com trabalho desenvolvido por Arsene e colaboradores (1996), a transferência de quatro plasmídeos contendo o gene *nifA* de *A. brasilense* truncado em diferentes pontos envolvendo o domínio N-terminal e a região de interdomínio QL para uma estirpe mutante no gene *nifA*, levou à restauração da atividade da proteína na ausência de amônio, medida pela ativação de uma fusão transcricional *nifH::lacZ*. Além disso, os autores observaram que dentre as quatro proteínas truncadas, aquela construída pela deleção entre os resíduos de aminoácidos nas posições 12-187 apresentou ser a mais ativa, mesmo na presença de íons amônio. Diferentemente do resultado observado por Arsene e colaboradores (1996), a proteína NifA truncada entre os resíduos de aminoácidos 2-187 e expressa a partir do promotor do próprio gene no cromossomo demonstrou apresentar baixa atividade. É possível que essa diferença de fenótipo seja devido à deleção dos 11 resíduos de aminoácidos subsequentes ao primeiro aminoácido (metionina) da proteína NifA nos mutantes TAFP e TAHM, os quais não foram deletados no trabalho anterior mencionado.

Em um trabalho anterior desenvolvido por Nishikawa e colaboradores (2010), foram realizados ensaios de ativação transcricional do gene de fusão *nifH::lacZ* por uma variante N-truncada da proteína NifA e expressa na estirpe JM109 de *E. coli* (escolhida por não apresentar atividade endógena de β-galactosidase). As atividades de β-galactosidase encontradas indicam que a proteína truncada em seus primeiros 201 aminoácidos, expressa a partir de plasmídeo e

nas condições avaliadas, é capaz de ativar a transcrição do promotor *nifH*. Além disso, os autores não observaram controle negativo da ativação transcricional em resposta à presença de íons amônio e a proteína demonstrou ser parcialmente insensível a oxigênio.

É possível que os fenótipos observados em outras variantes N-truncadas da proteína NifA, as quais demonstraram ser capazes de ativar a transcrição dos genes *nif*, sejam efeitos do número de cópias dos plasmídeos mutagênicos transformados nas estirpes avaliadas, o que gera maiores quantidades de proteína expressa em comparação com a expressão cromossomal a partir do promotor do próprio gene nas estirpes mutantes. Além disso, é possível que a baixa estabilidade da proteína NifA N-truncada dos mutantes TAFP (FP2 Δ N-*nifA*) e TAHM (HM053 Δ N-*nifA*) seja decorrente do ponto de truncamento escolhido, que pode ter sido incorreto por levar a deleção de alguns resíduos de aminoácidos possivelmente importantes para o correto dobramento proteico.

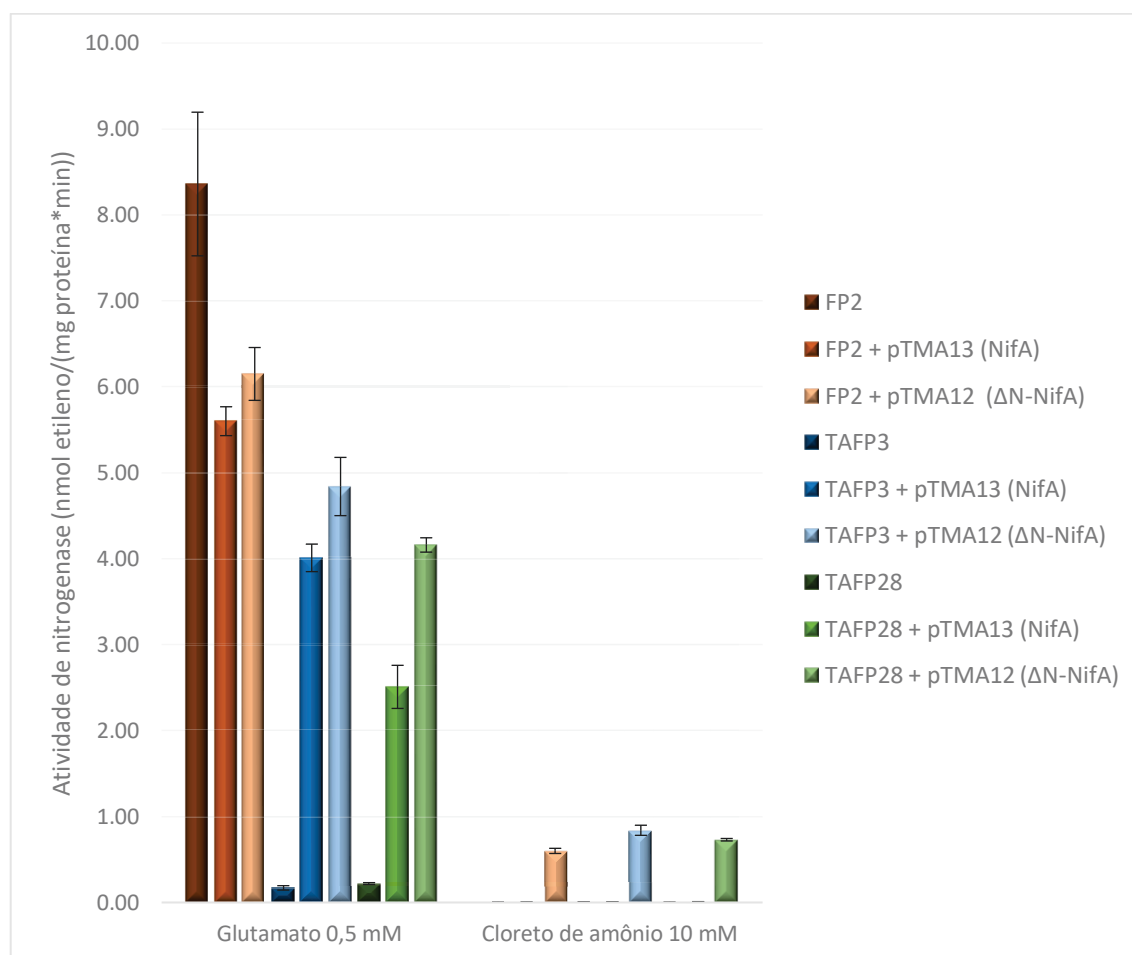
4.7 Determinação de atividade da nitrogenase das estirpes mutantes complementadas com os plasmídeos pTMA12 e pTMA13

