

KÁTIA REGINA DOS SANTOS TEIXEIRA



ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO OPERON  
*glnAntrBC* DE *Herbaspirillum seropedicae* Z78

Tese apresentada ao Departamento de Bio-  
química da Universidade Federal do Paraná  
para a obtenção do título de Mestre.

CURITIBA  
1991

KÁTIA REGINA DOS SANTOS TEIXEIRA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO OPERON  
*glnAntrBC* DE *Herbaspirillum seropedicae* Z78

Tese apresentada ao Departamento de Bio-  
química da Universidade Federal do Paraná  
para a obtenção do título de Mestre.

CURITIBA  
1991

KÁTIA REGINA DOS SANTOS TEIXEIRA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO OPERON *glnAntrBC*  
DE *Herbaspirillum seropedicae* Z78

Tese aprovada como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre no Curso de  
Pós-graduação em Bioquímica, pela Comissão formada  
pelos professores:

Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa - UFPR

Prof.<sup>a</sup> Glaci T. Zancan - UFPR

Prof.<sup>a</sup> Muriel Mourão Vieira - UFPR

Curitiba, 4 de novembro de 1991.

ORIENTADORES:

Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa

Dr. Shigehiro Funayama



Ao meu PAI Heitor  
"in memoriam",  
minha MãE Janete e minhas irmãs  
Ana Cristina, Eliane, Andréa e  
Alessandra.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa e ao Dr. Shigehiro Funayama pela orientação dispensada durante a realização deste trabalho, além da solidariedade e apoio oferecidos em vários momentos.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação e aos Professores deste Departamento, em especial às Dra. Liu Un Rigo e Dra. Glaci Terezinha Zancan, que contribuíram de uma forma ou de outra para a minha formação acadêmica durante esta fase.

Aos meus amigos, em especial a Maria Aparecida Knopik e família, Dra. Márcia Helena Mendonça, Marcos José Machado, Ilma Higuti e Guilherme Patrício G. Figueroa, que dividiram comigo tanto os momentos felizes quanto as tristezas e angústias, além do fato de sempre estarem dispostos a me estenderem a mão.

À minha família que soube respeitar e apoiou a minha decisão de ir em busca dos meus ideais.

Aos órgãos CNPq e FINEP, cujo suporte financeiro foi indispensável para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	x
	LISTA DE TABELAS.....	xii
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
	RESUMO.....	xvi
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	O COMPLEXO ENZIMÁTICO NITROGENASE.....	2
1.2	OS GENES <i>nif</i> EM <i>Klebsiella pneumoniae</i> : ORGANIZAÇÃO E FUNÇÃO.....	4
1.3	REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES <i>nif</i> em <i>K. pneumoniae</i> .....	8
1.3.1	Regulação da ativação dos genes envolvidos na fixação de nitrogênio em outros microrganismos.....	14
1.4	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> : DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE E AVANÇOS NOS ESTUDOS FISIOLÓGICO E GENÉTICO DESTE MICRORGANISMO.....	19
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
2.1	BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	23
2.1.2	Manutenção dos estoques das estirpes bacterianas.....	23

2.2	MEIOS DE CULTURA.....	23
2.3	ANTIBIÓTICOS.....	26
2.4	CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	27
2.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE....	28
2.6	REAGENTES.....	28
2.7	CONJUGAÇÃO.....	29
2.7.1	Banco de genes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe Z78.....	29
2.7.2	Isolamento de plasmídeos recombinantes do banco genômico capazes de complementar um mutante <i>ntnC<sup>-</sup></i> de <i>E. coli</i> .....	31
2.7.3	Transferência de plasmídeos recombinantes entre estirpes de <i>E. coli</i> e mutantes <i>ntnC<sup>-</sup></i> de <i>A. brasilense</i> .....	33
2.7.4	Eliminação do plasmídeo recombinante pelo plasmídeo R68.45.....	34
2.8	PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEO.....	35
2.8.1	Minipreparação de plasmídeos de <i>E. coli</i> ....	35
2.8.2	Minipreparação de plasmídeos de <i>A. brasilense</i> .....	36
2.9	TRANSFORMAÇÃO.....	37
2.9.1	Preparo de células competentes de <i>E. coli</i> .....	37
2.9.2	Transformação de células competentes com os plasmídeos recombinante.....	38
2.10	ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO E SISTEMAS DE CLIVAGENS.....	39

2.11	ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE.	
2.11.1	Eletroforese de DNA após clivagem.....	41
2.11.2	Eletroforese das preparações de plasmídeos de <i>A. brasilense</i> e <i>E. coli</i> .....	42
2.11.3	Preparo do gel para análise e fotografia.....	42
2.12	CONSTRUÇÃO DO MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE.....	43
2.13	PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA EM GEL DE AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSÃO.....	44
2.14	MARCAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA POR SÍNTESE UTILIZANDO HEXADESOXINUCLEOTÍDEOS COMO SEQUÊNCIA INICIADORA.....	45
2.15	TRANSFERÊNCIA DO DNA DO GEL DE AGAROSE PARA MEMBRANA DE NYLON - "Southern blot".....	46
2.15.1	Preparo do gel para a transferência do DNA...	47
2.15.2	Preparo do sistema para transferência do DNA.	47
2.16	MAPEAMENTO DOS GENES PRESENTES NO PLASMÍDEO RECOMBINANTE.....	48
2.16.1	Pré-hibridização utilizando a solução de Denhardt como agente bloqueador.....	48
2.16.2	Hibridização.....	49
2.16.3	Remoção do DNA-sonda para re-utilização da membrana.....	49
2.17	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA.....	50
3	RESULTADOS.....	51
3.1	BANCO GENÔMICO DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe Z78.....	51

3.2	ISOLAMENTO DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES, CONTENDO DNA DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> , CAPAZES DE COMPLEMENTAR O MUTANTE <i>ntrC</i> <sup>-</sup> DE <i>E. coli</i> ET8556.....	51
3.3	TRANSFORMAÇÃO DE <i>E. coli</i> DH5 COM OS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES OBTIDOS POR COMPLEMENTAÇÃO.....	52
3.4	TRANSFERÊNCIA DOS PLASMÍDEOS pKRT's DE <i>E. coli</i> DH5 PARA MUTANTES <i>ntrC</i> <sup>-</sup> DE <i>A. brasilense</i> FP8 E FP9.....	53
3.5	COMPLEMENTAÇÃO DOS MUTANTES <i>ntrC</i> <sup>-</sup> DE <i>A. brasilense</i> PELOS PLASMÍDEOS pKRT's.....	55
3.6	RESTAURAÇÃO DO FENÓTIPO <i>nif</i> <sup>-</sup> DOS TRANSCONJUGANTES <i>A. brasilense</i> FP8 E FP9 (pKRT1) PELO PLASMÍDEO R68.45.....	55
3.7	DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE CLIVAGEM DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES.....	57
3.8	LOCALIZAÇÃO DOS GENES <i>glnA</i> , <i>ntrB</i> E <i>ntrC</i> NOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO pKRT1.....	70
3.9	MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pKRT1.....	72
4	DISCUSSÃO.....	77
5	CONCLUSÕES.....	82
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

## LISTA DE FIGURAS

1	ORGANIZAÇÃO DOS GENES <i>nif</i> EM <i>K. pneumoniae</i> .....	5
2	MODELO PROPOSTO PARA A REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES <i>nif</i> EM <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	10
3	MODELO PARA A REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA NtrC EM RELAÇÃO AO NÍVEL DE NITROGÊNIO.....	12
4	REGULAÇÃO DOS GENES <i>nif/fix</i> EM <i>R. meliloti</i> .....	15
5	ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO BANCO GENÔMICO DE <i>H. seropedicae</i> ESTIRPE Z78 UTILIZANDO COMO VETOR O COSMÍDEO pLAFR3.....	30
6	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS TRANSCONJUGANTE E TRANSFORMANTE DE <i>E. coli</i> .....	54
7	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS TRANSCONJUGANTES DE <i>A. brasilense</i> FP8 E FP9 (pKRT1).....	59
8	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS TRANSCONJUGANTES DE <i>A. brasilense</i> FP8 E FP9 (R68.45).....	60
9	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES ISOLADOS ATRAVÉS DA COMPLEMENTAÇÃO DE MUTANTE <i>ntrC</i> <sup>-</sup> DE <i>E. coli</i> CLIVADOS COM <i>EcoR</i> I.....	61
10	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES ISOLADOS ATRAVÉS DA COMPLEMENTAÇÃO DE MUTANTE <i>ntrC</i> <sup>-</sup> DE <i>E. coli</i> CLIVADOS COM <i>Bgl</i> II.....	62

11	PERFIL ELETROFORÉTICO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pKRT1 CLIVADO COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO.....	64
12	PERFIL ELETROFORÉTICO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pKRT1 CLIVADO COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO.....	65
13	PERFIL ELETROFORÉTICO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pKRT1 CLIVADO COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO.....	66
14	PERFIL ELETROFORÉTICO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pKRT1 CLIVADO COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO.....	67
15	HIBRIDIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO PLASMÍDEO pKRT1 COM AS SONDAS <i>glnA</i> , <i>ntrB</i> E <i>ntrC</i> .....	71
16	HIBRIDIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO PLASMÍDEO pKRT1 COM AS SONDAS <i>glnA</i> , <i>ntrB</i> E <i>ntrC</i> .....	73
17	MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pKRT1.....	76



## LISTA DE TABELAS

1	BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.....	24
2	CARACTERÍSTICAS DAS ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO.....	40
3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE DOS TRANSCONJUGANTES <i>Azospirillum brasilense</i> FP8 E FP9 CONTENDO OS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES.....	56
4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE DOS TRANSCONJUGANTES <i>Azospirillum brasilense</i> FP8 E FP9 NA PRESENÇA DOS PLASMÍDEOS pKRT1 E R68.45.....	58
5	TAMANHO DOS FRAGMENTOS OBTIDOS PELA CLIVAGEM DO PLASMÍDEO pKRT1 COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO EM SISTEMAS SIMPLES.....	68
6	TAMANHO DOS FRAGMENTOS OBTIDOS PELA CLIVAGEM DO PLASMÍDEO pKRT1 COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO EM SISTEMAS DUPLOS.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

pb	=	pares de bases
kpb	=	quilo pares de bases
g	=	grama
l	=	litro
mg	=	miligrama
ml	=	mililitro
$\mu$ g	=	micrograma
$\mu$ l	=	microlitro
ng	=	nanograma
nmol	=	nanomol
M	=	concentração molar
mM	=	concentração milimolar
$\mu$ M	=	concentração micromolar
$\mu$ Ci	=	microcurie
N	=	concentração normal
nm	=	nanômetro
$A_{540 \text{ nm}}$	=	absorbância a 540 nm
min	=	minuto
h	=	hora
°C	=	temperatura em graus Celsius
rpm	=	rotação por minuto

v/v	=	volume/volume
V	=	volts
$C_2H_2$	=	acetileno
$C_2H_4$	=	etileno
$NH_4^+$	=	íons amônio
Tn	=	transposon
DNA	=	ácido desoxirribonucleico
RNA	=	ácido ribonucleico
RNApol	=	RNA polimerase
RNAse	=	ribonuclease
EtBr	=	brometo de etídio
ATP	=	adenosina-5'-trifosfato
ADP	=	adenisina-5'-bifosfato
UMP	=	uridina-5'-monofostato
dATP	=	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dTTP	=	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
dCTP	=	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	=	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
Tris	=	tris hidroximetilaminometano
EDTA	=	ácido etilenodiaminotetracético
Tc	=	tetraciclina
Nal	=	ácido nalidíxico
Km	=	canamicina
Sm	=	estreptomicina
Ap	=	ampicilina
<b>R</b>	=	resistência à
Nif	=	fenótipo para fixação de nitrogênio

<i>nif</i>	=	genótipo para fixação de nitrogênio
<i>fix</i>	=	genótipo para fixação de nitrogênio simbiótica
<i>ntr</i>	=	genótipo para metabolismo geral de compostos nitrogenados
<i>pro</i>	=	genótipo para a utilização de prolina
<i>thi</i>	=	genótipo para utilização de tiamina
<i>leu</i>	=	genótipo para utilização de leucina
<i>met</i>	=	genótipo para utilização de metionina
<i>lacY</i>	=	gene codificador da $\beta$ -galactosídeo permease
<i>tra</i>	=	conjunto de genes responsáveis pela transferência de plasmídeos
<i>mob</i>	=	genótipo para a mobilização do plasmídeo
<i>hsdR</i>	=	genótipo do controle de restrição específica do hospedeiro
<i>hsdM</i>	=	genótipo do sistema de modificação do hospedeiro
<i>recA</i>	=	gene envolvido no mecanismo de recombinação
UTase	=	uridililil-transferase
UR	=	enzima responsável pela remoção do grupo uridilililil

## RESUMO

Cinco plasmídeos recombinantes foram isolados, a partir de um banco de genes de *Herbaspirillum seropedicae*, por complementação genética de um mutante *ntrC*<sup>-</sup> de *E. coli*. Estes plasmídeos, denominados pKRT1 a pKRT5, além de restaurarem a capacidade de utilização de L-arginina pelo mutante *ntrC*<sup>-</sup> de *E. coli* ET8556, também foram responsáveis pela expressão da atividade da nitrogenase em mutantes *ntrC*<sup>-</sup> de *A. brasilense*, estirpes FP8 e FP9. O plasmídeo recombinante pKRT1, escolhido para um estudo mais detalhado da sua estrutura, apresenta um inserto de DNA de *H. seropedicae* de 22,5 kpb. Este inserto contém sítios de restrição para as endonucleases *EcoR* I, *Hind* III, *Xho* I, *Bgl* II e *Pst* I, não tendo sido clivado na presença de *BamH* I. A presença do gene *ntrC* no pKRT1 foi confirmada por estudos de hibridização, que revelaram também a presença dos genes *glnA* e *ntrB*. Os resultados obtidos indicam que a organização desses genes em *Herbaspirillum seropedicae* é contígua, como aquela observada em *K. pneumoniae* e *A. vinelandii* (54, 170).

## 1. INTRODUÇÃO

A capacidade de utilizar nitrogênio atmosférico como única fonte de N tem sido observada em diferentes grupos de microrganismos procarióticos (92, 138). A reação de redução de  $N_2$  ( $N\equiv N$ ) a amônia ( $NH_3$ ), catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase, constitui o processo de fixação biológica do nitrogênio (138).

Além de catalisar a redução do  $N_2$ , a nitrogenase também é capaz de reduzir uma série de substratos contendo ligações triplas terminais do tipo  $-C\equiv C-$ ,  $-C\equiv N$ ,  $N\equiv N$ ,  $N\equiv O$  (46, 138), tais como acetileno ( $C_2H_2$ ), cianeto (HCN), óxido nitroso ( $N_2O$ ), iso-cianeto de metila ( $CH_3N\equiv C$ ) e outros compostos análogos (31, 140, 146, 150). A redução de acetileno a etileno ( $C_2H_4$ ) pela nitrogenase tem sido de grande valia para a determinação da atividade desta enzima, graças à fácil detecção e quantificação do produto ( $C_2H_4$ ) por cromatografia gasosa.

Atualmente, são conhecidos três tipos de nitrogenase, que foram classificadas de acordo com o tipo de metal que participa do seu sítio ativo em: nitrogenase dependente de Molibdênio (Mo-nitrogenase) ou clássica, nitrogenase dependente de Vanádio (V-nitrogenase) ou vanádio nitrogenase e nitrogenase dependente de Ferro (Fe-nitrogenase) ou nitrogenase alternativa (92).

## 1.1 O COMPLEXO ENZIMÁTICO NITROGENASE

A Mo-nitrogenase tem sido isolada de diversos microrganismos (92, 130, 138) e a sua composição básica é de duas metalo-proteínas, a proteína MoFe ou dinitrogenase e a proteína Fe ou dinitrogenase redutase (101, 156).

A proteína MoFe é um tetrâmero formado por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$  ( $\alpha_2\beta_2$ ). A massa molecular da proteína MoFe é de cerca de 220.000 daltons e, as massas moleculares aproximadas da subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  são 50.000 e 60.000 daltons, respectivamente (51). Esta proteína contém dois cofatores de Ferro-Molibdênio (FeMoco), quatro grupamentos [4Fe-4S] denominados centros P, e dois outros centros contendo Fe (centros S) (112, 155). A participação do FeMoco no sítio ativo da nitrogenase foi sugerida por vários autores (17, 77, 78, 151). SHAH & BRILL (151) demonstraram que o FeMoco é composto por um complexo contendo Mo-Fe-S. A proporção, descrita por diversos autores, de Fe e S para cada Mo deste complexo tem sido variável, podendo ser representada por  $\text{MoFe}_{6-8}\text{S}_{4-10}$  (22, 119, 120).

A Proteína Fe é um dímero composto por duas subunidades idênticas. A massa molecular da Proteína Fe varia entre 57.000 e 72.000 daltons aproximadamente, de acordo com o microrganismo a partir da qual foi isolada (50). A análise da sequência de aminoácidos da Proteína Fe, determinada diretamente ou deduzida através da sequência de DNA, de diversos diazotrofos revelou a conservação de 5

resíduos de cisteína e três regiões com potenciais para a ligação de nucleotídeos (41). O estudo da Ressonância de Elétrons Paramagnéticos (EPR) da proteína Fe revelou a presença de um centro [4Fe-4S] responsável pela transferência de elétrons, dependente da hidrólise de ATP, para a proteína MoFe (69, 70, 156).

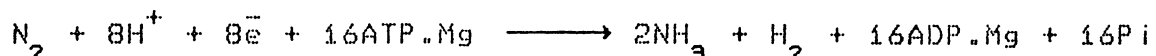
A proteína Fe de *Azotobacter vinelandii* apresenta o centro [4Fe-4S] ligado simetricamente aos resíduos Cys 97 e Cys 132 de cada subunidade (65). MORGAN *et al.* (118) verificou que o centro [4Fe-4S] da proteína Fe, em solução, não está protegido como nas ferredoxinas. Segundo estes autores, esta característica da proteína Fe pode explicar a extrema sensibilidade desta proteína ao oxigênio, além de provavelmente favorecer a transferência de elétrons para a proteína MoFe na forma do complexo nitrogenase (118).

LJONES & BURRIS (100) demonstraram que a transferência de um elétron a partir da proteína Fe para a proteína MoFe está acoplada a hidrólise de 2 equivalentes de MgATP. EADY *et al.* (45) observaram que a hidrólise de ATP ocorre independente da transferência de elétrons da proteína Fe para a proteína MoFe durante o estado pré-estacionário, e sugeriram que esta hidrólise é que aciona uma rápida transferência de elétrons entre estas proteínas durante cada ciclo de oxido-redução do complexo nitrogenase.

Segundo EADY *et al.* (50), o mecanismo de redução de  $N_2$  que permite melhor compreensão é o proposto por LOWE & THORNELEY (169, 102). De acordo com o modelo proposto, a proteína MoFe é reduzida pela proteína Fe durante 8 ciclos



de transferências de elétrons culminando na redução de  $N_2$  a  $2NH_3$ . A estequiometria desta reação, na presença de MgATP e de uma fonte de baixo potencial de redução é a seguinte (41, 72):



Esta reação é inibida "in vitro" por Mg.ADP mas não por  $NH_3$  ou glutamina (41, 69).

A proteína Fe apresenta sítios de ligações para Mg.ATP e Mg.ADP, sendo o sítio de ligação do Mg.ADP um sítio regulatório dependente do estado de oxidação do complexo nitrogenase (26, 70, 117). A presença de sítios de ligação para Mg.ADP na proteína MoFe (117) comprova a formação de uma ponte de ligação entre as proteínas do complexo nitrogenase durante a hidrólise do Mg.ATP, considerando que tanto a proteína Fe quanto a proteína MoFe são incapazes de hidrolisar ATP quando estão dissociadas (43, 94).

## 1.2 OS GENES *nif* EM *Klebsiella pneumoniae*: ORGANIZAÇÃO E FUNÇÃO.

Os estudos genéticos em *Klebsiella pneumoniae*, bactéria de vida livre fixadora de  $N_2$ , têm fornecido as bases para a compreensão da organização, função e regulação dos genes envolvidos na fixação de nitrogênio. Os 21 genes responsáveis pela fixação de  $N_2$ , genes *nif*, em

*Klebsiella pneumoniae* estão organizados em 7 a 9 operons, ocupando aproximadamente 23 kb do genoma (114) entre os genes *hisD* e *shiA* (138).

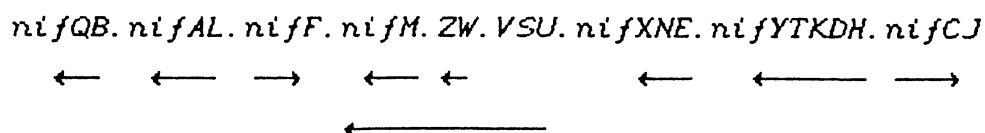


FIGURA 1: ORGANIZAÇÃO DOS GENES *nif* EM *K. pneumoniae*

Os genes *nifHDK* codificam os polipeptídeos da proteína Fe (*nifH*) e das subunidades  $\alpha$  (*nifD*) e  $\beta$  (*nifK*) da proteína MoFe da nitrogenase (34, 76, 92, 114, 122).

O envolvimento de outros genes *nif* no processamento e ativação da nitrogenase tem sido descrito por vários autores. SHAH & BRILL (151) verificaram que a atividade da nitrogenase de alguns mutantes  $Nif^-$  de *Klebsiella pneumoniae* só era observada "in vitro" após a adição do FeMoco. Os produtos dos genes *nifB*, *nifN*, *nifE*, *nifQ*, *nifV* e *nifH* estão envolvidos no processo de biossíntese do FeMoco (77, 87, 111, 114, 142, 160). A semelhança entre os produtos dos genes *nifNE* e *nifDK* sugere que os produtos dos genes *nifNE* (proteína NifN e NifE) formem um complexo capaz de servir como suporte para a síntese do FeMoco (17). BUIKEMA *et al.* (21) sugeriram que o produto do gene *nifB* de *K. pneumoniae* está relacionado com a ligação de metais que participam do sítio ativo da enzima.

Mutantes *nifQ<sup>-</sup>* de *K. pneumoniae* só apresentaram atividade nitrogenásica após a adição de altas concentrações de molibdênio (87). Segundo estes autores, o *nifQ* exerce

um papel muito importante no metabolismo do molibdato, tornando o molibdênio disponível para sua incorporação no FeMoco (87).

O estudo da nitrogenase de mutantes *nifV<sup>-</sup>* revelou que a enzima sintetizada por eles apresentava alteração em relação à especificidade pelo substrato (111). A ativação "in vitro" da apo-proteína MoFe de mutantes *nifB<sup>-</sup>* pelo cofator FeMoco de mutantes *nifV<sup>-</sup>* resultou no fenótipo *NifV<sup>-</sup>*, sugerindo uma possível participação deste cofator no sítio ativo da nitrogenase (77, 160). Uma substância de baixa massa molecular (83), identificada como homocitrato (81), é capaz de corrigir "in vitro" a especificidade da nitrogenase pelo substrato (81, 82, 152). HOOVER *et al.* (81) postularam que o produto do gene *nifV* é uma homocitrato sintase. O papel do homocitrato parece estar relacionado com a estabilização da ligação do substrato ao sítio ativo da nitrogenase ou com a catálise da redução em si (99).

O provável papel do produto do gene *nifH* (proteína Fe), no processamento e ativação da proteína MoFe, seria o de transferir elétrons para o complexo *NifEN* durante a biossíntese do FeMoco, gerando condições de baixo potencial redutor (58, 114, 160).

A dependência do produto do gene *nifM* (Proteína *NifM*) para a formação da proteína Fe ativa tem sido observada por vários autores (107, 141, 142). HOWARD *et al.* (84, 85) sugeriram que o produto do gene *nifM* pode estar envolvido na síntese, inserção e/ou isomerização do grupamento  $Fe_4S_4$  da proteína Fe. A identificação de dois novos genes, *nifW* e

*nifZ* (128) localizados entre os genes *nifV* e *nifM*, gerou dúvida sobre os resultados de HOWARD *et al.* (84) pois os plasmídeos utilizados apresentavam potencial para a síntese do produto do *nifZ*. Entretanto, experimentos conduzidos exclusivamente com os genes *nifH* e *nifM* em *E. coli* confirmaram os experimentos de HOWARD *et al.* (84), revelando que somente estes dois genes são necessários para a formação de uma proteína Fe ativa (129). PAUL & MERRICK (129) observaram ainda que mutantes *nifZ*<sup>-</sup> apresentavam desrepressão mais lenta e maior deficiência em proteína MoFe do que mutantes *nifW*<sup>-</sup>, e concluíram que o produto do gene *nifZ* é mais importante para a rápida desrepressão da nitrogenase do que o produto do *nifW*. Os produtos destes genes, *nifZ* e *nifW*, permanecem indeterminados, apesar deles provavelmente estarem envolvidos na maturação ou estabilidade da proteína MoFe (129).

Os produtos dos genes *nifJ* (piruvato:flavodoxina redutase) e *nifF* (flavodoxina) estão relacionados com o transporte de elétrons para a nitrogenase (30, 153).

GOSINK *et al.* (67) observaram que mutante *nifX*<sup>-</sup> de *K. pneumoniae* apresenta resposta mais lenta do que a estirpe selvagem em relação aos efeitos de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e O<sub>2</sub> como repressores da transcrição e tradução dos genes *nif*. Quando expresso constitutivamente, o gene *nifX* causa completa inibição da atividade da nitrogenase assim como do acúmulo de mRNA *nifHDKTY* e conseqüentemente da síntese das proteínas Fe e MoFe da nitrogenase em *K. pneumoniae* Nif<sup>+</sup>. Este resultado indica que o produto do gene *nifX* está envolvido no processo

de regulação negativa dos genes *nif* (67).

HARRIS *et al.* (74) estudou o efeito da mutação de diferentes genes *nif* na síntese da apo-proteína MoFe em *E. coli*. Estes autores observaram que o produto do gene *nifS* é essencial para a atividade "in vitro" da apo-proteína MoFe em extratos de *E. coli*, ao passo que os produtos do *nifU* e *nifY* só exercem um papel essencial para a síntese da apo-proteína MoFe na ausência do produto do *nifM* (74).

O operon *nifLA* é responsável pela regulação da expressão dos genes *nif*, sendo o produto do gene *nifA* (Proteína NifA) um ativador da transcrição e o produto do *nifL* um anti-ativador (92, 114).

A função específica do gene *nifT* (74) ainda é desconhecida. SHEN *et al.* (154) observaram a presença de uma região potencialmente capaz de codificar uma proteína (ORF - "Open reading Frame") na porção distal do operador do *nifJ*, entretanto a existência deste gene, denominado *nifC*, ainda é discutida (122).

### 1.3 REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES *nif* EM *K. pneumoniae*

A complexidade da regulação dos genes *nif* em *K. pneumoniae*, em resposta a disponibilidade de fontes de nitrogênio fixado e ao oxigênio, tem sido esclarecida nos últimos anos (36, 44).

Durante a década de 70, o produto do gene *glnA* (glutamina sintetase) foi considerado o regulador positivo

da síntese da nitrogenase (52, 165, 171) e ativador da transcrição de outros genes envolvidos no metabolismo de fontes de nitrogênio fixado (108). Entretanto, esta hipótese foi descartada com a descoberta, em diversos microrganismos, dos genes *glnL* (*ntrB*) e *glnG* (*ntrC*), localizados próximo ao gene *glnA* (53, 54, 96, 125).

A terminologia *ntrB* e *ntrC* foi proposta por McFARLAND *et al.* (110), em substituição aos termos *glnL* e *glnG* respectivamente, considerando o envolvimento dos produtos desses genes na regulação da transcrição de genes envolvidos no metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio em *E. coli* e *Salmonella typhimurium*.

A presença desses genes regulatórios, *ntrB* e *ntrC*, em *K. pneumoniae*, sugerida por diversos autores (28, 53, 97) foi comprovada pela clonagem dos genes *glnAntrBC* desse microrganismo (54). Estes autores (54) concluíram, através de estudos de complementação de mutantes, que o produto do gene *ntrC* de *K. pneumoniae* apresenta um papel determinante na ativação da transcrição dos genes *nif* e *glnA*, como proposto por outros autores (1, 110), ao passo que o produto do gene *ntrB* é dispensável durante este processo de ativação.

Atualmente se sabe que a regulação da transcrição dos genes *nif* em *Klebsiella pneumoniae* ocorre em dois níveis: a nível específico pelos genes *nifL* e *nifA*, e a nível do metabolismo geral de nitrogênio pelos genes do sistema *ntr* (*ntrA*, *ntrB* e *ntrC*), como esquematizado na figura 2 (35, 36, 113, 114).

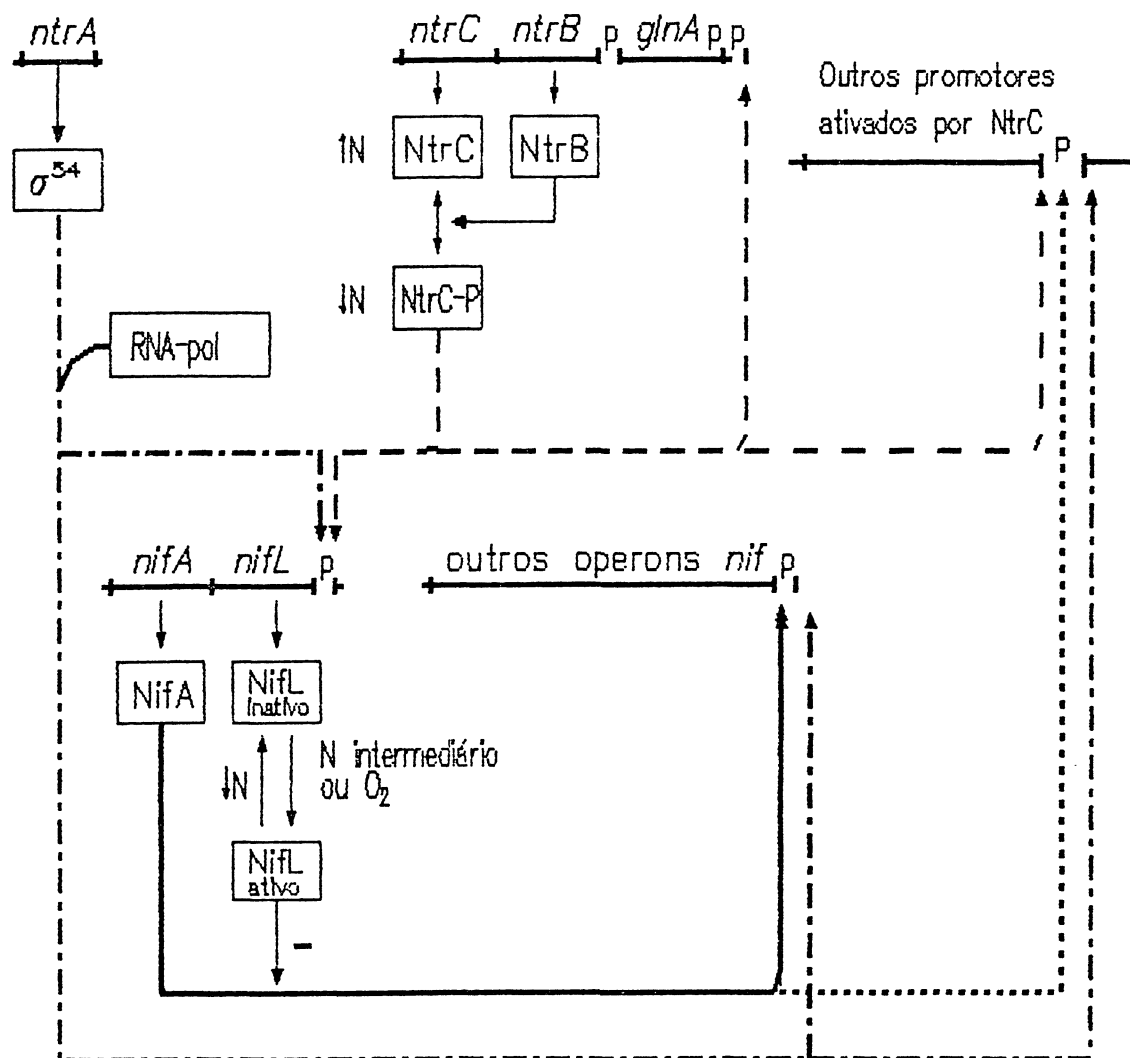


FIGURA 2: MODELO PROPOSTO PARA A REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES *nif* EM *Klebsiella pneumoniae*

Este modelo de regulação da transcrição dos genes *nif* de *K. pneumoniae* foi proposto inicialmente por Merrick (113) e modificado com novas descobertas (114).

Segundo BUCHANAN-WOLLASTON *et al.* (18, 19), a regulação da transcrição dos genes *nif* de *K. pneumoniae* é mediada pelos genes do operon *nifLA*, de acordo com as concentrações de oxigênio e fontes de nitrogênio fixado. Em concentrações limitantes de oxigênio e/ou  $\text{NH}_4^+$ , a proteína NifA ativa a transcrição dos outros genes *nif*, inclusive do próprio operon *nifLA* (19, 113). A ativação dos operons *nif* e *ntr* requer a presença do produto do gene *ntrA*, o fator  $\sigma^{54}$  da RNA polimerase (28, 113, 115, 123). O produto do gene *nifL*, por sua vez, apesar do seu papel como repressor da transcrição dos genes *nif* na presença de  $\text{NH}_4^+$  ou níveis inibitórios de oxigênio, se encontra presente na célula mesmo em condições ótimas para a expressão dos genes *nif* (19). Este fato tem levado vários autores (18, 40) a sugerirem que o produto do *nifL* (NifL) exerça uma ação moduladora direta sobre a proteína NifA, impedindo dessa forma que ocorra a ativação da transcrição dos genes *nif*.

O envolvimento do produto do gene *ntrC* na ativação da transcrição do operon *nifLA* está relacionado com a disponibilidade de nitrogênio na célula, podendo agir como ativador ou repressor da transcrição desses genes. Em condições ótimas para a expressão dos genes *nif*, isto é na presença de baixas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ , o produto do gene *ntrC* é fosforilado e se torna ativo para se ligar próximo ao promotor e promover a transcrição do operon *nifLA* (35, 38, 39, 114, 123).

A atividade da proteína NtrC é modulada diretamente pelo produto do gene *ntrB* (36, 114). Segundo DRUMMOND &



WOOTTON (40), a proteína NtrB funciona como uma proteína sensora e desempenha dupla função em relação a proteína NtrC, catalisando a sua fosforilação (NtrC-P, ativa) ou desfosforilação (NtrC, inativa). A ação moduladora da proteína NtrB é determinada pelo produto do gene *glnB*, a proteína P<sub>II</sub>. Esta proteína na sua forma não uridililada (P<sub>II</sub>) se liga a proteína NtrB estimulando a sua atividade fosfatásica e conseqüentemente, a inativação do NtrC-P. Em condições limitantes de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, o produto do gene *glnD* catalisa a uridililação (uridililtransferase - UTase) da proteína P<sub>II</sub>. A proteína P<sub>II</sub> uridililada (P<sub>II</sub>-UMP) se dissocia da proteína NtrB permitindo que esta proteína (NtrB) promova a fosforilação da proteína NtrC, tornando-a capaz de ativar a transcrição do operon *nifLA* (20, 121).

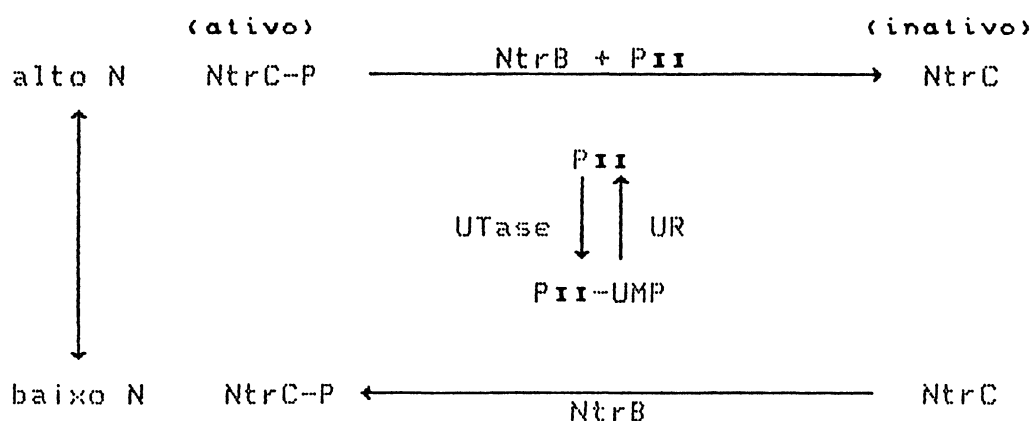


FIGURA 3: MODELO PARA A REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA NtrC EM RELAÇÃO AO NÍVEL DE NITROGÊNIO

Os promotores ativados pelas proteínas NifA e NtrC, promotores *nif* e *ntr*, apresentam uma sequência de

nucleotídeos característica localizada entre as posições -27 e -16 em relação ao sítio de origem de transcrição. Esta sequência, CTGG...N<sub>8</sub>...TTGCA, apresenta-se altamente conservada nesses promotores (8, 23, 38, 123). Os nucleotídeos GG e GC, localizados nas posições -25/-24 e -13/-12 respectivamente, são invariáveis e essenciais para a atividade deste promotor (38, 68). Assim, estes promotores são também conhecidos como promotores -24/-12. Outra característica marcante deste promotor é o requerimento de um fator sigma especial (fator  $\sigma^{54}$ ), codificado pelo gene *ntrA* (*rpoN*), que é responsável pelo reconhecimento específico dos promotores -24/-12 pela RNA polimerase (79, 116).

Sequências ativadoras a 5' ou UAS, localizadas cerca de 100 pb antes do início de transcrição, são essenciais para a ativação dos genes *nif* pela proteína NifA e NtrC (19, 34, 124). A sequência de consenso para a ligação da proteína NifA é 5'-G<sub>A</sub>...N<sub>7</sub>...IGI...N<sub>4</sub>...T...N<sub>5</sub>...ACA, sendo os nucleotídeos sublinhados os conservados e envolvidos diretamente na interação com a proteína ativadora NifA (19). No caso do sítio de ligação para a proteína NtrC, DIXON (34) propôs uma sequência de consenso, com base na conservação da sequência de nucleotídeos de diversos promotores regulados pelo sistema *ntr*. Esta sequência apresenta natureza palindrômica, 5' IGCACTA<sup>AAA</sup><sub>TTT</sub> TGGIGCAA 3', e portanto pode acomodar um dímero de subunidades idênticas num arranjo direto ou invertido (86).

### 1.3.1 Regulação da ativação dos genes envolvidos na fixação de nitrogênio em outros microrganismos

*Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, bactérias que fixam nitrogênio em simbiose com leguminosas, além de apresentarem os genes *nif* também apresentam genes que desempenham um papel essencial para a fixação simbiótica de nitrogênio denominados genes *fix*. A presença de promotores -24/-12 e UAS (Sequências ativadas a 5') nos genes *nif* e *fix* de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* indicam que a regulação da transcrição desses genes é dependente dos produtos dos genes *ntrA* (*rpoN*) e *nifA* (59, 68). SZETO *et al.* (166) observaram que em *R. meliloti* cultivado sob condições limitantes de nitrogênio, a transcrição do gene *ntrC* é acompanhada do acúmulo de RNA *nifHD*, *fixABCX*, *nifA* e *nifB*. Entretanto, esses autores concluíram que o produto do gene *ntrC* não exerce um papel essencial para a fixação simbiótica de nitrogênio, visto que mutações no gene *ntrC*, causadas pela inserção do Tn5, resultaram em mutantes *R. meliloti* (*ntrC::Tn5*) capazes de produzirem nódulos eficientes em alfafa (*Medicago sativa*) (166).

O modelo em cascata proposto por KAHN *et al.* (90), modificado recentemente por de BRUIJN *et al.* (29), para a ativação da transcrição dos genes *nif* em *R. meliloti* sugere que os produtos dos genes *fixLJ* desempenham papel análogo aos dos produtos dos genes *ntrBC* de *K. pneumoniae* (Figura 4). Contudo, considerando-se que tanto a expressão do gene *nifA* (33) quanto do gene *fixN* (27) são reguladas pelo



oxigênio e que mutantes *fixL*<sup>-</sup> expressam constitutivamente (tanto em condições aeróbicas quanto microaeróbicas) o produto do gene *fixN*, estes autores (90) concluíram que o sistema geral de regulação da transcrição dos genes *nif* de *Rhizobium* em simbiose é dependente da concentração de oxigênio e não da fonte de nitrogênio fixado como em *K. pneumoniae*. Em resposta à concentração de oxigênio celular, o produto do gene *fixL* modifica a proteína FixJ, provavelmente por fosforilação. A proteína FixJ\* (modificada) regula positivamente a transcrição dos genes *nifA* e *fixK*. A proteína NifA ativa a transcrição dos outros genes *nif* e do operon *fixABCX*. Ao passo que, a proteína FixK está envolvida na regulação negativa da transcrição do gene *nifA* e do seu gene estrutural (*fixK*), além de regular positivamente a transcrição do gene *fixN* em simbiose (29).

No caso de *Bradyrhizobium japonicum*, os níveis de oxigênio parecem não afetar a ativação da transcrição do gene *nifA*. Segundo THÖNY *et al.* (167) o promotor -24/-12 seria ativado positivamente por uma proteína ainda não identificada que se ligaria a uma hipotética sequência ativadora. Após a ativação da transcrição do gene *nifA*, o seu produto (proteína NifA) seria o responsável pela transcrição dos outros operons *nif* e *fix* em condições de microaerofilia ou anaerobiose (60, 167, 168).

Em *Azotobacter vinelandii* e *A. chroococcum* além da nitrogenase clássica foram descobertas recentemente duas outras nitrogenases, a vanádio nitrogenase e Fe nitrogenase (10, 11, 42, 47, 49, 126, 127, 139). Portanto, em

*A. vinelandii* e *A. chroococcum*, além dos genes *nif* são encontrados os genes *vnf* (48, 89, 144, 145), que codificam a vanádio nitrogenase, enquanto que a presença de genes codificadores para a Fe nitrogenase (genes *anf*) só foi observada em *A. vinelandii* (89). A expressão dos genes *nif* em *Azotobacter* é dependente do produto do gene *nifA* e requer o fator  $\sigma^{54}$  para a ação da RNA polimerase (93, 114). Por sua vez, os genes *vnf* e *anf* também apresentam promotores do tipo -24/-12 além de recentemente terem sido clonados genes homólogos ao *nifA*, denominados *vnfA* e *anfA* (88).