Os resultados dos ensaios de atividade da nitrogenase e ativação transcricional do gene de fusão *nifB::lacZ* realizados com as estirpes mutantes, indicam que a deleção cromossomal do domínio GAF regulatório de NifA gera uma proteína incapaz de ativar a transcrição dos genes *nif* em *Azospirillum brasilense*. A fixação biológica de nitrogênio nestes organismos, portanto, encontra-se inativa. Visando a recuperação da capacidade de fixação de nitrogênio, o plasmídeo pTMA13 contendo o gene *nifA* nativo de *Azospirillum brasilense* clonado em pLAFR3.18, conforme descrito no Item 4.2, foi complementado nas estirpes mutantes TAFP (FP2 Δ N-*nifA*) e TAHM (HM053 Δ N-*nifA*). De forma análoga, a capacidade de uma outra variante N-truncada da proteína NifA em restaurar a atividade de fixação de nitrogênio nos mutantes construídos neste trabalho foi testada, através da complementação com o plasmídeo pTMA12.

Para os ensaios de complementação, os plasmídeos pTMA12 e pTMA13 foram transferidos para as estirpes mutantes TAFP e TAHM, suas respectivas estirpes parentais FP2 e HM053 e para a estirpe FP10 (PEDROSA e YATES, 1984), caracterizada pela ausência de atividade de NifA. O método utilizado foi o de conjugação biparental descrito no Item 3.6.1. Colônias transconjugantes capazes de crescer na presença do antibiótico tetraciclina foram utilizadas para os ensaios de determinação de atividade da nitrogenase, os quais foram testados

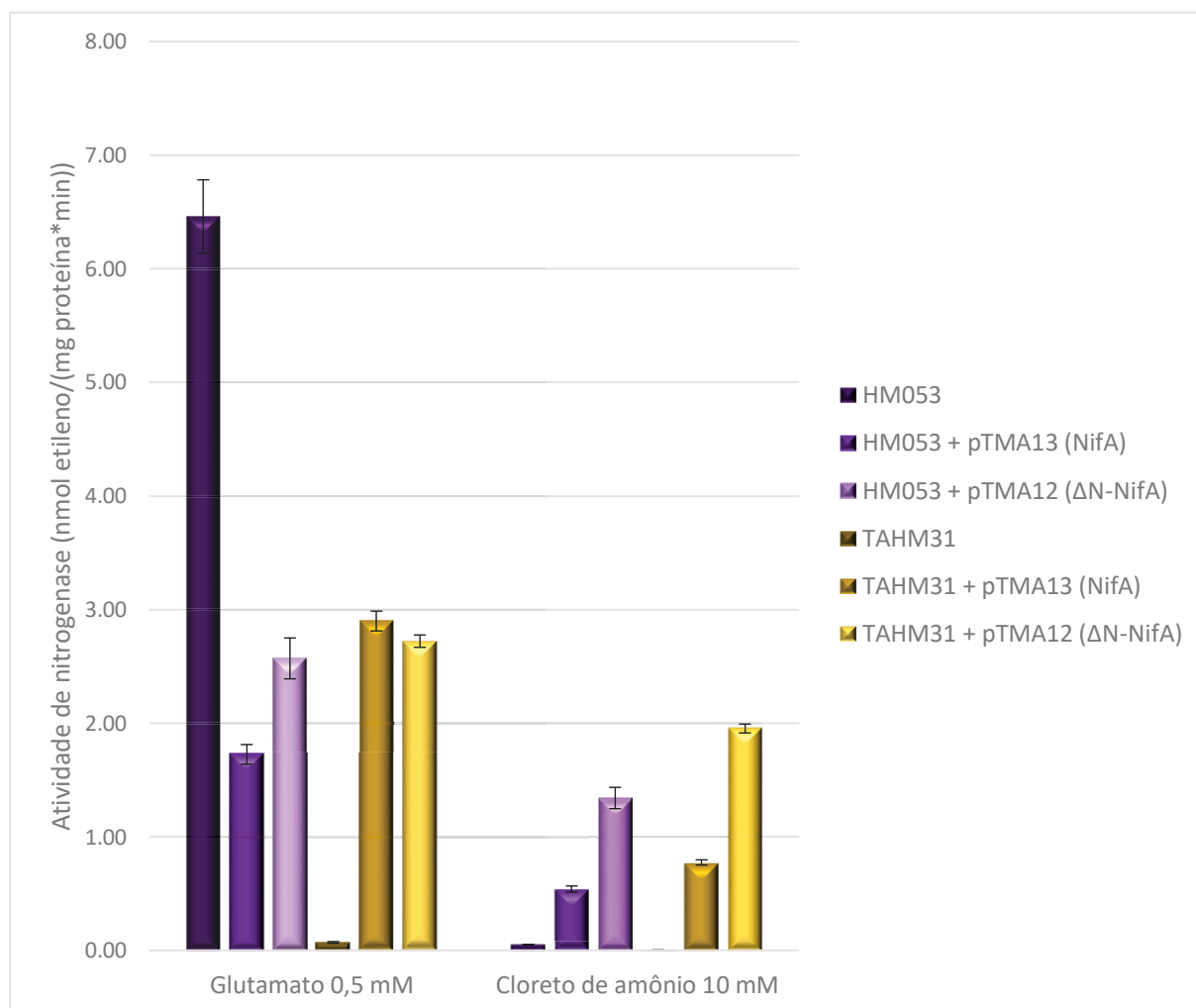
em duas condições: baixo (0,5 mM de glutamato) e alto amônio (10 mM de NH₄Cl). Os resultados obtidos para atividade de nitrogenase encontram-se nas Figuras 24, 25 e 26 abaixo.