TOUKDARIAN & KENNEDY (170) clonaram os genes *glnAntrBC* de *A. vinelandii* e verificaram que o produto do gene *ntrC* não desempenhava um papel essencial para a ativação da transcrição dos genes *nif* em condições limitantes de molibdênio. Entretanto, BALI *et al.* (5) demonstraram que a expressão da V-nitrogenase é dependente do produto do gene *ntrC*. Segundo esses autores (5), provavelmente o gene *ntrC* desempenha indiretamente o seu papel na regulação da transcrição dos genes da V-nitrogenase, sendo o seu produto necessário para a expressão de um outro gene ativador ainda não definido. Além dos genes reguladores homólogos aos de *K. pneumoniae*, foi identificado em *A. vinelandii* e *A. chroococcum* um outro gene denominado *nfrX*, cuja mutação implica no fenótipo  $Nif^-$  para as nitrogenases dependente de Mo e Fe, mas não afeta a atividade da V-nitrogenase (149). Apesar de mutantes neste gene serem complementados para a Mo-nitrogenase pelo gene *nifA* de *K. pneumoniae*, a sua verdadeira função ainda permanece desconhecida (5, 148,

149).

O envolvimento dos genes *nifA* e *ntrC* na regulação da transcrição dos genes *nif* de *Azospirillum brasilense* tem sido elucidado através da complementação genética de mutantes regulatórios (132, 133) e clonagem do gene *nifA* (95). PEDROSA & YATES (132, 133) isolaram duas classes de mutantes regulatórios de *Azospirillum brasilense*. Os mutantes FP8 e FP9, apresentam fenótipo  $Nif^-$ , não crescem em  $NO_3^-$  como fonte de nitrogênio e são complementados pelos plasmídeos pCK3 (*nifA<sup>c</sup>* de *K. pneumoniae*) e pGE10 (*glnAntrBC* de *K. pneumoniae*). Entretanto, o plasmídeo pGE50 (*ntrC::Tn5*) não foi capaz de complementar a mutação, sugerindo que estes mutantes apresentassem o genótipo  $ntrC^-$  e que o produto deste gene estaria envolvido na regulação da transcrição do gene *nifA* neste microrganismo, como em *K. pneumoniae*. O mutante FP10, por sua vez só foi complementado pelo plasmídeo pCK3 e portanto foi considerado um mutante *nifA<sup>-</sup>* (133). Os autores sugeriram que a regulação dos genes *nif* em *Azospirillum brasilense* era análoga à de *K. pneumoniae* e envolveria o produto dos genes *nifA* e *ntrC*.

FOGHER *et al.* (61) isolaram, a partir de um banco genômico de *A. brasilense*, o plasmídeo pAB441 capaz de complementar o mutante *A. brasilense* 7029 (64), auxotrofo para glutamina e incapaz de desreprimir a nitrogenase. A análise estrutural desse plasmídeo revelou a presença do gene *glnA*, homólogo ao de *K. pneumoniae*, mas não do gene *ntrC* (14, 15), indicando que em *A. brasilense* o gene *glnA* não está localizado próximo do gene *ntrC*, como ocorre em

*K. pneumoniae* (53) e *Azotobacter vinelandii* (170).

#### 1.4 *Herbaspirillum seropedicae*: DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE E AVANÇOS NOS ESTUDOS FISIOLÓGICO E GENÉTICO DESTE MICRORGANISMO.

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria de vida livre, isolada da rizosfera e de raízes de Gramineae, capaz de utilizar  $N_2$  como fonte de N para a biossíntese de seus compostos orgânicos (3).

Inicialmente, *H. seropedicae* foi classificado como uma nova espécie de *Azospirillum* devido as semelhanças morfológicas e fisiológicas observadas (3). Entretanto, resultados de hibridização rRNA-DNA revelaram baixos níveis de complementariedade ( $\leq 22\%$ ) entre *H. seropedicae* e três espécies do gênero *Azospirillum* (*A. lipoferum*, *A. brasilense* e *A. amazonense*) (55). Com base nestes resultados e na baixa % de homologia de DNA observada entre *H. seropedicae* e *Azospirillum* spp., BALDANI *et al.* (4) propuseram a criação de um novo gênero, *Herbaspirillum*.

*Herbaspirillum seropedicae* é Gram-negativo, móvel, vibrióide e capaz de fixar nitrogênio sob condições microaeróbicas (4). A atividade da nitrogenase de *H. seropedicae* é tolerante à variações de pH na faixa de 5.0-8.0 e, é também menos sensível ao  $O_2$  que aquela de *Azospirillum* spp. (4), ambos "in vivo".

A associação de *H. seropedicae* com cereais de



importância econômica (3, 134) tem despertado o interesse no estudo fisiológico e genético deste microrganismo.

O mecanismo de desligamento reversível da nitrogenase ("switch-off"), iniciado pela adição de íons amônio em diazotrofos fotossintéticos e *Azospirillum* spp (37, 63, 75, 91, 138), também ocorre em *H. seropedicae* (62). Entretanto, a nitrogenase de *Herbaspirillum seropedicae*, obtida nas mesmas condições em que aquelas de *R. rubrum* e *A. lipoferum*, apresenta atividade "in vitro", independente de reativação (62). A análise do padrão eletroforético da nitrogenase de *H. seropedicae* sugere que a inibição da atividade da nitrogenase por íons amônio "in vivo" não envolve modificação covalente da proteína Fe por ADP-ribosilação (62) como descrito para *Rhodospirillum rubrum* (90) e *Azospirillum lipoferum* (75). A ADP-ribosilação (inativação) e a remoção do grupo ADP-ribosil da proteína Fe (reativação) da nitrogenase é catalizada pelos produtos dos genes *draT* e *draG*, respectivamente. A proteína DraT, dinitrogenase redutase (proteína Fe) ADP-ribosil transferase, catalisa a transferência do grupo ADP-ribose do  $\text{NAD}^+$  para uma das subunidades da proteína Fe, inativando-a (91, 103, 137). Por sua vez a proteína DraG, glicohidrolase ativadora da dinitrogenase redutase, catalisa a remoção do grupo ADP-ribosil na presença de MgATP e  $\text{Mn}^{2+}$  (105, 106, 147). Por outro lado, a hibridização do DNA de *H. seropedicae* com sondas dos genes *draG-draT* de *R. rubrum* não detectaram a presença destes genes em *H. seropedicae*, confirmando que a

nitrogenase deste microrganismo não é inativada por modificação covalente dependente dos produtos desses genes (62).

Análises de complementariedade DNA-rRNA mostrou que *H. seropedicae* apresenta estreita relação taxonômica com *Pseudomonas rubrisubalbicans*, bactéria fitopatogênica causadora da estria mosqueada em cana-de-açúcar (66). PIMENTEL *et al.* (136) estudaram o efeito da infecção de *H. seropedicae* ou *P. rubrisubalbicans* em cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. cvB4362), sorgo (*Sorghum bicolor*) e quicuío (*Pennisetum purpureum*). Os resultados obtidos revelaram que o sorgo e o quicuío apresentaram sintomas da doença após infecção com *H. seropedicae* ou *P. rubrisubalbicans*, ao passo que a cana-de-açúcar não desenvolveu sintomas após a infecção com *H. seropedicae* (136).

Recentemente, o gene *nifA* e parte do gene *nifB* de *H. seropedicae* foram clonados e sequenciados (161, 162, 163), indicando que a ativação da transcrição dos genes *nif* neste microrganismo é dependente da proteína NifA como em *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Azospirillum* e outros diazotrofos (131, 161, 163). Além disso, análise da sequência de nucleotídeos da região do promotor do gene *nifA* de *H. seropedicae* revelou a presença de potenciais sítios de ligação para os produtos do gene *nifA* (auto-ativação) e do gene *ntnC* (163). Estes resultados sugerem o envolvimento de genes do sistema *ntn* na regulação da transcrição do gene *nifA* de *H. seropedicae* como foi proposto por PEDROSA *et al.* (131) com base nos resultados obtidos em estudo de

complementação de mutantes *ntrC*<sup>-</sup>.

O objetivo do presente trabalho foi o isolamento e caracterização dos genes do sistema *ntr*, envolvidos na regulação da transcrição dos genes *nif* de *Herbaspirillum seropedicae*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As bactérias e plasmídeos utilizados estão listados na tabela 1.

#### 2.1.1 Manutenção dos estoques das estirpes bacterianas

As estirpes de *Azospirillum brasilense* e *E. coli* foram estocadas em glicerol 50% a  $-20^{\circ}\text{C}$ , que permite manutenção da viabilidade durante pelo menos 2 anos.

### 2.2 MEIOS DE CULTURA

O meio de cultura NFbHP utilizado para o crescimento de *Azospirillum brasilense* (133) apresenta a seguinte composição básica:

	$\text{g.l}^{-1}$
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,0
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	6,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
NaCl	0,1
$\text{CaCl}_2$	0,02

TABELA 1: BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

Estirpes	Genótipo/Fenótipo	Referência
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
Z78	Nif <sup>+</sup>	4
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 (ATCC 29145)		
FP2	Nif <sup>+</sup> Sm <sup>R</sup> Nal <sup>R</sup>	133
FP8	ntrC <sup>-</sup> Sm <sup>R</sup> Nal <sup>R</sup>	133
FP9	ntrC <sup>-</sup> Sm <sup>R</sup> Nal <sup>R</sup>	133
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	<i>pro leu thi lacY endoI recA13</i> r <sup>-</sup> m <sup>-</sup> Sm <sup>R</sup>	32
DH5	<i>recA1 supE44 thi1 r<sup>-</sup> m<sup>+</sup> Nal<sup>R</sup></i>	135
1230	<i>pro met recA<sup>-</sup> Sm<sup>R</sup></i>	A.W.B. Johnston
MC1061	<i>recA<sup>+</sup> tra<sup>-</sup> mob<sup>-</sup> hsdR hsdM<sup>+</sup> Sm<sup>R</sup></i>	24
ET8556	<i>ntrC 1488 / Nal<sup>R</sup> Gln<sup>-</sup>, Arg<sup>-</sup></i>	170
plasmídeo		
pLAFR3	IncP-1 Tc <sup>R</sup> λcos	164
pRK2013	Km <sup>R</sup> tra <sup>+</sup>	57
R68.45	IncP-1 km <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> Cb <sup>R</sup> tra <sup>+</sup> mob <sup>+</sup>	71
pBR322	Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	13
pAT512	<i>glnAntrBC</i>	170
pKRT1 a pKRT5	pLAFR3::DNA de <i>H. seropedicae</i>	Este trabalho

Ácido nitrilo-triacético	0,056
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02
Lactato de sódio	5,0
Micro-elementos	$\text{mg.l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0
$\text{MnSO}_4$	2,35
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2,8
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,24
Biotina	0,1

Os fosfatos foram autoclavados separadamente e o pH do meio foi ajustado para 6.8 antes da esterilização. A fonte de nitrogênio utilizada foi  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mM), e o meio era denominado NFbHPN.

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Broth (LB) como descrito por Maniatis et al. (109):

	$\text{g.l}^{-1}$
Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	10

O pH do meio foi ajustado com NaOH 2M para 7,5.

O meio de cultura mínimo M-9 (109) foi utilizado para a seleção dos transconjugantes de *E. coli* ET8556, obtidos após conjugação desse mutante com o banco genômico de *Herbaspirillum seropedicae*. A composição do meio M-9 é a seguinte:

	$\text{g.l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	6
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3

NaCl 0,5

O pH foi corrigido para 7,4 com NaOH 2M e após autoclavação foram adicionados:

Solução estoque	ml.l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> 1M	2,0
CaCl <sub>2</sub> 1M	0,1
D-Glucose 20%	10,0

A fonte de nitrogênio utilizada para a seleção dos transconjugantes que apresentaram complementação da mutação *ntxC<sup>-</sup>* foi L-arginina na concentração final de 0,1%.

Para obtenção dos meios sólidos e semi-sólidos, os meios líquidos foram acrescidos de 15,0 g.l<sup>-1</sup> e 1,5 g.l<sup>-1</sup> de agar, respectivamente. O meio LB acrescido de agar foi denominado meio Luria-Agar ou LA.

O meio LA:NfbHP foi preparado pela mistura de partes iguais dos meios LA e NfbHP sólido (1:1).

Todos os meios foram esterilizados em autoclave a 120°C e 1 atmosfera de pressão por 20 minutos. A D-glucose e a L-arginina foram esterilizadas por filtração em filtro Millipore HAWP (0,45 μ).

### 2.3 ANTIBIÓTICOS

As soluções estoques de antibióticos utilizadas, preparadas como descrito por MANIATIS *et al.* (109), foram as seguintes:

	mg.ml <sup>-1</sup>
Tetraciclina (Tc)	10

Ácido Nalidíxico (Na1)	10
Estreptomicina (Sm)	20
Canamicina (Km)	20

Cada uma dessas soluções foi esterilizada por filtração em filtro Millipore HAWP (0,45  $\mu$ ) e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os antibióticos foram utilizados de acordo com a bactéria e o experimento realizado.

#### 2.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Todas as culturas foram incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  ou em alguns casos a  $37^{\circ}\text{C}$  de acordo com o objetivo do experimento. Os cultivos foram realizados em 50 ml ou 10 ml de meio de cultura líquido contidos em frascos Erlenmeyer de 125 ml ou em frascos tipo penicilina de 60 ml, respectivamente. As culturas foram incubadas em agitador rotatório a 130 rpm até atingir  $A_{540\text{nm}}$  de 2,0, ou a densidade de células especificada para o experimento.

Frascos de 10 ml contendo 4 ml de meio de cultura NFbHP semi-sólido foram inoculados profundamente com 50  $\mu\text{l}$  de cultura de *Azospirillum brasilense* e incubados a  $30^{\circ}\text{C}$  sem agitação. Após a formação de uma película de células próxima a superfície do meio, os frascos foram vedados com rolhas de borracha e testados para fixação de nitrogênio.



## 2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE

A atividade da nitrogenase foi determinada pela medida da velocidade de redução de acetileno a etileno através de cromatografia gasosa (32, 150).

Culturas em meio semi-sólido NFBHP - sem nitrogênio fixado, foram injetadas com um volume de acetileno equivalente a 10% do volume da fase gasosa do frasco. Amostras da fase gasosa (0,5ml), coletadas em intervalos de tempos determinados foram analisadas em um cromatógrafo Varian 2440D equipado com coluna Porapak N e detector de ionização de chama. O gás de arraste foi nitrogênio super seco ( $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ). As temperaturas do injetador e da coluna foram mantidas em  $128^\circ\text{C}$  enquanto que a do detector foi mantida em  $140^\circ\text{C}$ . Para o cálculo da concentração de etileno formado, foi utilizado o etileno padrão de 100 ppm fornecido pela White Martins S/A. De acordo com a lei dos gases ideais, cada alíquota de 0,5 ml deste padrão contém 2,232 nmoles de etileno, a 1 atm e  $25^\circ\text{C}$ .

A atividade específica da nitrogenase foi expressa em nanomoles de etileno formado por miligrama de proteína e por hora.

## 2.6 REAGENTES

Os seguintes reagentes foram adquiridos de Sigma Chemical Company: ácido nalidíxico, canamicina, cloridrato

de tetraciclina, estreptomicina, glutamato monossódico, agarose, 8-hidroxiquinoleína, SDS, Ficoll, DNA de esperma de salmão, polivinilpirrolidona, formamida e soroalbumina bovina. As endonucleases e os tampões de restrição foram adquiridas de Boehringer Company e do Bethesda Research Laboratories (BRL) (7, 12). EDTA foi adquirido de Sigma ou da British Drug House (BDH). Fenol foi adquirido de E. Merck ou da BDH. Padrão de massa molecular 1 kb ladder foi adquirido da BRL (7).

Os demais reagentes químicos utilizados provieram de diversas fontes, todos pró-análise e tidos como puros.

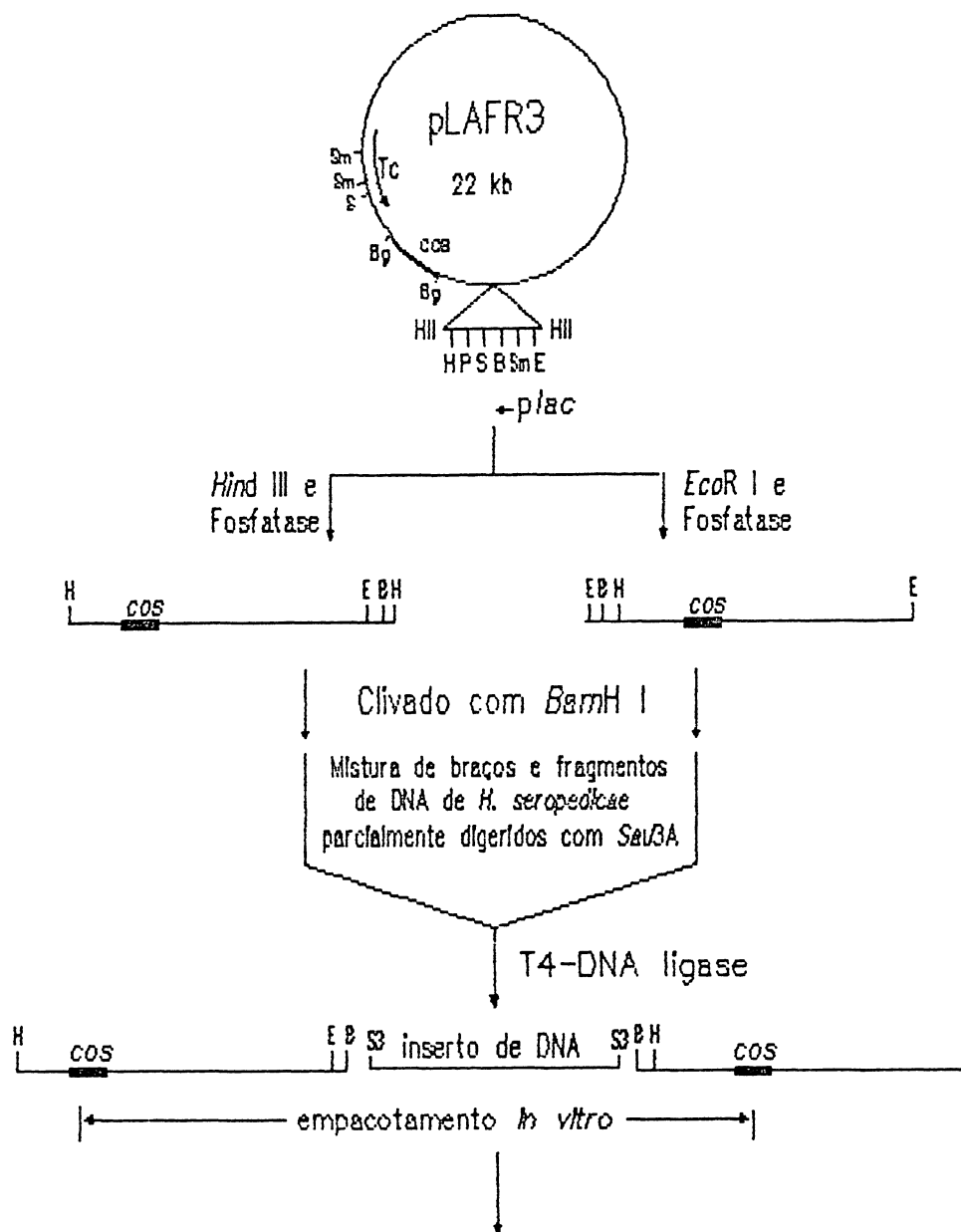
Os gases argônio, nitrogênio super seco, oxigênio, acetileno, etileno padrão (100 ppm), hidrogênio e ar comprimido foram adquiridos da White Martins S/A.

## 2.7 CONJUGAÇÃO

A transferência de plasmídeo por conjugação simples ou tríplice foi realizada como descrito por PEDROSA & YATES (133). As culturas, utilizadas para as conjugações, se apresentavam em fase logarítmica de crescimento.

### 2.7.1 Banco de genes de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78

Um banco de genes foi construído no vetor PLAFR3, pelo método descrito por STASKAWICZ *et al.* (164). Os



Transfectado em *E. coli* HB101 e selecionado para resistência à tetraciclina

FIGURA 5: ESQUEMA DA CONSTRUÇÃO DO BANCO GENÔMICO DE *H. seropedicae* ESTIRPE Z78 UTILIZANDO COMO VETOR O COSMÍDEO pLAFR3 (164).

fragmentos de tamanho variando entre 17 a 28 kb, obtidos pela clivagem parcial do DNA total de *Herbaspirillum seropedicae* com a endonuclease de restrição *Sau* 3A, foram clonados no sítio *Bam*H I do pLAFR3. Os plasmídeos recombinantes obtidos, foram empacotados "in vitro" e posteriormente transfetados para *E. coli* HB101 (Figura 5). A representatividade do banco foi determinada através da aplicação da seguinte fórmula (25):

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

calculando para P,

$$P = 1 - e^{-N \cdot \ln(1-f)}$$

onde P é a probabilidade, *f* é a fração do genoma em um único recombinante e N é o número necessário de recombinantes.

### 2.7.2 Isolamento de plasmídeos recombinantes do banco genômico capazes de complementar um mutante *ntnC*<sup>-</sup> de *E. coli*

A conjugação tríplice do banco genômico de *Herbaspirillum seropedicae* em *E. coli* HB101 com a estirpe *E. coli* ET8556 foi realizada na presença do plasmídeo mobilizador pRK2013, mantido em *E. coli* HB101. Este plasmídeo mobilizador contém os genes *tra* e o seu replicon (Col E1) (57) é instável em *Azospirillum brasilense*.

transconjugantes.