Figura 24 – Determinação de atividade da nitrogenase da estirpe mutante TAFP (FP2 Δ N-*nifA*) complementada com os plasmídeos pTMA12 e pTMA13.



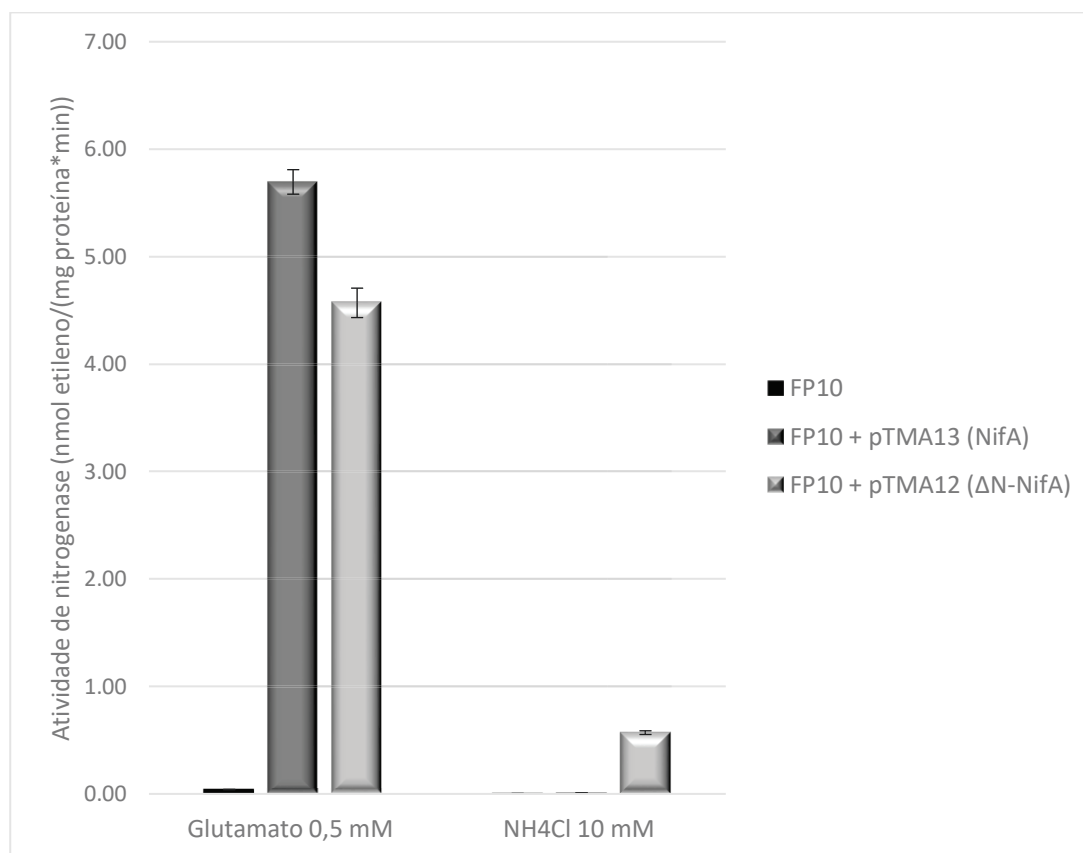
Dois isolados da estirpe mutante TAFP (FP2 Δ N-*nifA*) (TAFP3 e TAFP28) e a estirpe selvagem FP2 foram complementados com os plasmídeos pTMA12 e pTMA13 expressando uma versão N-truncada de NifA e a proteína nativa a partir do promotor *lacZ*, respectivamente. As estirpes sem plasmídeo também foram adicionadas aos ensaios como controles. Os experimentos de determinação de atividade da nitrogenase foram realizados em meio semi-sólido contendo 0,5 mM de glutamato (condição de baixo amônio) ou 10 mM de NH₄Cl (condição de alto amônio). A atividade de nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por miligrama de proteína da cultura por minuto. No gráfico estão indicados os desvios padrão em torno da média de um experimento representativo realizado em duplicata.

Figura 25 – Determinação de atividade da nitrogenase da estirpe mutante TAHM (HM053 $\Delta N-nifA$) complementada com os plasmídeos pTMA12 e pTMA13.



A estirpe mutante TAHM31 (HM053 $\Delta N-nifA$) e sua respectiva estirpe parental HM053 foram complementados com os plasmídeos pTMA12 e pTMA13 expressando uma versão N-truncada de NifA e a proteína nativa a partir do promotor *lacZ*, respectivamente. As estirpes sem plasmídeo também foram adicionadas aos ensaios como controles. Os experimentos de determinação de atividade da nitrogenase foram realizados em meio semi-sólido contendo 0,5 mM de glutamato (condição de baixo amônio) ou 10 mM de NH_4Cl (condição de alto amônio). A atividade de nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por miligrama de proteína da cultura por minuto. No gráfico estão indicados os desvios padrão em torno da média de um experimento representativo realizado em duplicata.

Figura 26 – Determinação de atividade da nitrogenase da estirpe FP10 complementada com os plasmídeos pTMA12 e pTMA13.



A estirpe FP10 (*nifA*⁻) de *A. brasilense* foi complementada com os plasmídeos pTMA12 e pTMA13 expressando uma versão N-truncada de NifA e a proteína nativa a partir do promotor *lacZ*, respectivamente. A estirpe FP10 sem plasmídeo também foi adicionada aos ensaios como controle. Os experimentos de determinação de atividade da nitrogenase foram realizados em meio semi-sólido contendo 0,5 mM de glutamato (condição de baixo amônio) ou 10 mM de NH₄Cl (condição de alto amônio). A atividade de nitrogenase foi expressa em nmol de etileno formado por miligrama de proteína da cultura por minuto. No gráfico estão indicados os desvios padrão em torno da média de um experimento representativo realizado em duplicata.

O resultado de atividade da nitrogenase das estirpes FP2, TAFP3 e TAFP28 não contendo plasmídeo foi similar ao obtido nos ensaios iniciais (Figura 21). Por outro lado, a transferência dos plasmídeos pTMA12 e pTMA13 para os mutantes TAFP3 e TAFP28 contendo deleção cromossomal da região 5' do gene *nifA* e crescidos sob condição de baixo nitrogênio, mostrou que a expressão tanto da proteína NifA nativa quanto da variante N-truncada (sem os primeiros 201 aminoácidos) a partir do promotor *lacZ* leva à complementação de atividade da nitrogenase, a qual mostrou ainda ser comparável à atividade da estirpe FP2

selvagem contendo os plasmídeos pTMA12 ou pTMA13 (Figura 24). Além disso, foi possível detectar atividade de nitrogenase das estirpes FP2, TAFP3 e TAHM28 contendo o plasmídeo pTMA12 e crescidas na presença de amônio (Figura 24).

De forma análoga, a estirpe mutante TAHM31 demonstrou ser complementada para atividade de nitrogenase com os plasmídeos expressando a proteína NifA nativa ou a variante N-truncada na ausência de íons amônio e apresentou atividade ainda maior quando comparada com a estirpe HM053 sem plasmídeo, ambas na presença de íons amônio (Figura 25). A estirpe FP10 de *A. brasilense* caracterizada pela ausência de atividade de NifA também recuperou a capacidade de fixação biológica de nitrogênio após ser complementada tanto com o plasmídeo pTMA12 quanto com o plasmídeo pTMA13, resultado condizente com o obtido em trabalho anterior (PEDROSA e YATES, 1984). Assim como observado para as demais estirpes, a expressão da proteína N-truncada em FP10 conferiu atividade de nitrogenase na condição 10 mM de NH₄Cl, ainda que baixa quando comparada com a condição de baixo amônio (Figura 26).

Estes resultados em conjunto mostram que as estirpes mutantes TAFP (FP2 $\Delta N-nifA$) e TAHM (HM053 $\Delta N-nifA$) construídas neste trabalho tornam-se capazes de fixar nitrogênio após serem complementadas com plasmídeo expressando o gene *nifA* nativo a partir do promotor *lacZ*. Além disso, a adição de uma variante N-truncada de NifA também foi capaz de restaurar a atividade de nitrogenase dos mutantes contendo deleção entre os resíduos de aminoácidos 2-187 (sob baixos níveis de nitrogênio), os quais também demonstraram possuir atividade de nitrogenase quando crescidos na presença de 10 mM de NH₄Cl. Esse fenótipo observado indica que a proteína NifA N-truncada em seus primeiros 201 resíduos de aminoácidos não é totalmente regulada negativamente em resposta a altos níveis de nitrogênio, confirmando dados anteriores (NISHIKAWA, 2010).