### 2.7.3 Transferência de plasmídeos recombinantes entre estirpes de *E. coli* e mutantes *ntrC*<sup>-</sup> de *A. brasilense*

A conjugação do transformante *E. coli* DH5, contendo os 5 plasmídeos recombinantes que foram capazes de complementar *E. coli* ET8556, com os mutantes *ntrC*<sup>-</sup> de *Azospirillum brasilense* FP8 ou FP9 (133) também foi realizada na presença do plasmídeo mobilizador pRK2013. O procedimento para a obtenção dos transconjugantes foi semelhante ao descrito para a conjugação do mutante de *E. coli* com o banco genômico, exceto em termos da proporção da mistura e dos meios de cultura utilizados. As culturas de *E. coli* DH5 transformadas com os cinco plasmídeos recombinantes, *E. coli* (pRK2013) e *Azospirillum brasilense* FP8 ou FP9 foram misturadas na proporção de 1:1:10 (v/v/v). O meio utilizado para ressuspender as células das misturas de conjugação foi o LB/NFbHP (1:1) sem antibiótico e as massas de células foram obtidas em placas contendo LA/NFbHPN.

Os transconjugantes de *A. brasilense* FP8 e FP9, contendo os plasmídeos recombinantes foram selecionados pela marca de resistência do vetor (Tc<sup>R</sup>), em placas contendo meio de cultura sólido NFbHPN na presença de Sm (50 µg.ml<sup>-1</sup>) e Tc (10 µg.ml<sup>-1</sup>). O cálculo da frequência de conjugação foi feito em relação ao número de total de transconjugantes e ao número total de *A. brasilense* viáveis, obtidos em placas

contendo NFbHPN na presença de Sm ( $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ). Os transconjugantes foram todos testados para fixação de nitrogênio como descrito no item 2.5.

#### 2.7.4 Eliminação do plasmídeo recombinante pelo plasmídeo R68.45

As conjugações simples para eliminação do plasmídeo recombinante foram realizadas com culturas, em fase logarítmica de crescimento, de *E. coli* 1230 (R68.45) e dos transconjugantes *Azospirillum brasilense* FP8 ou FP9, contendo o plasmídeo recombinante.

As misturas de conjugação foram feitas pela adição de 1 volume de cultura de *E. coli* 1230 (R68.45) à 10 volumes da cultura dos transconjugantes *Azospirillum brasilense* FP8 ou FP9. As misturas de conjugações foram centrifugadas em Spin I a  $4^{\circ}\text{C}$  por 2 min, as células foram ressuspensas em  $20 \mu\text{l}$  de LB/NFbHP (1:1) e incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Após este período, as misturas de conjugação foram distribuídas em placas contendo meio de cultura LA/NFbHPN sem antibiótico e incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 18 - 20 horas. A massa bacteriana de cada mistura de conjugação foi raspada, diluída em série ( $10^{-2}$  -  $10^{-8}$ ) e plaqueada em meio de cultura sólido NFbHPN na presença de Nal ( $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) e Km ( $75 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) para seleção dos transconjugantes *A. brasilense* (R68.45) e em meio NFbHPN na presença de Nal ( $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) para contagem do número total de *A. brasilense* viáveis. O cálculo da frequência de conjugação não foi considerado neste caso.

## 2.8 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEO

### 2.8.1 Minipreparação de plasmídeos de *E. coli*

O isolamento de plasmídeos de *E. coli* em pequena escala foi feito pelo método da lise alcalina descrita por BIRNBOIM & DOLY (9, 109).

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio de cultura LB na presença de antibiótico, de acordo com a marca de resistência do plasmídeo e da bactéria. As culturas foram incubadas a 30°C com agitação até a saturação ( $A_{540 \text{ nm}} \cong 2,0$ ). Aliquotas de 1 ml de cada cultura foram coletadas, centrifugadas em Spin I a 4°C por 2 min. As células foram ressuspensas em 100  $\mu$ l de solução GET (D-glucose 50 mM, NaEDTA 10 mM e Tris-HCl 25 mM pH 8,0) e em seguida foram adicionados 200  $\mu$ l de mistura de lise (NaOH 0,8% e SDS 0,1%), recém preparada. As preparações homogeneizadas foram deixadas em repouso por 5 min a temperatura ambiente ( $\cong 20^\circ\text{C}$ ). A precipitação de proteínas, SDS e DNA desnaturado foi realizada pela adição de 158  $\mu$ l de solução KAcF (acetato de potássio 3 M e ácido fórmico 1,8 M), e a preparação após homogeneização completa foi mantida em banho de gelo por 15 min. A seguir, sem retirar a preparação do banho de gelo, foram adicionados 450  $\mu$ l de mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) para extração do precipitado formado na etapa anterior. As fases foram homogeneizadas e as preparações foram mantidas no banho de gelo por mais 5 min. Ao término deste período, as

preparações foram centrifugadas em Spin I a 4°C por 10 min e à fase aquosa coletada foram adicionados 820  $\mu$ l de etanol absoluto para precipitação do DNA. O sedimento obtido após centrifugação em Spin I a 4°C por 10 min foi lavado com 1 ml de etanol 80%, seco com fluxo de argônio e dissolvido em 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

### 2.8.2 Minipreparação de plasmídeos de *A. brasilense*

Os plasmídeos de *Azospirillum brasilense* foram purificados pelo método descrito por ROBSON *et al.* (143).

Alíquotas de 1,5 ml de culturas *A. brasilense*, de densidade de células equivalente a  $A_{540\text{ nm}} \approx 1,0$ , cultivados em meio de cultura NFBHPN NaI (10  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) na presença de Tc (15  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) ou Km (75  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>), foram coletadas e centrifugadas em Spin I a 4°C por 2 min. O sedimento de células obtido foi ressuspensão em T<sub>50</sub>E<sub>20</sub> (Tris-HCl 50 mM e NaEDTA 20 mM pH 8,0) e a lise celular foi obtida pela adição de 950  $\mu$ l de mistura de lise (NaEDTA 50 mM contendo 1% de SDS e pH ajustado para 12,6 com NaOH 2N). As preparações foram homogeneizadas com cuidado, para evitar a quebra dos plasmídeos originais do *A. brasilense*, e incubadas a 34°C por 25 min. A precipitação de proteínas, SDS e DNA desnaturado foi realizada pela adição de 170  $\mu$ l de solução de neutralização (Tris-HCl 0,7 M e NaCl 3,5 M pH 8,0) e incubação por 30 min em banho de gelo. Após centrifugação a 4°C por 10 min, foram adicionados ao sobrenadante de cada preparação 770  $\mu$ l de solução



etanol:acetato (10 volumes de etanol absoluto: 1 volume de acetato de sódio 3 M pH 8,0) e as preparações foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Ao término deste período, as preparações foram centrifugadas e o sedimento quase transparente obtido foi secado a vácuo e ressuspense em  $20\ \mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada estéril ou  $\text{T}_{10}\text{E}_1$ .

## 2.9 TRANSFORMAÇÃO

### 2.9.1 Preparo de células competentes de *E. coli*

A estirpe *E. coli* DH5 foi cultivada em meio LB na presença de  $\text{NaI}$  ( $10\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a  $37^{\circ}\text{C}$  com agitação durante 18 horas. Para o preparo de células competentes foram inoculados  $500\ \mu\text{l}$  dessa cultura em  $50\ \text{ml}$  de meio de cultura LB  $\text{NaI}^{10}$  contidos em frascos Erlenmeyer de  $125\ \text{ml}$ . A cultura de *E. coli* foi incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  sob forte agitação ( $\approx 200\ \text{rpm}$ ) e após 2 horas de incubação foi feito acompanhamento da Absorbância a  $540\ \text{nm}$  em intervalos de  $30\ \text{min}$  por 1-2 horas. A cultura, após atingir  $A_{540\text{nm}} \approx 0,3$ , foi resfriada em banho de gelo durante  $15\ \text{min}$  e centrifugada ( $5000\ \text{rpm}/10\ \text{min}$  a  $5^{\circ}\text{C}$ ). As células foram ressuspensas em  $5\ \text{ml}$  de  $\text{MgCl}_2\ 0,1\ \text{M}$  estéril e em seguida essa suspensão foi centrifugada. O sedimento de células obtido foi ressuspense em  $5\ \text{ml}$  de solução de transformação ( $\text{CaCl}_2\ 0,1\ \text{M}$ ) e a suspensão foi incubada em banho de gelo durante  $20\ \text{min}$ . Ao fim deste período, as células foram sedimentadas por centrifugação e

ressuspensas cuidadosamente em 1,6 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M contendo 15% de glicerol. Esta suspensão de células competentes foi distribuída em alíquotas de 200  $\mu\text{l}$ , as quais foram armazenadas em nitrogênio líquido para uso posterior.

#### 2.9.2 Transformação de células competentes com os plasmídeos recombinantes

A cada alíquota de 200  $\mu\text{l}$  de suspensão de células de *E. coli* DH5 competentes (item 2.9.1) foram adicionados 3  $\mu\text{l}$  da preparação dos plasmídeos recombinantes pKRT1 a 5, contendo aproximadamente 1,2  $\mu\text{g}$  de DNA, e incubadas em banho de gelo por 1 hora. A seguir as misturas de transformação foram submetidas a um choque térmico de 42°C por 3 min e em seguida resfriada em gelo por 5 min. Cada mistura de transformação foi completada para 1,0 ml com meio LB e incubada a 37°C por 1 hora para permitir a recuperação do metabolismo da bactéria.

As misturas de transformação com os plasmídeos recombinantes e controle (com pBR322) foram plaqueadas em meio LA NaI<sup>10</sup> na presença do antibiótico adequado para a seleção dos transformantes. Outro controle foi realizado pelo tratamento das células competentes sem a adição de DNA, e plaqueamento em meio seletivo para transformantes. A frequência da transformação foi calculada pelo número total de colônias de transformantes obtidos e o número total de células viáveis na mistura de transformação, obtido em placas contendo meio de cultura LA NaI<sup>10</sup>.

## 2.10 ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO E SISTEMAS DE CLIVAGENS

As endonucleases utilizadas para a diferenciação dos 5 plasmídeos recombinantes e construção do mapa de restrição, assim como seus sítios de reconhecimento e os tampões de clivagem estão indicados na tabela 2.

As clivagens foram realizadas obedecendo uma concentração final de glicerol inferior a 5% nos sistemas de incubação, para evitar inibição da atividade enzimática ou clivagens inespecíficas. Todas as enzimas foram conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  em tampão de estocagem contendo glicerol 50% v/v a fim de evitar a perda da atividade enzimática por efeitos crioscópicos (7). As soluções-estoque dos tampões foram diluídas de acordo com as especificações para cada endonuclease de restrição.

A escolha do tampão a ser utilizado em sistemas simples e compostos por duas enzimas (duplo) obedeceu as características das enzimas presentes. Os sistemas de clivagem simples foram feitos para um volume total de

20 $\mu\text{l}$ : DNA	3,0 $\mu\text{l}$
tampão B	2,0 $\mu\text{l}$
RNAse	0,1 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O bidestilada	14,7 $\mu\text{l}$
<i>EcoR</i> I	0,2 $\mu\text{l}$

O tampão B foi utilizado para clivagens simples com *EcoR* I, *Hind* III, *BamH* I e *Bgl* II, enquanto que o tampão H foi utilizado para clivagens simples com *Pst* I e *Xho* I. As incubações foram realizada a  $37^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 1h.

TABELA 2: CARACTERÍSTICAS DAS ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO

Endonucleases de Restrição	Sítio de Reconhecimento	Tampões de Clivagem
<i>EcoR</i> I	G↓AATTC	A, B, M, H ou Plus
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT	A, B, M ou Plus
<i>Bgl</i> II	A↓GATCT	A, B, M, H ou Plus
<i>Pst</i> I	C↓TGCAG	H ou Plus
<i>Xho</i> I	C↓TCGAG	B, H ou Plus
<i>Bam</i> H I	G↓GATCC	A,B,L,M ou Plus

Os tampões de restrição A, B, L, M, H e Plus são utilizados na diluição de 1:10. O tampão de clivagem Plus deve ser utilizado diluído 1:5 em sistemas de clivagem contendo *EcoR* I para evitar a atividade "Star" dessa enzima (12).

Os sistemas de clivagens duplos, realizados como exemplificado para clivagem simples, foram os seguintes: *EcoR I/Hind III*, *EcoR I/Xho I*, *EcoR I/Bgl II*, *EcoR I/Pst I*, *Hind III/Xho I*, *Hind III/Bgl II*, *Xho I/Bgl II*. O tampão de clivagem utilizado nestes sistemas de clivagens duplos foi o tampão B, exceto para a clivagem *EcoR I/Pst I* na qual foi utilizado o tampão H.

A composição dos tampões de clivagem utilizados nos sistemas é a seguinte:

Tampão B:	Tris-HCl	10 mM	pH 8,0
	Cloreto de Magnésio	5 mM	
	Cloreto de Sódio	100 mM	
	$\beta$ -mercaptoetanol	1 mM	
Tampão H:	Tris-HCl	50 mM	pH 7,5
	Cloreto de Magnésio	10 mM	
	Cloreto de Sódio	100 mM	

## 2.11 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

As eletroforeses em gel de agarose foram realizadas como descrito por MANIATIS *et al.* (109).

### 2.11.1 Eletroforese de DNA após clivagem

Os géis de agarose foram preparados em tampão TBE (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0), tendo sido a eletroforese realizada no mesmo tampão (108). A concentração de agarose variou de 0,5 a 1,0%, para permitir uma maior resolução dos fragmentos obtidos após as

clivagens. As amostras analisadas foram aplicadas com tampão de aplicação FSUDS (azul de bromofenol 0,2%, SDS 0,1%, Ficoll 20% em  $T_{10}E_1$ ), na proporção de 1 parte de tampão de aplicação para 4 partes de amostra. A voltagem aplicada para as eletroforeses foi de aproximadamente 70 V e o tempo de corrida para a eletroforese em gel de agarose 0,5% ou 1,0% foi de 2,5 horas e em gel 0,8% foi de 3 horas. No caso das eletroforeses das clivagens dos plasmídeos recombinantes pKRT1 a 5 com *EcoR* I ou *Bgl* II, a voltagem utilizada para gel 0,8% foi 30 V por 3 horas e para gel 0,7% foi utilizado 25 V por 3 horas e 20 minutos.

#### 2.11.2 Eletroforese das preparações de plasmídeos de *A. brasilense* e *E. coli*

Os géis de agarose utilizados para análise eletroforética dos plasmídeos isolados de *A. brasilense* e *E. coli* foram preparados em tampão TAE (Tris-base 40 mM, acetato de sódio 5 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A eletroforese foi realizada no mesmo tampão (109). A concentração de agarose utilizada foi de 0,5% e as amostras foram aplicadas com FSUDS. As eletroforeses foram realizadas a 30 V por 18 horas, 50 V por 3 horas ou 100 V por 3,5 horas.

#### 2.11.3 Preparo do gel para análise e fotografia

O gel foi submerso em solução de brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 15-30 min e em seguida lavado em água

destilada por até 30 min. O DNA complexado com o EtBr foi visualizado em transiluminador ultravioleta de 302 nm. Os resultados foram registrados por fotografia com câmera Minolta de 35 mm equipada com filtro ultravioleta e filtro vermelho utilizando filme Kodak 100 ASA. Os negativos foram revelados com revelador a base de metol-hidroquinona (80).

## 2.12 CONSTRUÇÃO DO MAPA DE RESTRIÇÃO DE PLASMÍDEO RECOMBINANTE

O plasmídeo recombinante a ser mapeado foi purificado em larga escala utilizando a metodologia descrita no item 2.8.1.

Para construir o mapa de restrição o plasmídeo recombinante foi submetido a clivagem por diversas enzimas de restrição, em sistemas simples ou duplos, e os fragmentos obtidos foram analisados como descrito no item 2.11.1. A determinação dos tamanhos dos fragmentos obtidos pelos diferentes sistemas de clivagem foi feita pelo método de interpolação da reta de um gráfico log kpb versus distância de migração, obtido utilizando os padrões de tamanho 1kb ladder e  $\lambda$  Hind III (109, 172).

A análise comparativa destes resultados e os resultados das hibridizações permitiram a dedução do mapa de restrição.

### 2.13 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA EM GEL DE AGAROSE DE BAIXO PONTO DE FUSÃO

A purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose de baixo ponto de fusão foi realizada pelo método de BANKIER *et al.* (6) modificado (161).

Após isolamento e clivagem do plasmídeos com endonucleases de restrição, os fragmentos foram então separados pela eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão 0,7% e tampão TAE. Após o tratamento com brometo de etídio, a fração de gel contendo as bandas correspondentes aos fragmentos de interesse foram cortadas sob luz ultravioleta (302 nm). As porções do gel foram fundidas a 65°C por 5 minutos e, em seguida, foram adicionadas soluções de Tris.HCl pH 8,0, EDTA e NaCl nas concentrações finais de 10 mM, 1 mM e 0,2 M, respectivamente. Um volume de fenol foi adicionado ao gel fundido e a mistura foi agitada vigorosamente. Após centrifugação em centrífuga Spin I por 3 minutos, a fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo. A fase fenólica foi lavada com um volume de  $T_{10}E_1$  e, após centrifugação, a fase aquosa foi removida e adicionada àquela coletada anteriormente. Foi realizada uma outra extração da fase aquosa com fenol, e em seguida com Fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). A fase aquosa obtida após estas extrações foi concentrada para 100  $\mu$ l por extração com n-butanol e o DNA foi finalmente precipitado com 2/3 volumes de acetato de amônio 5 M e 2 volumes de etanol.



O fragmento *EcoR* I de 6 kpb do plasmídeo pAT512 (170), após purificação como descrito acima, foi clivado com *Xho* I. Os fragmentos obtidos, (1,5 kpb - *glnA*; 1,7 kpb - *ntnC*; 2,8 kpb - *ntnB*) foram submetidos a eletroforese e novamente purificados para serem utilizados como molde para a síntese das sondas radioativas utilizados nas hibridizações.

#### 2.14 MARCAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA POR SÍNTESE UTILIZANDO HEXADESOXINUCLEOTÍDEOS COMO SEQUÊNCIAS INICIADORAS

Fragmentos de DNA (30-50 ng/10  $\mu$ l) a serem marcados foram desnaturados por fervura durante 10 minutos e rapidamente resfriado em banho de gelo. Aos tubos contendo DNA (10  $\mu$ l) foram adicionados 5  $\mu$ l de tampão OCB, 1  $\mu$ l de albumina bovina (10 mg/ml), 2,5  $\mu$ l (25  $\mu$ Ci) de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham), 0,5  $\mu$ l de enzima Klenow (1-2 unidades) e água bidestilada suficiente para 20  $\mu$ l (56). A mistura de reação foi então incubada a temperatura ambiente durante 1-24 horas. O tampão OCB (56) apresenta a seguinte composição MOPS 1 M pH 6,6, tampão Tris.HCl 0,25 M pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 0,025 M, dNTP's (dATP, dGTP e dTTP) 1 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM e 27 miliunidades A<sub>260 nm</sub> de hexadesoxinucleotídeos.

A extensão de marcação radioativa do DNA foi determinada como descrito por MANIATIS *et al.* (108). Amostras (1-5  $\mu$ l) da reação de marcação do DNA diluídos (1:50-1:100) foram depositadas sobre 2 pedaços de papel de DEAE-celulose (0,5 cm x 0,5 cm). Um destes pedaços foi

lavado seis vezes com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5 M durante 5 minutos, 2 vezes com água bidestilada e 2 vezes com etanol 95%. Após secagem, a radioatividade dos dois pedaços de papel contendo DNA adsorvido foi determinada em contador de cintilações líquidas Beckman LS-133 utilizando o a solução de Bray (16) como fluorescente. A relação entre o número de cintilações por minuto no papel lavado (radioatividade incorporada) e no papel não lavado (radioatividade total), multiplicada por 100, é igual à percentagem de incorporação de nucleotídeos marcados com  $^{32}\text{P}$  ao DNA. As sondas sintetizadas por este método geralmente apresentaram incorporação de cerca de 75% da radioatividade ao DNA.

#### 2.15 TRANSFERÊNCIA DO DNA DO GEL DE AGAROSE PARA MEMBRANA DE NYLON - "Southern blot"

A transferência de DNA para membrana de nylon (Hybond-N, Amersham) foi feita como descrito por MANIATIS *et al.* ou no MANUAL AMERSHAM (2, 109). Fragmentos de DNA obtidos por clivagens com diferentes endonucleases de restrição foram separados por eletroforese a 25 V em gel de agarose 0,8% por 3 horas e 20 min. Após visualização e registro do resultado da eletroforese, como descrito no item 2.11.3, o gel foi preparado para a transferência do DNA.

#### 2.15.1 Preparo do gel para a transferência do DNA

Os poços de aplicação do gel foram removidos e o gel foi tratado com HCl 0,25 M durante 15 min. Após ligeira lavagem com água bidestilada, o gel foi tratado com a solução desnaturante (NaOH 0,5 M/NaCl 1,5 M) durante 30 minutos, lavado ligeiramente com água bidestilada e o pH do sistema foi neutralizado com solução neutralizante (Tris.HCl 1,0 M pH 7,2/NaCl 1,5 M) por mais 30 minutos. Foram usados cerca de 200 ml destas soluções para géis de 35-100 cm<sup>2</sup> de área e 0,5 cm de altura (109).

#### 2.15.2 Preparo do sistema para transferência do DNA

Após estes tratamentos o gel foi colocado cuidadosamente sobre uma tira de papel 3MM (Whatman) da mesma largura do gel, porém comprido o suficiente para formar uma ponte entre o tampão e o gel. Este conjunto foi colocado sobre uma plataforma de acrílico acoplada a uma cuba contendo 0,5-1 litro de SSC 20X (NaCl 3M/ citrato de sódio 0,15 M, pH ajustado para 7,0 com NaOH 1N)). O nível do tampão ficava abaixo do nível da plataforma de acrílico e as pontas do papel 3MM formavam uma ponte entre o gel e o tampão da cuba. As bolhas entre o gel e o papel foram cuidadosamente removidas. A membrana de nylon seca, cortada 1 mm maior que o gel em cada dimensão e identificada a lápis, foi cuidadosamente colocada sobre o gel de maneira que a borda inferior dos poços estivessem justapostos à

borda da membrana. Este procedimento foi utilizado para que não ocorressem erros na determinação dos pesos moleculares. As bolhas de ar entre o gel e a membrana foram removidas. Sobre a membrana foram colocadas 3 folhas de papel 3MM cortadas exatamente do tamanho do gel, sobre os papéis 3MM foi colocado uma pilha de papel absorvente com cerca de 10 cm de altura e finalmente um peso de 1 kilograma. A transferência ocorreu durante 18 horas e o nível do tampão SSC 20X foi mantido durante este período. A membrana foi então removida, lavada com SSC 5X e seca a 37°C durante 15-30 minutos. O DNA foi fixado à membrana de nylon por irradiação de luz ultravioleta (302 nm) em transiluminador durante 3-5 minutos. A membrana com DNA fixado pode ser usada imediatamente para hibridização ou ser guardada por até 15 dias em dessecador e à temperatura ambiente.

## 2.16 MAPEAMENTO DOS GENES PRESENTES NO PLASMÍDEO RECOMBINANTE

As hibridizações foram feitas segundo o manual Amersham (2).

### 2.16.1 Pré-hibridização utilizando a solução de Denhardt como agente bloqueador

A membrana de nylon contendo DNA foi colocada em um saco plástico e incubada com solução de pré-hibridização

(SSC 5X, solução de Denhardt 5X, 0,5% SDS, 20  $\mu$ g/ml de DNA de timo, 35% de formamida) a 42°C durante 2-12 horas (baixa estringência). Aproximadamente 100  $\mu$ l desta solução foi utilizada para cada cm<sup>2</sup> da membrana. A solução de Denhardt 100x (contendo 2% de albumina bovina, 2% de Ficoll e 2% de polivinilpirrolidona) foi filtrada por filtro Millipore (0,45  $\mu$ m) e em seguida estocada a -20°C (2, 109).

### 2.16.2 Hibridização

A sonda radioativa foi desnaturada em banho fervente durante 10 minutos, rapidamente resfriada em gelo e adicionada ao saco plástico contendo a membrana após o tratamento de pré-hibridização. A mistura de hibridização foi incubada durante 12-18 horas a 42°C. Após este período, a membrana foi lavada duas vezes com SSC 2x contendo 0,1% de SDS à temperatura ambiente durante 30 minutos e mais duas vezes com o mesmo tampão a 65°C. Em seguida, a membrana foi auto-radiografada com filme Kodak X-Omat XK-1 1-3 dias a -20°C utilizando 2 placas amplificadoras (Dupont, Cronex Hi-Plus). O filme foi revelado com revelador a base de metol-hidroquinona (80).

### 2.16.3 Remoção do DNA-sonda para re-utilização da membrana

Para que a remoção do DNA-sonda da hibridização anterior fosse bem sucedida, a membrana foi mantida úmida após a lavagem e auto-radiografia.

A remoção do DNA-sonda foi feita pelo tratamento da membrana com NaOH 0,4 M a 45°C por 30 min seguido pela incubação em SSC 1x contendo 0,1% de SDS e Tris-HCl 0,2 M pH 7,5 por 15 min (2).

## 2.17 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

A determinação de proteína foi realizada pelo método de LOWRY *et al.* (104), usando soro-albumina bovina como padrão. Para a determinação do conteúdo protéico de bactérias ou de culturas bacterianas estas foram previamente digeridas com 0,5 N de NaOH.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 BANCO GENÔMICO DE *Herbaspirillum seropedicae* Z78

Um banco genômico de *H. seropedicae* Z78, construído no cosmídeo pLAFR3 pelo método descrito por Staskawicz et al (164), foi gentilmente cedido pelo Dr. Emanuel M. Souza, deste Laboratório. Este banco está representado por cerca de 5.000 clones independentes de *E. coli* HB101 contendo plasmídeos recombinantes com insertos de DNA variando entre 17 e 28 kpb. Considerando-se que o valor médio dos insertos foi de aproximadamente 22 kpb e assumindo-se que o tamanho do genoma de *H. seropedicae* seja semelhante ao de *E. coli* ou cerca de 4.200 kpb (98), a aplicação da fórmula de Clarke e Carbon (25) indicou que este banco apresenta uma representatividade da ordem de 100% do genoma de *H. seropedicae*.

#### 3.2 ISOLAMENTO DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES, CONTENDO DNA DE *Herbaspirillum seropedicae*, CAPAZES DE COMPLEMENTAR O MUTANTE *ntrC*<sup>-</sup> DE *E. coli* ET8556

Para isolar por complementação genética os plasmídeos recombinantes que apresentassem o gene *ntrC*, o mutante *ntrC*<sup>-</sup>

de *E. coli* ET8556 foi conjugado com um banco genômico de *H. seropedicae* (item 2.7.1).

A frequência de conjugação obtida foi da ordem de  $10^{-5}$  e a frequência relativa de complementação da mutação foi de  $7,5 \cdot 10^{-4}$ .

Um total de 220 colônias de transconjugantes *E. coli* ET8556 (pLAFR3::DNA de *H. seropedicae*) foram capazes de utilizar L-arginina como única fonte de nitrogênio e, portanto, os mutantes foram complementados por plasmídeos recombinantes que carregam um gene de *H. seropedicae* semelhante ao *ntrC*. A partir dessas 220 colônias de *E. coli* ET8556, 5 foram escolhidas ao acaso e denominadas *E. coli* ET8556.1, ET8556.2, ET8556.3, ET8556.4 e ET8556.5. Os plasmídeos recombinantes presentes nestes transconjugantes foram denominados pKRT1 a pKRT5, respectivamente. O tamanho provável destes plasmídeos, determinado por eletroforese (não apresentada), é de cerca de 45 kpb a 50 kpb. Um dos plasmídeos recombinantes, o pKRT1, presente no transconjugante *E. coli* ET8556.1 é apresentado na figura 6, coluna 3.

### 3.3 TRANSFORMAÇÃO DE *E. coli* DH5 COM OS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES OBTIDOS POR COMPLEMENTAÇÃO

Plasmídeos recombinantes dos 5 transconjugantes *E. coli* (ET8556.1 a ET8556.5) foram isolados (item 2.8.1). Estes plasmídeos recombinantes, pKRT1 a pKRT5, foram transferidos



para a estirpe *E. coli* DH5, por transformação (item 2.9). Sendo *recA*<sup>-</sup>, a estirpe DH5 é um melhor hospedeiro para garantir a integridade dos plasmídeos recombinantes que a estirpe *ntnC*<sup>-</sup> ET8556. A frequência média de transformação obtida foi da ordem de  $10^5/\mu\text{g}$  de DNA.

A presença de um dos plasmídeos recombinantes, o pKRT1, em um transformante *E. coli* DH5 está evidenciada na figura 6, coluna 5.

#### 3.4 TRANSFERÊNCIA DOS PLASMÍDEOS pKRT's DE *E. coli* DH5 PARA MUTANTES *ntnC*<sup>-</sup> DE *A. brasilense* FP8 e FP9.

Visando determinar se os plasmídeos recombinantes pKRT1 a pKRT5 eram capazes de complementar os mutantes *ntnC*<sup>-</sup> de *A. brasilense* FP8 e FP9 (Pedrosa e Yates, 1984), estes mutantes foram conjugados individualmente com os transformantes *E. coli* DH5 (pKRT1 a pKRT5). Os transconjugantes *A. brasilense* (pKRT1 a pKRT5) foram isolados em meio seletivo contendo tetraciclina, e testados para a fixação de nitrogênio em meio NFbHP semi-sólido.

As frequências média de conjugação (calculadas em relação ao número de células receptoras) foram da ordem de  $10^{-7}$  para o mutante *A. brasilense* FP8 e de  $10^{-6}$  para o mutante *A. brasilense* FP9.

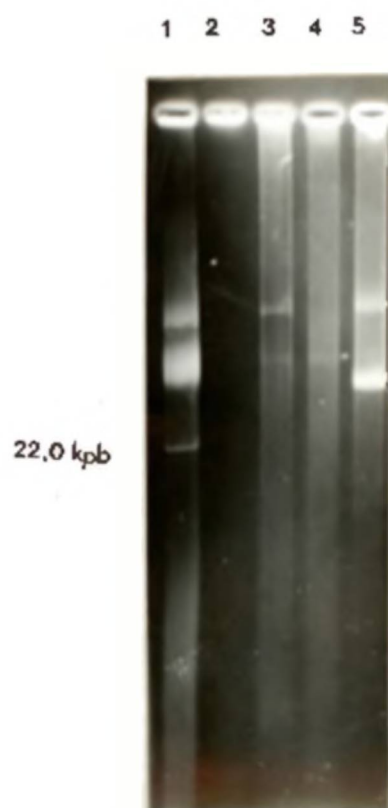


FIGURA 6: PERFIL ELETROFORÉTICO DOS TRANSCONJUGANTE E TRANSFORMANTE DE *E. coli* pKRT1

Os plasmídeos foram isolados por minipreparação como descrito em Materiais e Métodos (2.8.1). A eletroforese foi realizada a 30 V em gel de agarose 0,5% por 18 horas. O tampão de corrida utilizado foi TAE 1x.

- 1 *E. coli* MC1061 pLAFR3
- 2 *E. coli* ET8556
- 3 Transconjugante *E. coli* ET8556 (pKRT1)
- 4 *E. coli* DH5
- 5 Transformante *E. coli* DH5 (pKRT1)

### 3.5 COMPLEMENTAÇÃO DOS MUTANTES $ntrC^-$ DE *A. brasilense* FP8 E FP9 PELOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES pKRT's.

Duas colônias de cada um dos grupos de transconjugantes *A. brasilense* FP8 (pKRT1 a pKRT5) e FP9 (pKRT1 a pKRT5), foram testadas para crescimento diazotrófico e redução de acetileno em meio NFbHP semi-sólido. Os valores da atividade da nitrogenase estão apresentados na tabela 3.

Os resultados revelam que todos os transconjugantes de *A. brasilense* FP8 (pKRT1 a pKRT5) ou FP9 (pKRT1 a pKRT5), apresentaram significativa atividade nitrogenásica, embora tenham atingido apenas 34 % da atividade da estirpe selvagem FP2 (tabela 3). Além disso, pode se verificar que a atividade da nitrogenase dos transconjugantes FP8 e FP9, na presença dos plasmídeos pKRT1 ou pKRT5, foi maior que a observada para os transconjugantes FP8 ou FP9 na presença dos plasmídeos pKRT2, pKRT3 e pKRT4.

### 3.6 RESTAURAÇÃO DO FENÓTIPO $Nif^-$ DOS TRANSCONJUGANTES *A. brasilense* FP8 e FP9 (pKRT1) PELO PLASMÍDEO R68.45

A eliminação dos plasmídeos recombinantes contidos nos transconjugantes *A. brasilense* FP8 (pKRT1) e FP9 (pKRT1) foi realizada através da conjugação desses transconjugantes com *E. coli* 1230 (R68.45) (item 2.7.2). A seleção dos transconjugantes *A. brasilense* (R68.45) cujo plasmídeo

TABELA 3: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE DOS TRANSCONJUGANTES *Azospirillum brasilense* FP8 E FP9 CONTENDO OS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

Estirpes de	Atividade da nitrogenase
<i>A. brasilense</i>	(nmoles $C_2H_4 \cdot mg$ de proteína <sup>-1</sup> . h <sup>-1</sup> )
FP2 (selvagem)	113,0
FP8	0,0
FP8 (pKRT1)	21,2
FP8 (pKRT2)	8,3
FP8 (pKRT3)	12,8
FP8 (pKRT4)	5,4
FP8 (pKRT5)	29,8
FP9	0,0
FP9 (pKRT1)	38,6
FP9 (pKRT2)	18,4
FP9 (pKRT3)	19,1
FP9 (pKRT4)	21,0
FP9 (pKRT5)	34,1

Estes valores são médias de duas determinações, independentes, da atividade da nitrogenase de cada transconjugante. O meio de cultura utilizado foi NFbHP semi sólido, sem fonte de nitrogênio, como descrito em Materiais e Métodos.

recombinante (pKRT1) foi eliminado pelo R68.45 foi feita em meio sólido NFbHPN contendo Km. Em seguida esses novos transconjugantes, *A. brasilense* FP8 (R68.45) e FP9 (R68.45), bem como os anteriores, *A. brasilense* FP8 (pKRT1) e FP9 (pKRT1), foram testados para fixação de nitrogênio, em meio NFb semi-sólido sem N (tabela 4).

Os resultados mostram que a eliminação dos plasmídeos recombinantes dos transconjugantes *A. brasilense* FP8 (pKRT1) e FP9 (pKRT1) pelo plasmídeo R68.45 resultou na restauração do fenótipo  $Nif^-$  dos mutantes  $ntrC^-$  FP8 e FP9 utilizados como recipientes.

A presença dos plasmídeos nos transconjugantes *A. brasilense* FP8 (pKRT1) e FP9 (pKRT1) e *A. brasilense* FP8 (R68.45) e FP9 (R68.45) está evidenciada nas Figuras 7 e 8, respectivamente, comprovando que o fenótipo  $Nif^+$  é dependente da presença do plasmídeo pKRT1.

### 3.7 DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE CLIVAGEM DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

A análise do padrão eletroforético dos plasmídeos recombinantes, pKRT1 a pKRT5, após clivagem com *EcoR* I e *Bgl* II, revelam dois padrões distintos de clivagem (Figuras 9 e 10). Os plasmídeos recombinantes pKRT1 e pKRT5 apresentam o mesmo padrão de clivagem, ao passo que os plasmídeos pKRT2, pKRT3 e pKRT4 formam um outro grupo homogêneo. Um único fragmento *EcoR* I de 2,48 kpb foi

TABELA 4 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA NITROGENASE DOS TRANSCONJUGANTES *Azospirillum brasilense* FP8 E FP9 NA PRESENÇA DOS PLASMÍDEOS pKRT1 OU R68.45

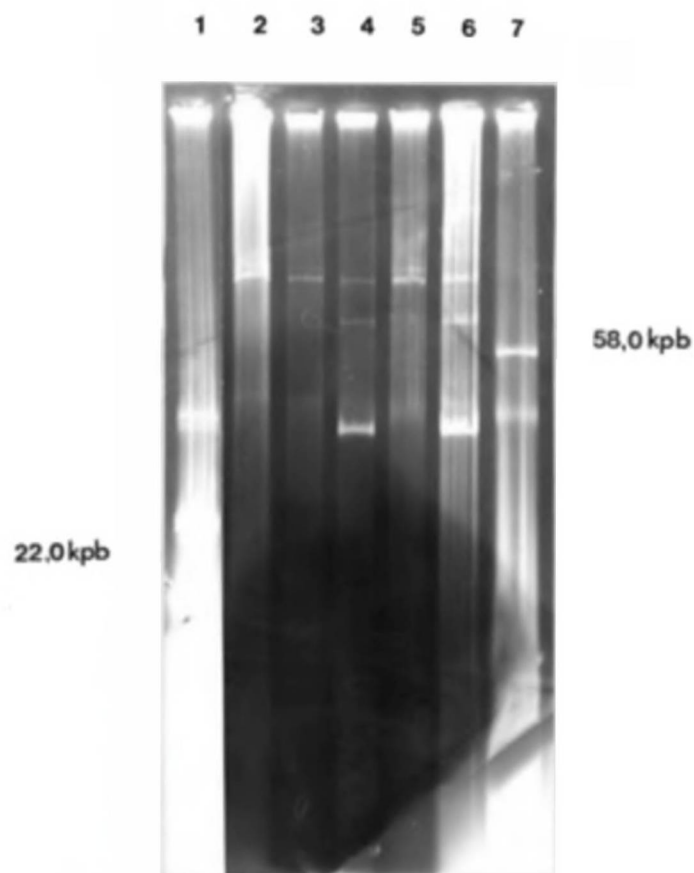
Estirpes de <i>A. brasilense</i>	Atividade da nitrogenase nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> . h <sup>-1</sup> . mg proteína <sup>-1</sup>	% <sup>c</sup>
FP2	371,0	100,0
FP8	0,0	-
FP8 (pKRT1) <sup>a</sup>	75,6	20,4
FP8 (R68.45) <sup>b</sup>	0,0	-
FP9	0,0	-
FP9 (pKRT1) <sup>a</sup>	111,9	30,2
FP9 (R68.45) <sup>b</sup>	0,0	-

As células foram cultivadas em meio NFbHP semi-sólido (0.15% Agar) e incubadas a 30°C.

<sup>a</sup> Transconjugantes obtidos após conjugação de *E. coli* DH5 (pKRT1) com *A. brasilense* FP8 e FP9.

<sup>b</sup> Após eliminação do plasmídeo pKRT1 pelo R68.45.

<sup>c</sup> Porcentagem da atividade da nitrogenase em relação ao padrão *A. brasilense* FP2.



**FIGURA 7: PERFIL ELETROFORÉTICO DOS TRANSCONJUGANTE DE  
*A. brasilense* FP8 E FP9 (pKRT1)**

Os plasmídeos foram isolados como descrito em Materiais e Métodos (2.8.2) pelo método de ROBSON *et al.* (145). A eletroforese foi realizada em gel de agarose 0,5% e o tampão de corrida utilizado foi TAE 1x. A voltagem aplicada foi de 100 V por 3,5 horas.

- |   |                                  |
|---|----------------------------------|
| 1 | <i>E. coli</i> HB101 (pLAFR3)    |
| 2 | <i>A. brasilense</i> FP2         |
| 3 | <i>A. brasilense</i> FP8         |
| 4 | <i>A. brasilense</i> FP8 (pKRT1) |
| 5 | <i>A. brasilense</i> FP9         |
| 6 | <i>A. brasilense</i> FP9 (pKRT1) |
| 7 | <i>E. coli</i> 1230 (R68.45)     |

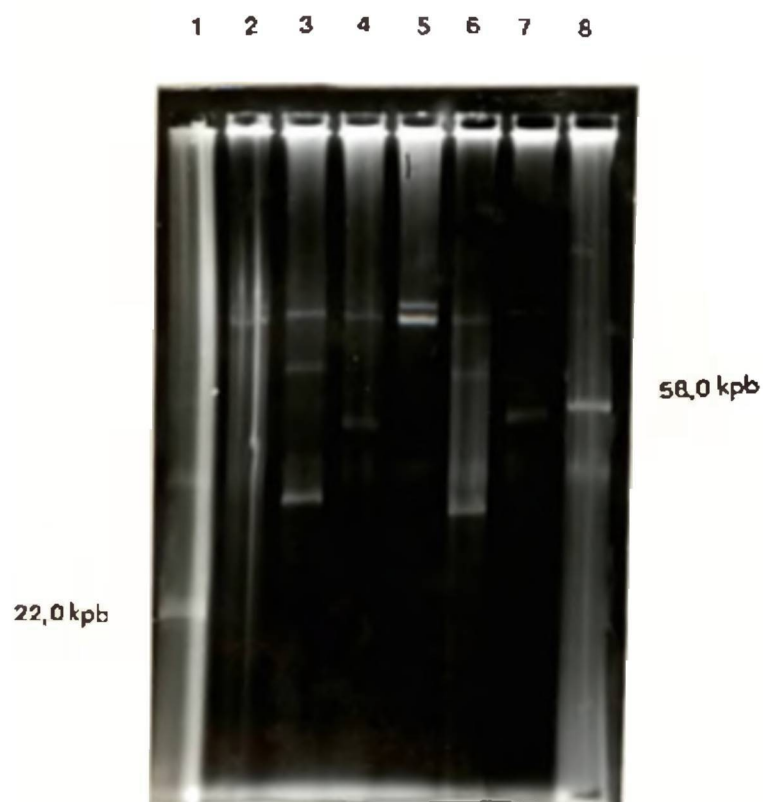


FIGURA 8: PERFIL ELETROFORÉTICO DOS TRANSCONJUGANTE DE *A. brasilense* FP8 e FP9 (R68.45)

Os plasmídeos foram isolados como descrito em Materiais e Métodos (2.8.2) pelo método de ROBSON *et al.* (145). A eletroforese foi realizada em gel de agarose 0,5% e o tampão de corrida utilizado foi TAE 1x. A voltagem aplicada foi de 50 V por 3,5 horas.