Os fenótipos observados nos ensaios de nitrogenase das estirpes mutantes complementadas com o plasmídeo expressando a proteína NifA em sua forma nativa reafirmam a hipótese de que a região cromossomal deletada do gene *nifA* parece ser importante para a estabilidade ou conformação ativa da proteína em *A. brasilense*. Isto pois, diferentemente do fenótipo observado pela expressão do gene N-truncado a partir de plasmídeo por Arsene e colaboradores (1996), a deleção cromossomal dos 558 nucleotídeos iniciais do gene *nifA* gerou uma proteína com perda da atividade de ativador transcricional. Essa diferença de fenótipo pode ser justificada pela maior quantidade de proteína expressa a partir do promotor *lacZ* de plasmídeo em comparação com a expressão cromossomal a partir do promotor do próprio gene, como já mencionado anteriormente. É possível também que a expressão do domínio GAF de

NifA na estirpe FP2 selvagem não mutagenizada seja importante para gerar uma proteína funcional e capaz de ativar a transcrição dos genes *nif* em *Azospirillum brasilense*.

Por outro lado, a capacidade do plasmídeo pTMA12 de religar a atividade de nitrogenase dos mutantes TAFP e TAHM sugere outros pontos de truncamento da porção 5' do gene *nifA* podem gerar uma proteína ativa e parcialmente regulada pelos níveis de amônio. Isto pois, diferentemente da atividade constatada para as estirpes mutantes expressando uma proteína NifA N-truncada entre seus resíduos de aminoácidos 2-187, a adição de uma variante N-truncada em outro ponto parece produzir uma proteína com atividade de ativador transcricional, inclusive da presença de amônio. Os ensaios de complementação mostraram, portanto, que outros pontos de truncamento do gene *nifA* são potenciais alvos de deleção cromossomal.

5. CONCLUSÕES

- a) Os mutantes das estirpes FP2 e HM053 de *A. brasilense* contendo deleção da região 5' do gene *nifA* perderam a capacidade de fixar nitrogênio, indicando que a região deletada é importante para a estabilidade ou conformação ativa da proteína;
- b) Ensaio de ativação transcricional da fusão *nifB::lacZ* confirmaram que a proteína NifA expressa sem os resíduos de aminoácidos 2-187 a partir do promotor do próprio gene no cromossomo não é capaz de ativar a transcrição dos genes *nif* relacionados a fixação biológica de nitrogênio em *A. brasilense*;
- c) Ensaio de complementação mostraram que a expressão da proteína nativa a partir do promotor *lacZ* de plasmídeo é capaz de restaurar o fenótipo de fixação de nitrogênio nos mutantes;
- d) Os ensaios de complementação também mostraram que outros pontos de truncamento resultam em uma NifA ativa mesmo na presença de amônio e são potenciais alvos para deleção cromossomal.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, L. M. Estudo *in vitro* das proteínas transdutoras de sinal GlnB e GlnZ de *Azospirillum brasilense*. 2008. 139f. Tese (Doutorado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 80–105, 2001.

ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of NifA N-terminal domain. **J. Bacteriol.** v. 178, p. 4830-4838, 1996.

BARBIERI, P., GALLI, E. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. **Res. Microbiol.** v. 144, p. 69–75, 1993.

BARNEY, B. M.; IGARASHI, R. Y.; DOS SANTOS, P. C.; DEAN, D. R.; SEEFELDT, L. C. Substrate Interaction at an Iron-Sulfur Face of the FeMo-cofactor during Nitrogenase Catalysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 51, p. 53621–53624, 2004.

BASHAN, Y., SINGH, M., LEVANONY, H. Contribution of *A. brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. **Can. J. Bot.** v. 67, p. 2429-2434, 1989.

BERGER, D. K.; NARBERHAUS, F.; KUSTU, S. The isolated catalytic domain of NIFA, a bacterial enhancer-binding protein, activates transcription *in vitro*: activation is inhibited by NIFL. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 1, p. 103-107, 1994.

BERGEY, D. H.; KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, v. 1, p. 101-103, 1984.

BOTHE, H.; FERGUSON, S.; NEWTON, W. E. **Biology of the Nitrogen Cycle: COST edition**. Elsevier, 2006.

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

BRILL, W.J. Biological nitrogen fixation. **Sci. American**, v. 236, p. 68-81, 1977.

BUCK, M.; CANNON, W.; WOODCOK, J. Mutational analysis of upstream sequences required for transcriptional activation of the *Klebsiella pneumoniae nifH* promoter. **Nucleic Acids Research**, v. 15, p. 9945-9956, 1987.

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

CHAN, W.-T. *et al.* A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. **Bioscience reports**, v. 33, n. 6, p. 931-937, 2013.

DALLA SANTA, O. R. *et al.* *Azospirillum* sp. inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Braz. arch. biol. technol.** vol.47, p.843-850, 2004.

DEKHIL, S. B.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Comglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., elevation of *Comglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Comglomeromonas*, *Comglomeromonas parooensis* sp. nov. **System. Appl. Microbiol.**, v. 20, p. 72-77, 1997.

DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Bioch. Biophys. Acta.**, v. 127, p. 285-294, 1966.

DIXON, R.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; HILL, S. O.; MACHEROUX, P.; POOLE, R. *et al.* Regulation of *nif* gene expression in free-living diazotrophs: recent advances. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W. (eds.). **Biological nitrogen fixation in the 21st century**. Kluwer Academic, p. 87-92, 1997.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews**. v. 2, p. 621-631, 2004.

DÖBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In BALLOWS, A., TRUPPER, H.G., DWORKING, M., HARDER, W. (Ed.). **The Prokaryote**. 2 ed., v. 3, p. 2236-3353, 1991.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In NEWTON, W. E. e NYMAN, C. J. (Ed.). **Proceedings of the 1st. Intl. Symp. Nitrogen Fixation**. v. 2 Pullman, Washington Univ. Press. p. 518-38, 1976.

DRUMMOND, M. H.; WHITTY, P.; WOOTTON, J. C. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. **EMBO Journal**, v. 5, p. 441-447, 1986.

EADY, R. R. Structure–function relationships of alternative nitrogenases. **Chem. Rev.** v. 96, p. 3013–3030, 1996.

ECKERT, B.; WEBER, O.B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 51, p.17-26, 2001.

FADEL-PICHETH, C.; SOUZA, E.; RIGO, L. *et al.* Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 281–288, 1999.

FAGES, J.. *Azospirillum* inoculants and field experiments,. In Y. Okon (ed.), *Azospirillum/plant* associations. **CRC Press**, Boca Raton, Flórida, p. 87-109, 1994.

FIBACH-PALDI, S.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 326, n. 2, p. 99–108, 2012.

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

FISCHER, H. M.; BRUDERER, T.; HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 5, p. 2207-2224, 1988.

GONZÁLEZ, V.; OLVERA, L.; SOBERÓN, X.; MORETT, E. *In vivo* studies on the positive control function of NifA: a conserved hydrophobic amino acid patch at the central domain involved in transcriptional activation. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 55-67, 1998.

GAY, P., LE COQ, D., STEINMETZ, M., FERRARI, E., HOCH, J.A. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *B. subtilis*: expression of the gene in *E. coli*. **J. Bacteriol.**, v. 153, p. 1424-1431, 1983.

HE, L.; SOUPENE, E.; NINFA, A.; KUSTU, S. Physiological Role for the GlnK Protein of Enteric Bacteria: Relief of NifL Inhibition under Nitrogen-Limiting conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 6661-6667, 1998.

HU, Y; RIBBE, M.W. Historic overview of nitrogenase research. (Nitrogen fixation). **Meth. Mol. Biol.**, v. 766, p. 3–7, 2011.

HUERGO, L.F.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M. *et al.* Interactions between PII proteins and the nitrogenase regulatory enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. **FEBS Letters**, v. 580, n. 22, p. 5232–5236, 2006a.

HUERGO, L. F; PEDROSA, F. O; MULLER-SANTOS, M. *et al.* PII Signal Transduction Proteins: Pivotal Players in Post-Translational Control of Nitrogenase Activity. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 176–190, 2012a.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

HYNES, M. F.; QUANDT, J.; O'CONNELL, M. P.; PUHLER, A. Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis sacB* gene. **Gene**, v. 78, p. 111-120, 1989.

JACK, R.; de ZAMAROCZY, M.; MERRICK, M. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 1156-1162, 1999.

KESSLER, B.V.L.; TIMMIS, K. N. A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria: regulation of the Pm-promotor of the Tol-plasmid studied with all controlling elements in monocopy. **Mol. Gen. Genet.**, p.233:293, v. 301, 1992.

KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Res. Microbiol.** v. 140, p. 679–693, 1989.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. **Biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 389-397, 1994.

KLASSEN, G.; 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.

LAVRINENKO, K.; CHERNOUSOVA, E.; GRIDNEVA, E. *et al.* *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 60, p. 2832–2837, 2010.

LIANG, Y. Y.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 2735-2744, 1991.

LIN, S.-Y., HAMEED, A., LIU, Y.-C., HSU, Y.-H., LAI, W.-A., SHEN, F.-T., YOUNG, C.-C. *Azospirillum soli* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.65, p. 4601-4607, 2015 .

LIN, S.-Y., LIU, Y.-C., HAMEED, A. *et al.* *Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.66, p. 1453-1458, 2016.

LIN, S.-Y.; LIU, Y.-C.; HAMEED, A. *et al.* *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 63, p. 3762-3768, 2013.

LIN, S.-Y.; SHEN, F.-T.; YOUNG, L.-S. *et al.* *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 62, p. 1185-1190, 2012.

LIN, S.-Y.; YOUNG, C.-C.; HUPFER, H.; SIERING, C. *et al.* *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 59, p. 761-765, 2009.

LUKOYANOV, D.; YANG, Z.-Y.; BARNEY, BRETT M; *et al.* Unification of Reaction Pathway and Kinetic Scheme for N₂ Reduction Catalyzed by Nitrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 109, n. 15, p. 5583–5587, 2012.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Can. J. Microbiol.** v. 37, p. 549-553, 1991.

MACHADO, H. B.; YATES, M. G.; FUNAYAMA, S. *et al.* The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3*-like–*ntrB*–*ntrC* operon and are negatively regulated. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 8, 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.

MAGALHAES, F. M. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **An. Acad. Bras. Ciên.** v. 55, p. 471-430, 1983.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 57, p. 620–624, 2007.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 4, p. 604-622, 1995.