- |   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| 1 | <i>E. coli</i> HB101 (pLAFR3)     |
| 2 | <i>A. brasilense</i> FP8          |
| 3 | <i>A. brasilense</i> FP8 (pKRT1)  |
| 4 | <i>A. brasilense</i> FP8 (R68.45) |
| 5 | <i>A. brasilense</i> FP9          |
| 6 | <i>A. brasilense</i> FP9 (pKRT1)  |
| 7 | <i>A. brasilense</i> FP9 (R68.45) |
| 8 | <i>E. coli</i> 1230 (R68.45)      |



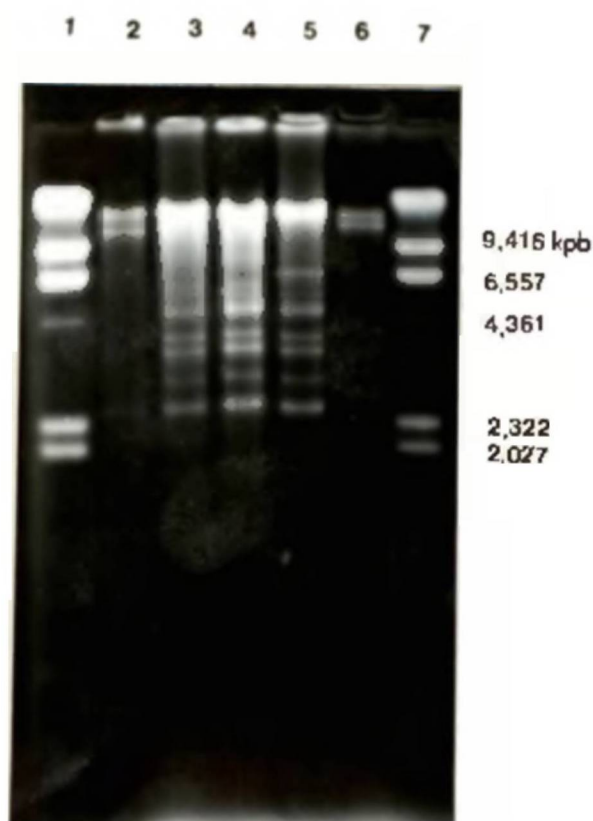


FIGURA 9: PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES ISOLADOS ATRAVÉS DA COMPLEMENTAÇÃO DE MUTANTE *ntxC*<sup>-</sup> DE *E. coli* CLIVADOS COM *EcoR* I

Os plasmídeos recombinantes foram isolados, através da complementação de mutantes *ntxC*<sup>-</sup> de *E. coli* ET8556 a partir do banco genômico de *Herbaspirillum seropedicae* (pl.AFR3::fragmentos de DNA de *H. seropedicae*) mantido em *E. coli* HB101. As minipreparações dos plasmídeos foram feitas a partir de transformantes de *E. coli* DH5 e os sistemas de clivagens foram realizados como descrito no item 2.10. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 0,8% por 3 horas a 30 V.

- |   |  |
|---|--|
| 1 | padrão de peso molecular $\lambda$ / <i>Hind</i> III |
| 2 | pKRT1 clivado com <i>EcoR</i> I                      |
| 3 | pKRT2 clivado com <i>EcoR</i> I                      |
| 4 | pKRT3 clivado com <i>EcoR</i> I                      |
| 5 | pKRT4 clivado com <i>EcoR</i> I                      |
| 6 | pKRT5 clivado com <i>EcoR</i> I                      |
| 7 | padrão de peso molecular $\lambda$ / <i>Hind</i> III |

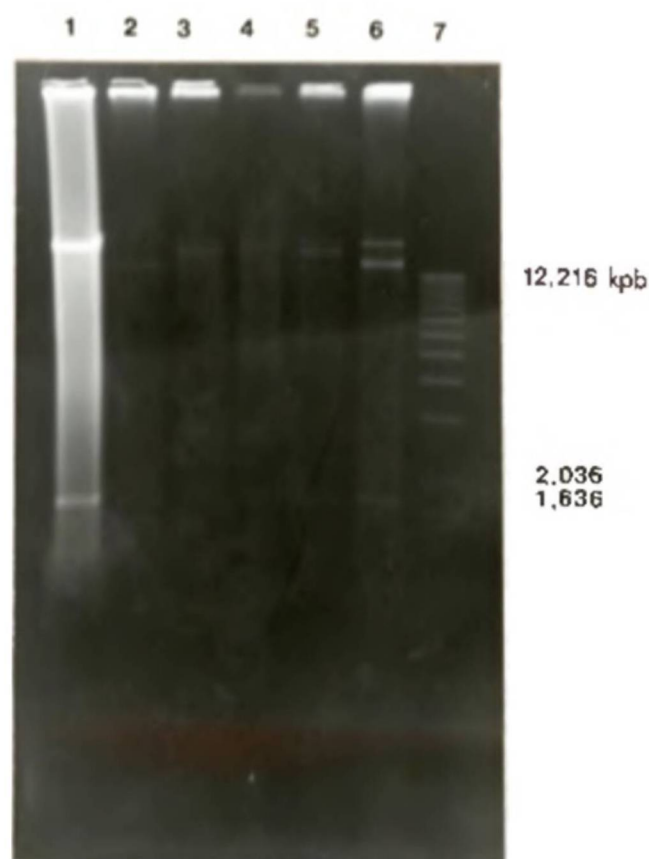


FIGURA 10: PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES ISOLADOS ATRAVÉS DA COMPLEMENTAÇÃO DE MUTANTE *ntrC*<sup>-</sup> DE *E. coli* CLIVADOS COM *Bgl* II

Os plasmídeos recombinantes foram isolados, através da complementação de mutantes *ntrC*<sup>-</sup> de *E. coli* ET8556 a partir do banco genômico de *Herbaspirillum seropedicae* (pLAFR3::fragmentos de DNA de *H. seropedicae*) mantido em *E. coli* HB101. As minipreparações dos plasmídeos foram feitas a partir de transformantes de *E. coli* DHS e os sistemas de clivagens foram realizados como descrito no item 2.10. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 0,7% por 3 horas e 20min a 25 V.

- |   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| 1 | pLAFR3 clivado com <i>Bgl</i> II     |
| 2 | pKRT1 clivado com <i>Bgl</i> II      |
| 3 | pKRT2 clivado com <i>Bgl</i> II      |
| 4 | pKRT3 clivado com <i>Bgl</i> II      |
| 5 | pKRT4 clivado com <i>Bgl</i> II      |
| 6 | pKRT5 clivado com <i>Bgl</i> II      |
| 7 | padrão de peso molecular 1 kb Ladder |

encontrado em todos os 5 plasmídeos recombinantes, pKRT1 a pKRT5 (Figura 9) e, portanto, provavelmente contenha o gene *nrC*.

Os padrões de clivagens do plasmídeo recombinante pKRT1 pelas endonucleases de restrição *EcoR* I, *Hind* III, *Bgl* II, *Xho* I, *Pst* I ou *BamH* I, estão apresentados nas Figuras 11, 12, 13 ou 14. Os resultados apresentados nestas figuras foram obtidos através de eletroforeses em diferentes concentrações de agarose, para permitir uma melhor resolução dos tamanhos dos fragmentos.

Os fragmentos de DNA obtidos pela clivagem simultânea do pKRT1 com *EcoR* I e *BamH* I (figura 14) correspondem aos mesmos fragmentos obtidos pela clivagem simples desse plasmídeo com *EcoR* I (figura 11, 12 e 13), indicando a provável ausência de sítios *BamH* I neste plasmídeo.

Os tamanhos dos fragmentos obtidos pela clivagem do pKRT1 com as diferentes endonucleases de restrição estão listados nas tabelas 5 e 6. Os fragmentos *EcoR* I de 25,0 kpb e *Hind* III de 24,6 kpb correspondem ao vetor pLAFR3 e a uma pequena porção do inserto, enquanto que a clivagem com *Xho* I produziu um fragmento de 40,0 kpb correspondente ao vetor e a uma porção maior que 75 % do inserto. O fragmento *Bgl* II de 27,6 kpb corresponde ao vetor sem o sítio  $\lambda$ cos e a uma porção do inserto, enquanto que o fragmento de 1,7 kpb corresponde ao sítio  $\lambda$ cos do vetor. Os fragmentos restantes, oriundos dessas clivagens, correspondem exclusivamente ao DNA de *H. seropedicae* que foi clonado (Tabela 5).

Nos sistemas de clivagem duplo, grande número de

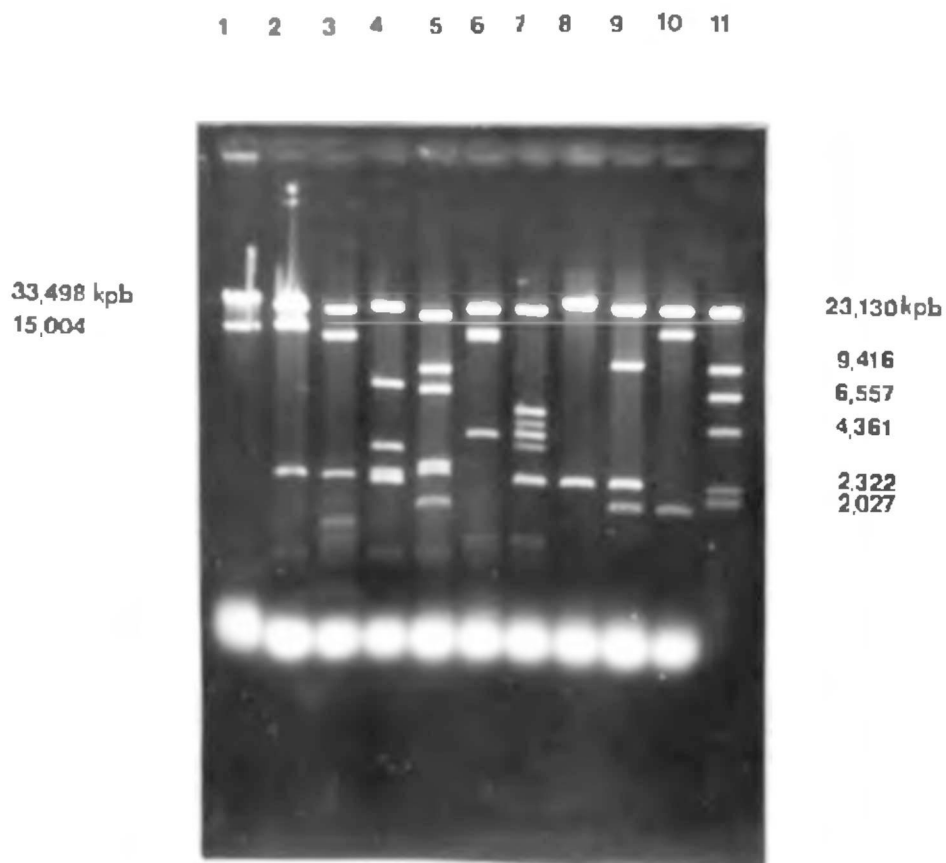


FIGURA 11: PERFIL ELETROFORÉTICO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE

**pKRT1 CLIVADO COM ENDONUCLEÁSES DE RESTRIÇÃO**

O plasmídeo recombinante pKRT1 foi isolado em larga escala utilizando o método de minipreparação, descrito no sub-ítem 2.8.1 de Materiais e Métodos, a partir do transformante de *E. coli* DHS (pKRT1). Os sistemas de clivagem foram realizados como descrito em Materiais e Métodos (2.10). O gel de agarose utilizado para a separação dos fragmentos foi de 0,5% em tampão TBE 1x. A eletroforese foi realizada a 70 V por 2,5 horas.

- 1 padrão de peso molecular  $\lambda$ /Xho I
- 2 pKRT1 clivado com EcoR I
- 3 pKRT1 clivado com EcoR I/Hind III
- 4 pKRT1 clivado com EcoR I/Xho I
- 5 pKRT1 clivado com EcoR I/Bgl II
- 6 pKRT1 clivado com Hind III
- 7 pKRT1 clivado com Hind III/Xho I
- 8 pKRT1 clivado com Xho I
- 9 pKRT1 clivado com Xho I/Bgl II
- 10 pKRT1 clivado com Bgl II
- 11 padrão de peso molecular  $\lambda$  Hind III

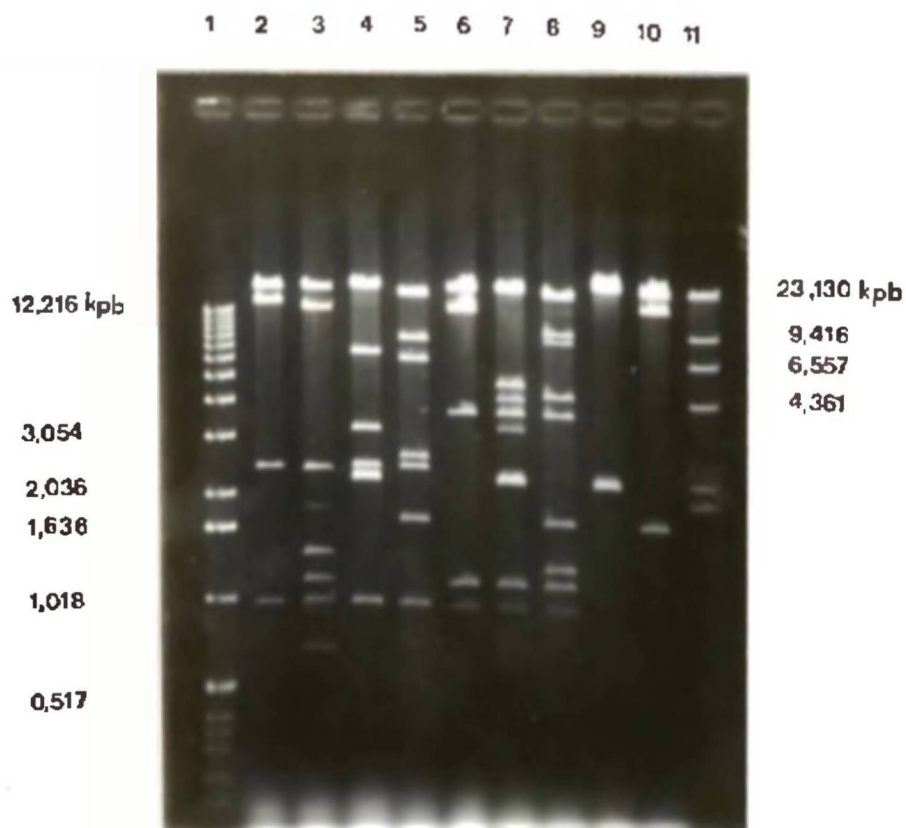


FIGURA 12: PERFIL ELETROFORÉTICO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE  
pKRT1 CLIVADO COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO

O plasmídeo recombinante pKRT1 foi isolado em larga escala utilizando o método de minipreparação, descrito no sub-ítem 2.8.1 de Materiais e Métodos, a partir do transformante de *E. coli* DHS (pKRT1). Os sistemas de clivagem foram realizados como descrito em Materiais e Métodos (2.10). O gel de agarose utilizado para a separação dos fragmentos foi de 0,8% em tampão TBE 1x. A eletroforese foi realizada a 70 V por 3 horas.

- 1 padrão de peso molecular 1 kb Ladder
- 2 pKRT1 clivado com *EcoR* I
- 3 pKRT1 clivado com *EcoR* I/*Hind* III
- 4 pKRT1 clivado com *EcoR* I/*Xho* I
- 5 pKRT1 clivado com *EcoR* I/*Bgl* II
- 6 pKRT1 clivado com *Hind* III
- 7 pKRT1 clivado com *Hind* III/*Xho* I
- 8 pKRT1 clivado com *Hind* III/*Bgl* II
- 9 pKRT1 clivado com *Xho* I
- 10 pKRT1 clivado com *Bgl* II
- 11 padrão de peso molecular  $\lambda$  *Hind* III

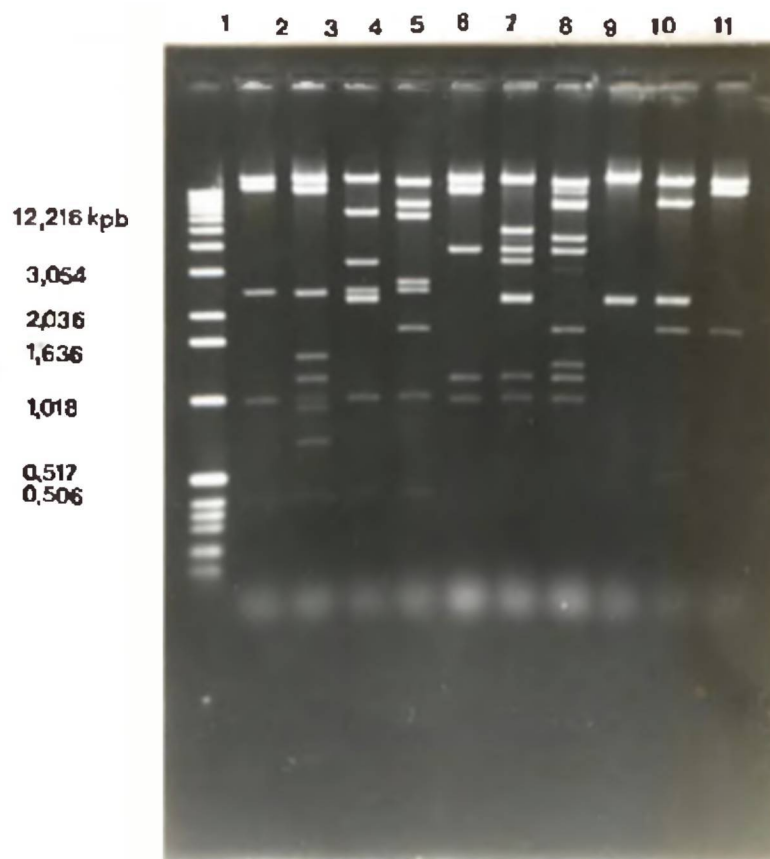


FIGURA 13: PERFIL ELETROFORÉTICO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pKRT1 CLIVADO COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO

O plasmídeo recombinante pKRT1 foi isolado em larga escala utilizando o método de minipreparação, descrito no sub-ítem 2.8.1 de Materiais e Métodos, a partir do transformante de *E. coli* DH5 (pKRT1). Os sistemas de clivagem foram realizados como descrito em Materiais e Métodos (2.10). O gel de agarose utilizado para a separação dos fragmentos foi de 1,0% em tampão TBE 1x. A eletroforese foi realizada a 70 V por 2,5 horas.

- |    |  |
|----|--|
| 1  | padrão de peso molecular 1 kb Ladder             |
| 2  | pKRT1 clivado com <i>EcoR</i> I                  |
| 3  | pKRT1 clivado com <i>EcoR</i> I/ <i>Hind</i> III |
| 4  | pKRT1 clivado com <i>EcoR</i> I/ <i>Xho</i> I    |
| 5  | pKRT1 clivado com <i>EcoR</i> I/ <i>Bgl</i> II   |
| 6  | pKRT1 clivado com <i>Hind</i> III                |
| 7  | pKRT1 clivado com <i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I  |
| 8  | pKRT1 clivado com <i>Hind</i> III/ <i>Bgl</i> II |
| 9  | pKRT1 clivado com <i>Xho</i> I                   |
| 10 | pKRT1 clivado com <i>Xho</i> I/ <i>Bgl</i> II    |
| 11 | pKRT1 clivado com <i>Bgl</i> II                  |



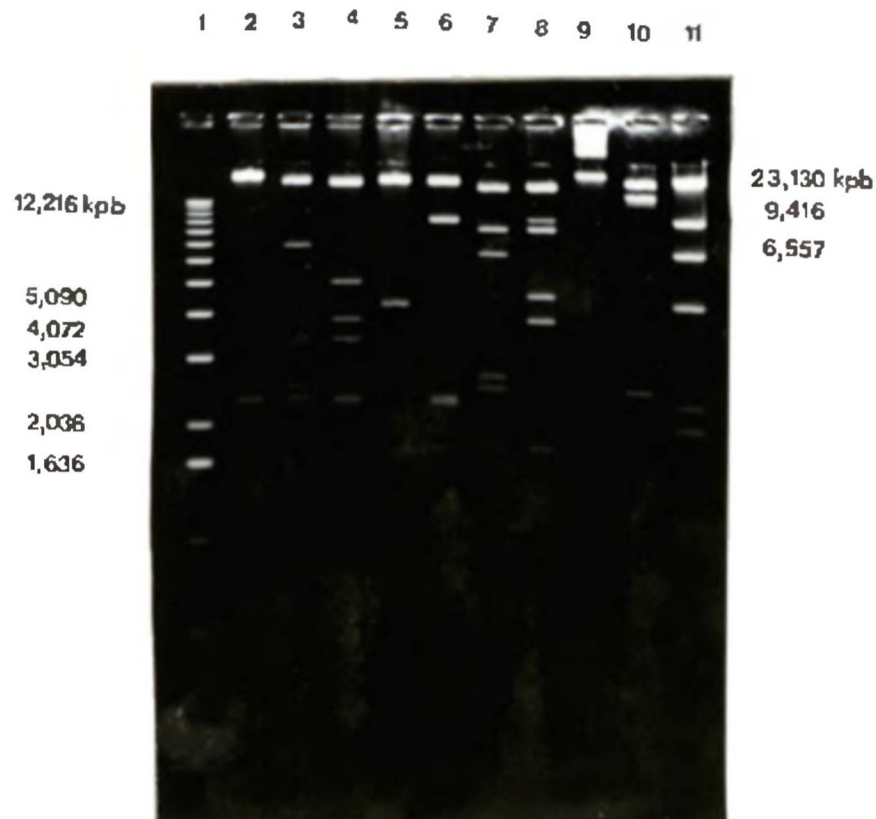


FIGURA 14: PERFIL ELETROFORÉTICO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE  
pKRT1 CLIVADO COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO

O plasmídeo recombinante pKRT1 foi isolado em larga escala utilizando o método de minipreparação, descrito no sub-ítem 2.8.1 de Materiais e Métodos, a partir do transformante de *E. coli* DHS (pKRT1). Os sistemas de clivagem foram realizados como descrito em Materiais e Métodos (2.10). O gel de agarose utilizado para a separação dos fragmentos foi de 0,8% em tampão TBE 1x. A eletroforese foi realizada a 10 V por 16 horas tendo sido a voltagem aumentada para 50 V por mais 1 hora e 43 min.