MERRICK, M. J. Regulation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic bacteria. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds.). **Biological nitrogen fixation**. p. 835-876, 1992.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. *In-trans* regulation of the N-truncated-NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N-terminal domain. **FEBS Letters**, v. 180, p. 157-161, 1999a.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Expression and functional analysis of a N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Letters**, v. 447, p. 283-286, 1999b.

MORETT, E.; BUCK, M. NifA-dependent in vivo protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 85, p. 9401-9405, 1988.

MORETT, E.; CANNON, W.; BUCK, M. The DNA-binding domain of the transcriptional activator protein NifA resides in its carboxy terminus, recognises the upstream activator sequences of *nif* promoters and can be separated from the positive control function of NifA. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 24, p. 11469-11488, 1988.

MORETT, E.; SEGOVIA, L. The σ_{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 19, p. 6067-6074, 1993.

MOURE, V. R.; KARAMATULLAH D.; YANG, Z.-Y.; WENDROTH, S. *et al.* The Nitrogenase Regulatory Enzyme Dinitrogenase Reductase ADP- Ribosyltransferase (DraT) Is Activated by Direct Interaction with the Signal Transduction Protein GlnB. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 279-286, 2013.

MULLIS, K., FALOONA F. Specific Synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. **Methods Enzymol**, v. 155, p. 335-350, 1987

MURRELL, S. A.; LOWERY, R. G.; LUDDEN, P. W. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase from *Clostridium pasteurianum* prevents its inhibition of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. **Biochem J**, v. 251, p. 609–612, 1988.

MUS, F.; CROOK, M.B., GARCIA, K.; GARCIA, A. C. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, p. 3698-3710, 2016.

NISHIKAWA, C. Y. **Expressão e caracterização de uma forma N-truncada da proteína NifA de *Azospirillum brasilense***. 2010. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, Brasil.

OKON, Y., ALBRECHT, S. L., BURRIS, R. H. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. **J. Bacteriol.**, v. 127, n. 3, p. 1248-1254, 1976.

PEDROSA, F. O. Fixação biológica de nitrogênio: fértil idéia. **Ciência Hoje**, v. 6, p. 12-13, 1987.

PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntnC* (*glnG*) type genes. **FEMS Microbiol. Lett**, v. 55, p. 95-101, 1984.

PENG, G. X.; WANG, H. R.; ZHANG, G. X. *et al.* *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 56, p. 1263–1271, 2006.

PERROUD, B.; BANDHARI, S.K.; ELMERICH, C. The *nifHDK* operon of *Azospirillum brasilense* Sp7. In: KLINGMÜLLER, W. (Ed.) ***Azospirillum III: Genetics, Physiology, Ecology***. Berlin: Springer, p. 10-19, 1985.

QUIVIGER, B.; FRANCHE, C.; LUTFALLA, G.; RICE, D.; HASELKORN, R; ELMERICH, C. Cloning of a nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Azospirillum brasilense*. **Biochimie**, v. 64, p. 495-502, 1982.

REGO, F. G. M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. *et al.* The expression of *nifB* gene from *Herbaspirillum seropedicae* is dependent upon the NifA and RpoN proteins. **Can. J. Microbiol.**, v. 52, p. 1199-1207, 2006.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa Fusca*). **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 37, p. 43-51, 1987.

REITZER, L. Nitrogen Assimilation and Global Regulation in *Escherichia coli*. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 155–176, 2003.

RUDNICK, P.; KUNZ, C.; GUNATILAKA, M. K.; HINES, E. R.; KENNEDY, CHRISTINA. Role of GlnK in NifL-Mediated Regulation of NifA Activity in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 3, p. 812-820, 2002.

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

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

SCHOLLHORN, R., BURRIS, R.H., Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 58, p. 213-16, 1967.

SEEFELDT, LANCE C.; HOFFMAN, B. M.; DEAN, DENNIS R. Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 701–722, 2009.

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

SIMPSON, F.; BURRIS, R. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, v. 224, n. 4653, p. 1095-1097, 1984.

SHINGLER, V. Signal sensing by 54⁻dependent regulators: derepression as a control mechanism. **Molecular Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 409-416, 1996.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L.U.; YATES, M.G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA Activity by Ammonium Ions and Oxygen. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 681-684, 1999.

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

STEINMETZ, M. *et al.* Genetic analysis of *sacB*, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg. **Molecular & General Genetics**, v. 191, n. 1, p. 138-144, 1983.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DOBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. Nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Can. J. Microbiol.** v. 24, p. 967-980, 1978.

VOGEL; G. F.; MARTINKOSKI, L.; MARTINS, P. J.; BICHEL, A. Desempenho agronômico de *azospirillum brasilense* na cultura do arroz: uma revisão. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.6, n.3, p. 567-578, 2013.

WESTBY, C. A.; ENDERLIN, C. S.; STEINBERG, N. A.; JOSEPH, C. M.; MEEKS, J. C. Assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. **J. Bacteriol.** v. 169, p. 4211-4214, 1987.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 55, p. 1435-1438, 2005.

YOUNG, C.-C.; HUPFER, H.; SIERING, C. *et al.* *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 58, p. 959-963, 2008.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of Nitrogen-fixing organisms. *In*: STACEY, G; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds.). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman e Hall, p. 685-735, 1992.