- 1 padrão de peso molecular 1 kb Ladder
- 2 pKRT1 clivado com *Xho* I
- 3 pKRT1 clivado com *Xho* I/*Eco*R I
- 4 pKRT1 clivado com *Xho* I/*Hind* III
- 5 pKRT1 clivado com *Xho* I/*Pst* I
- 6 pKRT1 clivado com *Xho* I/*Bgl* II
- 7 pKRT1 clivado com *Bgl* II/*Eco*R I
- 8 pKRT1 clivado com *Bgl* II/*Hind* III
- 9 pKRT1 clivado com *Bam*H I
- 10 pKRT1 clivado com *Bam*H I/*Eco*R I
- 11 padrão de peso molecular  $\lambda$  *Hind* III

TABELA 5: TAMANHO DOS FRAGMENTOS OBTIDOS PELA CLIVAGEM DO PLASMÍDEO pKRT1 COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO EM SISTEMAS SIMPLES

<i>EcoR</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Xho</i> I	<i>Bgl</i> II
25,00	24,60	40,00	27,60
15,60	15,00 <sup>1</sup>	2,25 <sup>2</sup>	15,20
2,48	13,85		1,70 <sup>3</sup>
1,00	3,87		
0,42	1,15		
	0,99		

<sup>1</sup> Banda referente a um fragmento parcialmente clivado.

<sup>2</sup> Banda referente a 2 fragmentos diferentes porém de tamanho semelhante.

<sup>3</sup> Banda referente ao sítio cos do vetor pLAFR3.



TABELA 6: TAMANHO DOS FRAGMENTOS OBTIDOS PELA CLIVAGEM DO PLASMÍDEO pKRT1 COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO EM SISTEMAS DUPLOS

<i>EcoR</i> I / <i>Hind</i> III	<i>EcoR</i> I / <i>Xho</i> I	<i>EcoR</i> I / <i>Bgl</i> II
23,40	25,00 *	20,30
15,00 <sup>1</sup> ▲	7,40	8,80
13,85 ▲	3,60	6,70
2,45	2,48 *	2,90
1,42	2,25 <sup>2</sup> ●	2,48 *
1,15 ▲	1,00 *	1,70 <sup>3</sup> ■
0,95	0,42 *	1,00 *
0,71		0,42 *
0,42 *		

<i>Hind</i> III / <i>Xho</i> I	<i>Hind</i> III / <i>Bgl</i> II	<i>Xho</i> I / <i>Bgl</i> II
24,60 ▲	21,60	27,60 ■
5,80	10,00 <sup>1</sup>	10,00
3,87 ▲	9,10	2,25 <sup>2</sup> ●
3,60	4,80	1,70 <sup>3</sup> ■
2,25 <sup>2</sup> ●	3,87 ▲	0,62
1,15 ▲	1,70 <sup>3</sup> ■	
0,99 ▲	1,25	
	1,15 ▲	
	0,99 ▲	

<sup>1</sup> Banda referente a um fragmento parcialmente clivado.

<sup>2</sup> Banda referente a 2 fragmentos diferentes porém de tamanho semelhante.

<sup>3</sup> Banda referente ao sítio cos do vetor pLAFR3.

Símbolos: \*, fragmentos *EcoR* I; ▲, fragmentos *Hind* III; ■, fragmentos *Bgl* II; ●, fragmentos *Xho* I

fragmentos foram obtidos, embora alguns tenham permanecido intactos, indicando a ausência de sítio de restrição para uma das enzimas presentes no sistema (Tabela 6). Estes dados foram analisados e utilizados para a construção do mapa, a qual será discutida no item 3.9.

### 3.8 LOCALIZAÇÃO DOS GENES *glnA*, *ntxB* e *ntxC* NOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO pKRT1

Os fragmentos de restrição *EcoR* I, *Hind* III, *EcoR* I/*Hind* III, *Xho* I e *Pst* I originados do pKRT1 foram transferidos para uma membrana de nylon e submetidos a hibridização com as sondas radioativas *glnA*, *ntxB*, e *ntxC*.

Os resultados revelaram que a sonda *glnA* hibridizou fortemente com um fragmento *EcoR* I de 1,0 kpb e fracamente com um fragmento de 15,6 kpb. Por outro lado, as sondas *ntxB* e *ntxC* hibridizaram fortemente em um único fragmento *EcoR* I de 2,48 kpb e fracamente com os fragmentos *EcoR* I de 25,0 kpb (sonda *ntxC*) e, de 1,0 kpb (sonda *ntxB* e *ntxC*) que hibridizou anteriormente com a sonda *glnA* (Figura 15). A sonda *glnA* hibridizou também com os fragmentos *Hind* III de 0,99 kpb e 13,85 kpb, ao passo que as sondas *ntxB* e *ntxC* hibridizaram com um único fragmento *Hind* III de 3,87 kpb e fracamente com os fragmentos *Hind* III que hibridizaram com anteriormente com a sonda do gene *glnA*. O padrão de hibridização, obtido a partir dos fragmentos originados de um sistema de clivagem duplo contendo *EcoR* I e *Hind* III,

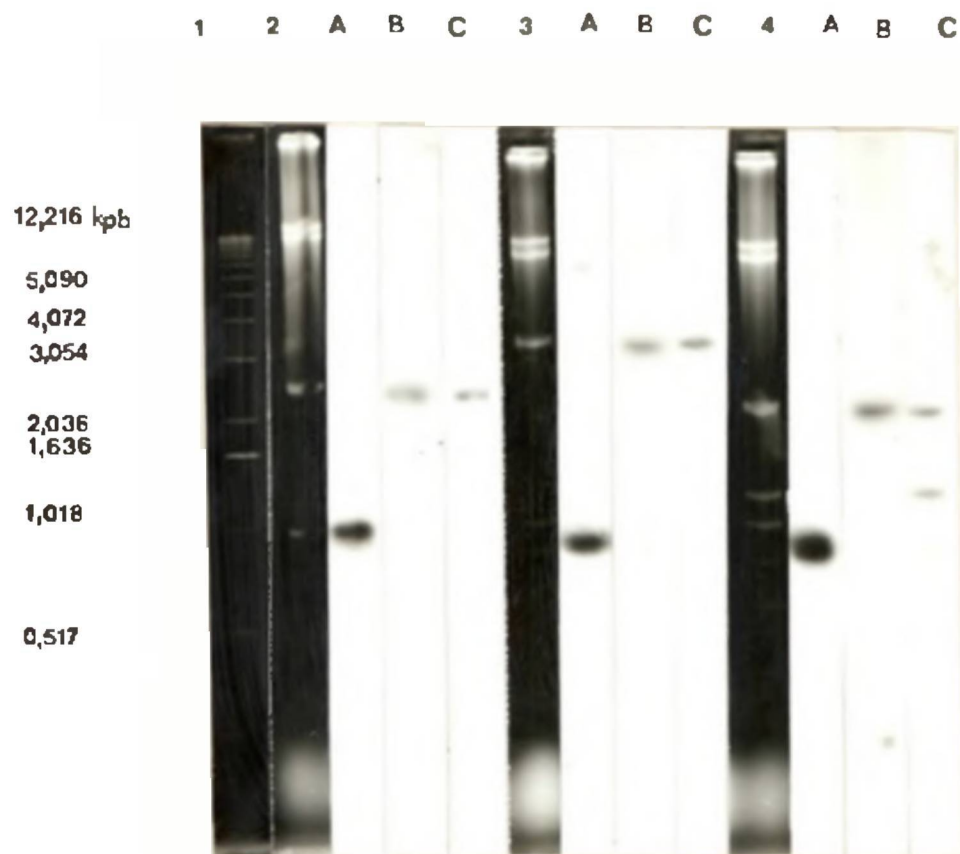


FIGURA 15: HIBRIDIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO PLASMÍDEO pKRT1 COM AS SONDAS *glnA*, *ntrB* E *ntrC*

O plasmídeo pKRT1 foi clivado com diversas endonucleases de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e tampão TBE 1x. A voltagem aplicada foi 25 V por 3 horas e 20 min. O gel foi tratado e o DNA transferido como descrito no item 2.15 de Materiais e Métodos. A hibridização foi realizada sob condições de baixa estringência como descrito em Materiais e Métodos (2.16). O plasmídeo pAT512, utilizado como molde para a síntese dos DNAs-sondas, contém os genes *glnA**ntrB**ntrC* de *Azotobacter vinelandii*.

- 1 padrão de peso molecular 1 kpb Ladder
- 2 pKRT1 clivado com *EcoR* I
- 3 pKRT1 clivado com *Hind* III
- 4 pKRT1 clivado com *EcoR* I/*Hind* III

Padrões de hibridização: A) Fragmento de 1,5 kpb contendo o gene *glnA*.  
 B) Fragmento de 2,8 kpb contendo o gene *ntrB*.  
 C) Fragmento de 1,7 kpb contendo o gene *ntrC*.

revelou que a hibridização com a sonda *glnA* ocorreu em dois fragmentos presentes na região de 1,0 kpb, ao passo que a sonda *ntxB* hibridizou com um fragmento de 2,42 kpb. A sonda *ntxC*, além de hibridizar com este fragmento *Hind* III (2,42 kpb), apresentou hibridização de mesma intensidade com outro fragmento *Hind* III, de 1,42 kpb (figura 15).

A sonda *glnA* também hibridizou fortemente com um fragmento *Pst* I de 4,1 kpb, enquanto que a *ntxB* apresentou três pontos de hibridização. O mais intenso foi observado para o fragmento *Pst* I de 0,4 kpb e os dois outros, de menor intensidade, correspondem aos fragmentos 0,9 kpb e 4,1 kpb. Por outro lado, a sonda *ntxC* hibridizou exclusivamente com os fragmentos *Pst* I de 1,8 kpb e 0,7 kpb. As sondas *glnA*, *ntxB* e *ntxC* hibridizaram exclusivamente com o fragmento *Xho* I de 40,0 kpb (Figura 16), tendo sido o tamanho deste fragmento deduzido a partir da eletroforese apresentada na Figura 11.

### 3.9 MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pKRT1

O mapa de restrição do plasmídeo recombinante pKRT1 (figura 17), foi construído de acordo com os resultados obtidos pelo padrão de clivagem desse plasmídeo com as endonucleases de restrição *EcoR* I, *Hind* III, *Bgl* II, *Xho* I e *Pst* I, em sistemas simples e duplo (Figuras 12 a 14).

Os tamanhos dos fragmentos obtidos pela clivagem simples e dupla do pKRT1 estão apresentados nas Tabelas 5 e

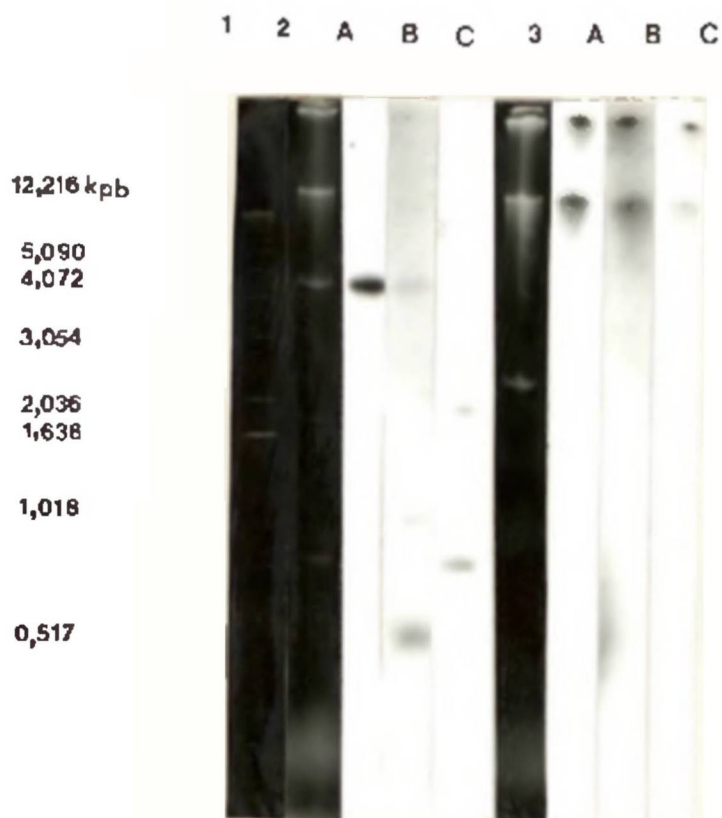


FIGURA 16: HIBRIDIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO PLASMÍDEO pKRT1 COM AS SONDAS *glnA*, *ntrB* E *ntrC*

O plasmídeo pKRT1 foi clivado com diversas endonucleases de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e tampão TBE 1x. A voltagem aplicada foi 25 V por 3 horas e 20 min. O gel foi tratado e o DNA transferido como descrito no item 2.15 de Materiais e Métodos. A hibridização foi realizada sob condições de baixa estringência como descrito em Materiais e Métodos (2.16). O plasmídeo pAT512, utilizado como molde para a síntese dos DNAs-sondas, contém os genes *glnA*, *ntrB* e *ntrC* de *Azotobacter vinelandii*.

- 1 padrão de peso molecular 1 kpb Ladder
- 2 pKRT1 clivado com *Pst* I
- 3 pKRT1 clivado com *Xho* I

Padrões de hibridização: A) Fragmento de 1,5 kpb contendo o gene *glnA*.  
 B) Fragmento de 2,8 kpb contendo o gene *ntrB*.  
 C) Fragmento de 1,7 kpb contendo o gene *ntrC*.

6.

Os fragmentos *Hind* III de 0,99; 1,15 e 3,87 kpb, assim como os fragmentos *EcoR* I de 0,42; 1,0 e 2,48 kpb permaneceram intactos após clivagem com *Xho* I ou *Bgl* II como segunda enzima. O fragmento *Xho* I de 2,25 kpb não foi clivado por nenhuma das outras enzimas utilizadas para a construção do mapa de restrição. Além disto a intensidade desse fragmento sugere que nesta região estejam contidos, provavelmente duas porções distintas de DNA oriundas do inserto contido no pKRT1. Por sua vez, os fragmentos *EcoR* I de 25,0, *Hind* III de 24,6 e *Bgl* II de 27,6 kpb não foram clivados pela endonuclease *Xho* I. Estes resultados sugerem a ausência de sítios de restrição para estas enzimas nesses fragmentos.

Fragmentos de 2,45 e 1,42 kpb foram obtidos após a clivagem do pKRT1 simultaneamente com *Hind* III e *EcoR* I, tendo sido observado o desaparecimento do fragmento *Hind* III de 3,48 kpb. Por outro lado, a presença de dois fragmentos próximos à região de 1,0 kpb, após a clivagem do pKRT1 na presença de *EcoR* I e *Hind* III, sugere que tanto o fragmento *EcoR* I de 1,0 kpb quanto o fragmento *Hind* III de 0,99 kpb correspondem a uma mesma região do pKRT1 onde os sítios para essas enzimas estariam localizados muito próximo.

Os fragmentos *Xho* I de 40,0 kpb e *Bgl* II de 15,2 e 27,6 kpb não aparecem em sistemas duplos dessas enzimas com *EcoR* I ou *Hind* III. Por sua vez, o fragmento *Bgl* II de 15,2 também desapareceu após clivagem com *Xho* I. A permanência dos outros fragmentos específicos para a clivagem com *Bgl* II

indica que os dois fragmentos *Xho* I presentes na região de 2,25 kpb estão localizados neste fragmento *Bgl* II. Esta análise permitiu a construção do mapa de restrição apresentado na Figura 17.

A localização dos genes *glnA*, *ntrB* e *ntrC* no mapa de restrição, do inserto de DNA de *H. seropedicae* presente no pKRT1, foi definida de acordo com os padrões de hibridização analisados anteriormente (Figuras 15 e 16).

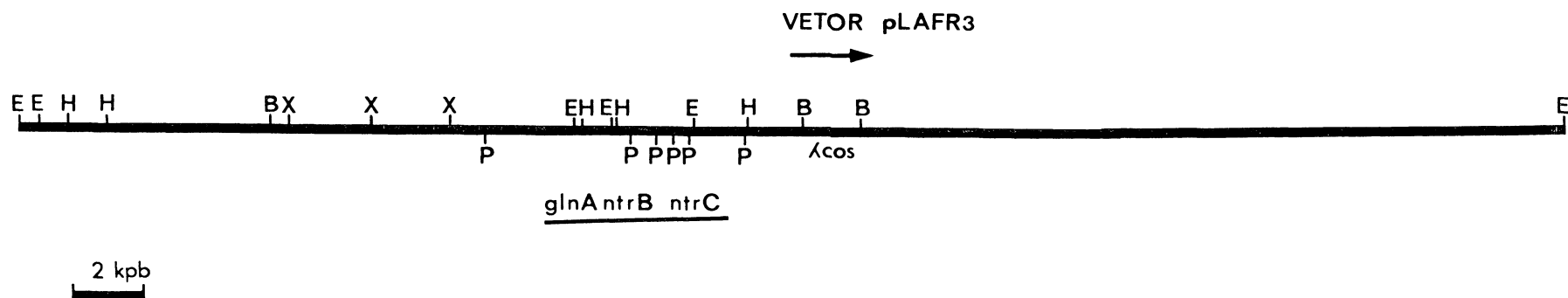


FIGURA 17: MAPA DE RESTRIÇÃO DO PLASMÍDEO pKRT1

O mapa de restrição do plasmídeo pKRT1 foi proposto de acordo com os resultados obtidos pela análise dos fragmentos, derivados dos sistemas de clivagem simples e composta, e pelo padrão de hibridização de alguns desses fragmentos.

E, *EcoR* I  
 H, *Hind* III  
 B, *Bgl* II  
 P, *Pst* I (só foram apresentados os sítios correspondentes a região dos genes).  
 X, *Xho* I



#### 4 DISCUSSÃO

Cinco plasmídeos recombinantes, pKRT1 a pKRT5, foram isolados de um banco genômico de *Herbaspirillum seropedicae*, através de complementação genética de um mutante *ntrC*<sup>-</sup> de *E. coli*. A frequência de conjugação, obtida durante a conjugação do banco genômico de *H. seropedicae* com o mutante *ntrC*<sup>-</sup> de *E. coli* ET8556, foi da ordem de  $10^{-5}$ , enquanto que a frequência relativa, correspondente aos transconjugantes que foram complementados geneticamente, foi da ordem de  $7,5 \cdot 10^{-4}$ . Considerando-se que o banco genômico apresenta uma representatividade da ordem de 100 % e que o tamanho do genoma de *Herbaspirillum seropedicae* foi assumido como sendo de 4200 kpb, o produto deste valor pela frequência relativa de complementação genética ( $7,5 \cdot 10^{-4}$ ), deve corresponder ao tamanho provável do operon *ntrBC*. Portanto, o tamanho provável do DNA que corresponde aos genes *ntrB* e *ntrC* em *Herbaspirillum seropedicae* é de 3,1 kpb. Esta conclusão se prende ao fato de que estes genes em *K. pneumoniae* e *Azotobacter vinelandii* estão organizados em um único operon (54, 170), e são transcritos à partir de um único promotor.

Além de complementar o mutante *ntrC*<sup>-</sup> de *E. coli* estirpe ET8556, os plasmídeos recombinantes (pKRT1 a pKRT5) foram capazes de restaurar o fenótipo Nif<sup>+</sup> de mutantes *ntrC*<sup>-</sup> de

*A. brasilense*. Assim, estes resultados demonstram que o gene *ntrC* de *Herbaspirillum seropedicae* é capaz de ativar a transcrição do operon *nifA* de *Azospirillum brasilense* e dos operons *ntr*-dependentes de *E. coli*. Dois grupos distintos de plasmídeos recombinantes capazes de corrigir a mutação *ntrC*<sup>-</sup> de *A. brasilense* foram isolados. Um grupo é representado pelos plasmídeos pKRT1 e pKRT5, e o outro pelos plasmídeos pKRT2, pKRT3 e pKRT4. Embora distintos, estes plasmídeos apresentam um único fragmento *EcoR* I de 2,48 kpb em comum, e que possivelmente contém o gene *ntrC*. O plasmídeo pKRT1 foi escolhido para estudos mais detalhados, por conferir maiores níveis de atividade nitrogenásica aos transconjugantes de *A. brasilense* FP8 e FP9.

A eliminação do plasmídeo recombinante pKRT1 dos transconjugantes *A. brasilense* FP8 (pKRT1) e FP9 (pKRT1) pelo plasmídeo R68.45 se deve ao fato deste plasmídeo pertencer ao mesmo grupo de incompatibilidade (IncP-1) do vetor pLAFR3, no qual foi construído o banco genômico de *Herbaspirillum seropedicae* (164, 71). Portanto, esta eliminação é devido a competição entre o pLAFR3 e o R68.45 pelos mesmos sítios receptores essenciais para a replicação ou segregação (73). A reversão do fenótipo Nif<sup>+</sup> dos transconjugantes *A. brasilense* FP8 (pKRT1) e FP9 (pKRT1) para Nif<sup>-</sup>, observado após a eliminação do pKRT1 pelo plasmídeo R68.45, demonstra que o plasmídeo pKRT1 foi o responsável pela complementação. Além disto, este experimento permitiu excluir a possibilidade dos mutantes terem sofrido uma reversão espontânea da mutação. A presença

do gene *ntrC* no plasmídeo pKRT1, sugerida pela complementação genética dos mutantes, foi confirmada pelos experimentos de hibridização, que revelaram também a presença dos genes *glnA* e *ntrB* neste plasmídeo.

Os transconjugantes FP8 (pKRT1) e FP9 (pKRT1) apresentaram entre 20 - 30 % de atividade da nitrogenase em relação àquela observada para a estirpe selvagem FP2. Estes resultados são semelhantes ao obtido para a complementação desses mutantes com o operon *glnAntrBC* de *K. pneumoniae* (133). Para interpretar esses resultados, pode-se aventar duas hipóteses: 1ª) provavelmente o gene *ntrC* de *Herbaspirillum seropedicae* não apresenta um grau de homologia suficiente para complementar eficientemente os mutantes de *A. brasilense*, ou 2ª) que a presença do gene *glnA* e seu promotor no plasmídeo pKRT1, em excesso, titule a proteína NtrC, inibindo parcialmente a transcrição do gene *nifA*. Essa ação competitiva, sugerida pelos resultados das atividades da fixação de nitrogênio e glutamina sintetase em *K. pneumoniae* pode ser explicada pela presença de um maior número de cópias do gene *glnA*, contido no plasmídeo recombinante e no genoma do mutante *ntrC*<sup>-</sup>, ao passo que o número de cópias do gene *nifA* só corresponderá ao do genoma da bactéria (54). Para comprovar se esta hipótese de competição é verdadeira, será necessário realizar uma avaliação das atividades da nitrogenase e da glutamina sintetase (GS) dos transconjugantes FP8 (pKRT1) e FP9 (pKRT1) e da estirpe selvagem (FP2).