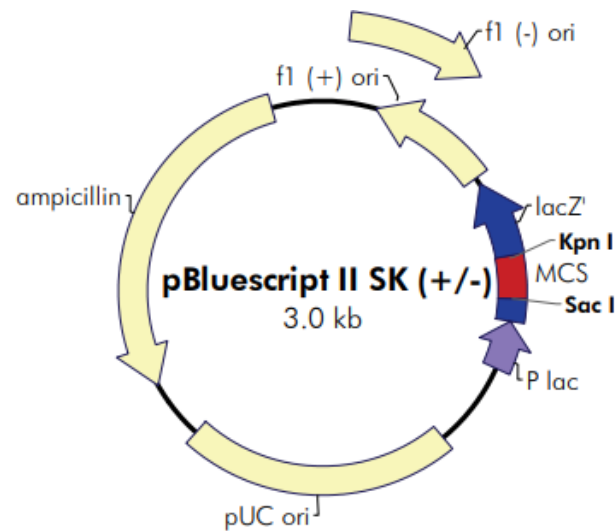
ZHOU, S.; HAN, L.; WANG, Y. *et al.* *Azospirillum humicireducens* sp. Nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 63, p. 2618-2624, 2013.

ZHOU, Y.; WEI, W.; WANG, X. *et al.* *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China. **The Journal of General and Applied Microbiology**. v. 55, n. 1, p. 1-7, 2009.

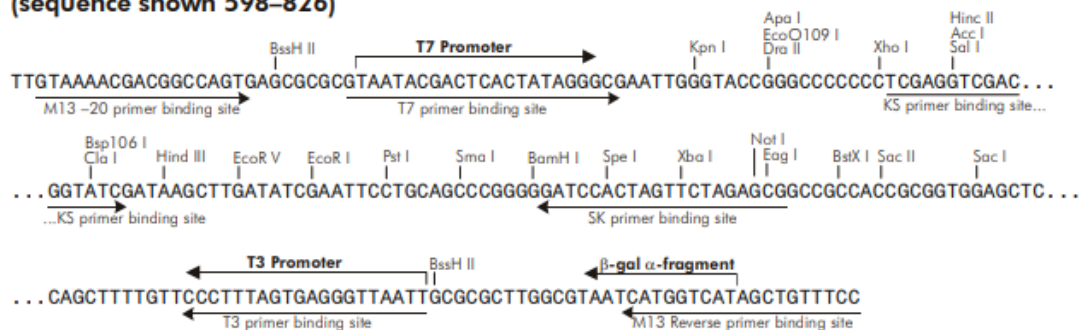
ZUMFT, W. G., F. CASTILLO. Regulatory properties of the nitrogenase from *Rhodospseudomonas palustris*. **Arch. Microbiol.** v. 117, p. 53-60, 1978.

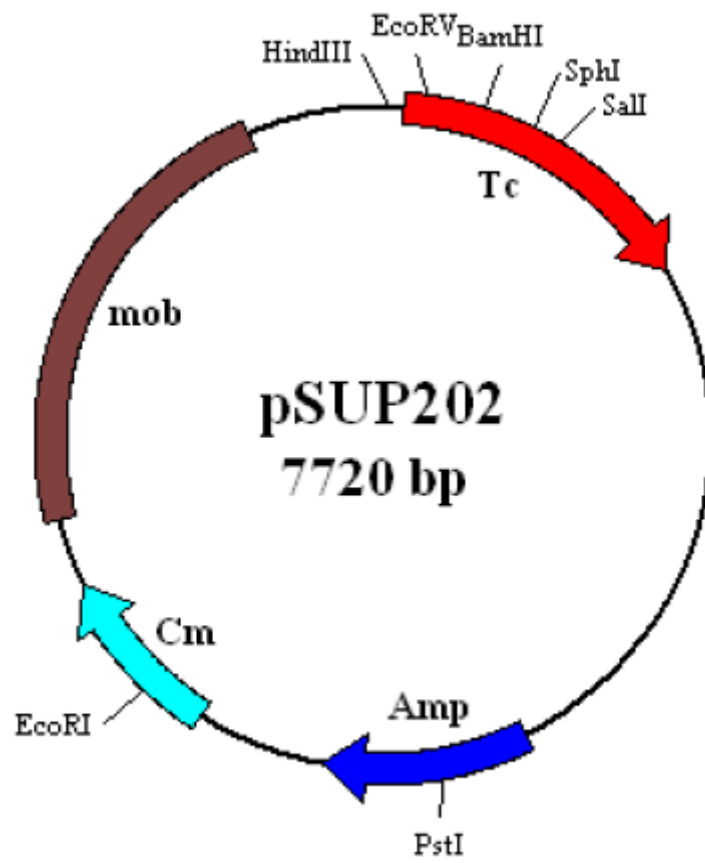
7. ANEXOS

Anexo A – Vector pBluescript II KS (+/-) (Agilent Technologies)



**pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 598–826)**



Anexo B – Vetor pSUP202 (SIMON *et al.*, 1983)

Anexo C – Vetor pLAFR3.18 (MACHADO *et al.*, 1995)