Experimentos de hibridização revelaram que parte do

gene *ntrB* e o gene *ntrC* estão localizados em um único fragmento *EcoR* I de 2,48 kpb, enquanto que o gene *glnA* e parte do gene *ntrB*, estão localizados em um único fragmento *Pst* I de 4,1 kpb, que intercepta o fragmento *EcoR* I de 2,48 kpb. Estes resultados sugerem que em *H. seropedicae* os genes *glnA*, *ntrB* e *ntrC* apresentam organização semelhante àquela de *K. pneumoniae* (54) e *Azotobacter vinelandii* (170); diferindo, portanto, da organização observada em *A. brasilense* onde o gene *glnA* está distante do operon *ntrBC* (14). No caso dos fragmentos *EcoR* I do pKRT1, a fraca hibridização observada na banda referente ao gene *glnA* (fragmentos *EcoR* I de 1,0 kpb e 15,6 kpb), durante a hibridização com a sonda do gene *ntrC*, é possivelmente devido a uma pequena contaminação da preparação dessa sonda com o fragmento que contém o gene *glnA*.

O mapa de restrição do pKRT1 foi construído baseado nos dados de clivagem do vetor pLAFR3 e do pKRT1 por diversas enzimas de restrição. A clivagem do vetor pLAFR3 com *Bgl* II revela a presença de um fragmento de aproximadamente 1,7 kpb, referente ao sítio  $\lambda cos$ , ao passo que a clivagem composta com *EcoR* I e *Bgl* II gera um fragmento específico para de 20,3 kpb, além do fragmento de 1,7 kpb. No caso do sistema de clivagem duplo com *Bgl* II e *Hind* III, o vetor pLAFR3 apresenta dois fragmentos específicos, um de 1,4 kpb, e o outro de 1,7 kpb correspondente ao sítio  $\lambda cos$  (164). Com bases nestes dados e nos tamanhos dos fragmentos obtidos após clivagem do pKRT1, pode-se concluir que o tamanho do inserto de DNA de

*H. seropedicae* no plasmídeo pKRT1 é de aproximadamente 22,5 kpb.

Além disso, análise do padrão de clivagem do pKRT1 revelou a ausência de sítio de restrição específico para *BamH* I, considerando-se que a presença de uma banda acima da correspondente ao pKRT1 sugere a presença de um concatêmero e conseqüentemente indica que este plasmídeo não apresenta sequer um único sítio de clivagem para esta enzima. No caso da *Pst* I, o grande número de pequenos fragmentos obtidos da clivagem do pKRT1, tornou difícil a determinação do tamanho dos fragmentos e da localização destes sítios em relação àqueles das outras enzimas de restrição, exceto em relação a *EcoR* I na região dos genes.

O modelo proposto para a regulação da transcrição dos genes *nif* de *Herbaspirillum seropedicae* sugere que estes genes, além da regulação específica pelo produto do gene *nifA*, também estão sujeitos a regulação positiva dependente do sistema *ntr* (161).

O envolvimento dos genes do sistema *ntr* na regulação da transcrição dos genes *nif* de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78 foi sugerido por SOUZA *et al.* (162). Posteriormente, o sequenciamento da região do promotor do gene *nifA* de *H. seropedicae* permitiu identificar a presença de sequências potencialmente relacionadas com o sítio de ligação para a proteína NtrC e com o sítio de ligação para a proteína NifA, ambas localizadas próximas aos promotores -12/-24 (163). Estes resultados levaram os autores (161, 163) a sugerirem que a transcrição do gene *nifA* de

*H. seropedicae* está sujeita a ativação pela proteína NtrC, além de poder ser autoativado pela proteína NifA como em *K. pneumoniae* (113, 38).

O isolamento de um fragmento do DNA *Herbaspirillum seropedicae*, capaz de complementar mutantes *ntrC*<sup>-</sup> de *E. coli* e *A. brasilense* e que apresenta os genes *glnAntrBC*, confirmam o envolvimento do sistema *ntr* na expressão da nitrogenase desse microrganismo. Desta forma, os resultados apresentados indicam que o modelo de regulação positiva proposto para *Herbaspirillum seropedicae* (161) é semelhante àquele de *Klebsiella pneumoniae* e *Azospirillum brasilense* (54, 114, 133).

## 5 CONCLUSÕES

1) O plasmídeo recombinante pKRT1 contém um inserto de DNA de *Herbaspirillum seropedicae* de aproximadamente 22,5 kpb capaz de restaurar a capacidade de fixar nitrogênio em mutantes NtrC<sup>-</sup> de *A. brasilense* (FP8 e FP9) e de permitir crescimento dependente de L-arginina do mutante ntrC<sup>-</sup> de *E. coli* ET8556.

2) Estudos de hibridização confirmaram a presença do gene ntrC, além de revelar a presença de genes homólogos aos genes glnA e ntrB.

3) A análise do perfil de hibridização dos fragmentos de restrição do pKRT1 revelam que a organização dos genes glnA, ntrB e ntrC é contígua como em *Klebsiella pneumoniae* (54) e *Azotobacter vinelandii* (170), e distinta daquela descrita para *A. brasilense* (14, 15).

4) A presença do gene ntrC no genoma de *Herbaspirillum seropedicae* e a complementação de mutantes NtrC<sup>-</sup> de *A. brasilense* suportam fortemente o envolvimento do gene ntrC no mecanismo de regulação da transcrição do gene nifA de *Herbaspirillum seropedicae* como em *K. pneumoniae* (54) e *A. brasilense* (133).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALVAREZ-MORALES, A., DIXON, R. & MERRICK, M.J. Positive and negative control of the *glnAntrBC* regulon in *Klebsiella pneumoniae*. *EMBO J.*, 3:501-7, 1984.
- 2 AMERSHAM INTERNATIONAL. *Membrane transfer and detection methods*. England, s.ed., 1985. 56p.
- 3 BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D., SAMPAIO, M.J.A.M. & DÖBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. *An. Acad. Bras. Cien.* 56:365, 1984.
- 4 BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D., SELDIN, L. & DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36:86-93, 1986.
- 5 BALI, A., HILL, S., SANTERO, E., TOUKDARIAN, A., WALMSLEY, J & KENNEDY, C. NifA and NtrC activate separate nitrogen fixation pathways in *Azotobacter*. In: BOTHE, H., BRUIJN, F.J. & NEWTON, W.E., ed. *Nitrogen Fixation: hundred years after*. Stuttgart, Gustav Fisher, 1988. p.316.
- 6 BANKIER, A.T., WESTON, K.M. & BARREL, B.G. Random cloning and sequencing by the M13/dideoxynucleotide chain termination method. *Methods Enzimol.*, 155:51-93, 1987.
- 7 BETHESDA RESEARCH LABORATORIES. The catalogue of products for molecular biology. Glasgow, 1988. 124p.



- 8 BEYNON, J.; CANNON, M.C.; BUCHANAN-WOLLASTON, V.; & CANNON, F.C. The *nif* promoters of *Klebsiella pneumoniae* have a characteristic primary structure. *Cell*, 34:665-71, 1983.
- 9 BIRNBOIM, H. & DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.*, 7:1513-25, 1979.
- 10 BISHOP, P. E.; JARLENSKI, D. M. L. & HETHERINGTON, D. R. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:7342-6, 1980.
- 11 BISHOP, P. E.; JARLENSKI, D. M. L. & HETHERINGTON, D. R. Expression of an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, 150: 1244-51, 1982.
- 12 BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICALS. *Biochemicals for molecular biology*. Mannheim, s.ed., 1987. 172p.
- 13 BOLIVAR, F.; RODRIGUEZ, R. L.; GREENE, P. J.; BETLACH, M. C.; HEYNEKER, H. L.; BOYER, H. W.; CROSA, J. H. & FALKOW, S. Construction and characterization of new cloning vehicles. II A multipurpose cloning system. *Gene*, 2:95-113, 1977.
- 14 BOZOUKLIAN, H. & ELMERICH, C. Nucleotide sequence of the *Azospirillum brasilense* Sp 7 glutamine synthetase structural gene. *Biochimie*, 68:1181-7, 1986.
- 15 BOZOUKLIAN, H., FOGHER, C. & ELMERICH, C. Cloning and characterization of the *glnA* gene of *Azospirillum brasilense* Sp7. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.*, 137B:3-18, 1986.

- 16 BRAY, G.A. A simple efficient liquid scintillation for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.*, **1**:279-85, 1960.
- 17 BRIGLE, K.E., WEISS, M.C., NEWTON, W.E. & DEAN, D.R. Products of the iron-molybdenum cofactor-specific biosynthesis genes, *nifE* and *nifN*, are structurally homologous to the products of the nitrogenase molybdenum-iron protein genes, *nifD* and *nifK*. *J. Bacteriol.*, **169**:1547-53, 1987.
- 18 BUCHANAN-WOLLASTON, V. & CANNON, F.C. Regulation of *nif* transcription in *Klebsiella pneumoniae*. In: VEEGER, C. & NEWTON, W. E. eds. *Advances in Nitrogen Fixation Research*. The Hague, Nijhoff/Junk Publishers, 1984. p.732.
- 19 BUCHANAN-WOLLASTON, V., CANNON, M.C., BEYNON, J.C. & CANNON, F. The role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, **294**:776-8, 1981.
- 20 BUENO, R., PAHEL, G. & MAGASANIK, B. Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **164**:816-22, 1985.
- 21 BUIKEMA, W.J., KLINGENSMITH, J.A., GIBBONS, S.L. & AUSUBEL, F.M. Conservation of structure and location of *Rhizobium meliloti* and *Klebsiella pneumoniae nifB* genes. *J. Bacteriol.*, **169**:1120-26, 1987.
- 22 BURGESS, B.K., STIEFEL E.I. & NEWTON, W.E. Oxidation reduction properties and complexation reactions of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *J. Biol. Chem.*, **255**:353-6, 1980.

- 23 CANNON, M., HILL, S., KAVANAGH, E., CANNON, F. A molecular genetic study of *nif* expression in *K. pneumoniae* at the level of transcription, translation and nitrogenase activity. *Mol. Gen. Genet.* **198**:198-206, 1985.
- 24 CASADABAN, M. & COHEN, S. N. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **138**:179-207, 1980.
- 25 CLARKE, L. & CARBON, J. A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell*, **9**:91, 1976.
- 26 CORDEWERNER, J., HAAKER, H., VanEWIJK, P. & VEEGER, C. Properties of the MgATP and MgADP binding sites on the Fe protein of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Eur. J. Biochem.*, **148**:499-508, 1985.
- 27 DAVID, M., DAVERAN, M.L., BATUT, J., DEDIEU, A., DOMERGUE, O., GHAI, J., HERTIG, C., BOISTARD, P., & KHAN, D. Cascade regulation of *nif* gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell*, **54**:671-83, 1988.
- 28 de BRUIJN, F.J. & AUSUBEL, F.M. The cloning and characterization of the *glnF* (*ntrA*) gene of *Klebsiella pneumoniae*: role as *glnF* (*ntrA*) in the regulation of nitrogen fixation (*nif*) and other nitrogen assimilation genes. *Mol. Gen. Genet.*, **192**:342-53, 1983.
- 29 de BRUIJN, F.J., HILGERT, U., STIGTER, J., SCHNEIDER, M., MEYER z.A., H., KLOSSE, U. & PAWLOWSKI, K. Regulation of nitrogen fixation and assimilation genes in the free-living versus symbiotic state. In: GRESSHOFF, P.M., ROTH, L.E., STACEY, G. & NEWTON, W.E. eds. *Nitrogen fixation: achievements and objectives. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International*

*Congress of Nitrogen Fixation*. Knoxville, Tennessee  
U.S.A., Chapman & Hall, 1990. p. 33-44.

- 30 DEISTUNG, J.; CANNON, F. C.; CANNON, M. C.; HILL, S. &  
THORNELEY, R. N. F. Electron-transfer to nitrogenase  
in *Klebsiella pneumoniae nifF* gene cloned and the  
gene product, a flavodoxin purified. *Biochem. J.*,  
*231*:743-53, 1985.
- 31 DILWORTH, M. J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing  
preparations from *Clostridium pasteurianum*.  
*Biochem. Biophys. Acta*, *127*:285-94, 1966.
- 32 DITTA, G.; STANFIELD, S.; CORBIN, D. & HELINSKI, D. R.  
Broad host range DNA cloning system for  
gram-negative bacteria: Construction of a  
gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl.*  
*Acad. Sci. USA*, *77*:7347-51, 1980.
- 33 DITTA, G., VIRTS, E., PALOMARES, A. & KIM, C-H. The  
*nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated.  
*J. Bacteriol.*, *169*:3217-23, 1987.
- 34 DIXON, R.A. The genetic complexity of nitrogen  
fixation. *J. Gen. Microbiol.*, *130*:2745-55, 1984.
- 35 DIXON, R. Genetic Regulation of nitrogen fixation.  
In: COLE, J.A. & FERGUSON, S., ed. *The nitrogen and  
sulphur cycles*. Cambridge, Cambridge University,  
1988. p.417-38.
- 36 DIXON, R.A., AUSTIN, S., BUCK, M., DRUMMOND, M., HILL,  
S., HOLTEL, A. MAC FARLANE, S., MERRICK, M. &  
MINCHIN, S. Genetics and regulation of *nif* and  
related genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Phil.*  
*Trans. Royal Soc. Lond. B* *317*:147, 1987.

- 37 DÖBEREINER, J. & PEDROSA, F.O. *Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants*. Madison, Science Tech, 1987. 155p.
- 38 DRUMMOND, M., CLEMENTS, J., MERRICK, M. & DIXON, R. Positive control and autogenous regulation of the *nifLA* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, **301**:302-7, 1983.
- 39 DRUMMOND, M., WHITTY, P. & WOOTTON, J. Sequence and domains relationship of *ntnC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. *EMBO J.*, **5**:441-7, 1986.
- 40 DRUMMOND, M.H. & WOOTTON, J.C. Sequence of *nifL* from *Klebsiella pneumoniae*: mode of action and relationship to two families of regulatory proteins. *Mol. Microbiol.*, **1**:37-44, 1988.
- 41 EADY, R.R. Enzymology of free-living diazotrophs. In: BROUGHTON, W. J. & PÜHLER, A., ed. *Nitrogen fixation*. Oxford, Clarendon Press, 1986. v.4, p.1-49.
- 42 EADY, R.R. The vanadium-containing nitrogenase of Azotobacters. *Biofactors*, **1**:111-6, 1988.
- 43 EADY, R.R., IMAN, S., LOWE, D.J., MILLER, R.W., SMITH, B.E. & THORNELEY, R.N.F. The molecular enzymology of nitrogenase. In: STEWART, W.P.D. & GALLON, J.R. eds. *Nitrogen fixation proceedings Phytochemic. Soc. Eur.*, Academic Press, 1980. p. 19-35.
- 44 EADY, R.R., ISSACK, R., KENNEDY, C., POSTGATE, J.R. & RATCLIFFE, H.D. Nitrogenase synthesis in *Klebsiella pneumoniae*: comparison of ammonium and oxygen regulation. *J. Gen. Microbiol.*, **104**:277-86, 1978.

- 45 EADY, R.R., LOWE, D.J. & THORNELEY, R.N.F. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: a pre-steady state burst of ATP hydrolysis is coupled to electron transfer between the component proteins. *FEBS Lett.*, **95**:211-213, 1978.
- 46 EADY, R.R. & POSTGATE, J.R. Nitrogenase. *Nature*, **249**:805-10, 1974
- 47 EADY, R.R., RICHARDSON, T.H., MILLER, R.W., HAWKINS, M. & LOWE, D.J. The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*: purification and properties of the Fe protein. *Biochem. J.*, **256**:189-96, 1988.
- 48 EADY, R.R., ROBSON, R.L., PAU, R.N., WOODLEY, P., LOWE, D.J., MILLER, R.W., THORNELEY, R.N.F., SMITH, B.E. GORMAL, C., FISHER, K., ELDRIDGE, M. & BERGSTRÖM, J. The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. In: BOTHE, H., BRUIJN, F.J. & NEWTON, W.E., ed. *Nitrogen Fixation: hundred years after*. Stuttgart, Gustav Fisher, 1988. p.81-6.
- 49 EADY, R.R., ROBSON, R.L. RICHARDSON, T.H., MILLER, R.W. & HAWKINS, M. The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*: purification and properties of the VFe protein. *Biochem. J.*, **244**:197-207, 1987.
- 50 EADY, R.R., ROBSON, R.L. & SMITH, B.E. Alternative and conventional nitrogenases. In: COLE, J.A. & FERGUSON, S., ed. *The nitrogen and sulphur cycles*. Cambridge, Cambridge University, 1988. p.363-82.
- 51 EADY, R. R.; SMITH, B. E; COOK, K. A. & POSTGATE, J. R. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Purification and properties of the component proteins. *Biochem. J.*, **128**:655-75, 1972.

- 52 ESPIN, G. & MERRICK, M. Glutamine synthetase mutations which affect the expression of nitrogen fixation (*nif*) genes in *Klebsiella pneumoniae*. In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E. eds. *Current perspectives in nitrogen fixation*. Canberra, The Australian Academy of Science, 1980. p 399.
- 53 ESPIN, G., ALVAREZ-MORALES, A. & MERRICK, M. Complementation analysis of *glnA*-linked mutations which affect nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet.*, 184:213-7, 1981.
- 54 ESPIN, G., ALVAREZ-MORALES, A., CANNON, F., DIXON, R. & MERRICK, M. Cloning of the *glnA*, *ntrB* and *ntrC* genes of *Klebsiella pneumoniae* and studies of their role in regulation of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster. *Mol. Gen. Genet.*, 186:518-24, 1982.
- 55 FALK, E.C., JOHNSON, J.L., BALDANI, V.L.D., DÖBEREINER, J. & KRIEG, N.R. Deoxyribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36:80-5, 1986.
- 56 FEINBERG, A.P. & VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 137:266-267, 1984.
- 57 FIGURSKI, D.H. & HELINSKI, D.R. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in "trans". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:1648-52, 1979.

- 58 FILLER, W.A., KEMP, R.M., NG, J.C., HAWKES, T.R., DIXON, R.A. & SMITH, B.E. The *nifH* gene product is required for synthesis or stability of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase from *Klebsiella pneumoniae*. *Eur. J. Biochem.*, **160**:371-7, 1986.
- 59 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. *Nucl. Acids Res.*, **16**:2207-24, 1988.
- 60 FISCHER, H.-M. & HENNECKE, H. Direct response of *Bradyrhizobium japonicum* *nifA*-mediated *nif* gene regulation to cellular oxygen status. *Mol. Gen. Genet.*, **209**:621-6, 1987.
- 61 FOGHER, C., BOZOUKLIAN, H., BANDHARI, S. K. & ELMERICH, C. Construction of a genomic library of *Azospirillum brasilense* Sp7 and cloning of the glutamine synthetase gene. In: KLINGMÜLLER, W., ed. *Azospirillum III: genetics, physiology, ecology*. Berlin, Springer-Verlag, 1985. p.30-40.
- 62 FU, A.-H. & BURRIS, R.H. Ammonium inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. *J. Bacteriol.*, **171**:3168-75, 1989.
- 63 FU, H., HARTMANN, A., LOWERY, R.G., FITZMAURICE, W.P., ROBERTS, G.P. & BURRIS, R.H. Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.*, **171**:4679-85, 1989.



- 64 GAUTHIER, D. & ELMERICH, C. Relationship between glutamine synthetase and nitrogenase in *Spirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2:101-4, 1977.
- 65 GEORGIADIS, M.M., CHAKRABARTI, P. & REES, D.C. Crystal structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. In: GRESSHOFF, P.M., ROTH, L.E., STACEY, G. & NEWTON, W.E. eds. *Nitrogen fixation: achievements and objectives. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Congress of Nitrogen Fixation*. Knoxville, Tennessee U.S.A., Chapman & Hall, 1990. p. 111-6.
- 66 GILLIS, M., DÖBEREINER, J., POT, B., GOOR, M., FALSEN, E., HOSTE, B., REINHOLD, B. & KERSTERS, K. Taxonomic relationship between *Pseudomonas rubrisubalbicans*, some misnamed clinical isolates (EF group 1) and *Herbaspirillum seropedicae*. In: *Fifth International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-legumes. Program and abstracts*. Florence, Italy, 1990. p. 103.
- 67 GOSINK, M.M., FRANKLIN, N.M. & ROBERTS, G.P. The product of the *Klebsiella pneumoniae nifX* gene is a negative regulator of the nitrogen fixation (*nif*) regulon. *J. Bacteriol.*, 172:1441-7, 1990.
- 68 GUSSIN, G.N., RONSON, C.W. & AUSUBEL, F.M. Regulation of nitrogen fixation genes. *Annu. Rev. Genet.*, 20:567-91, 1986.
- 69 HAAKER, H. & KLUGKIST, J. The bioenergetics of electron transport to nitrogenase. *FEMS Microbiology Reviews*, 46:57-71, 1987.

- 70 HAAKER, H.; BRAAKSMA, A.; CORDEWENER, J.; KLUGKIST, J.; WASSINK, H.; GRANDE, H.; EADY, R. & VEEGER, C. Iron-sulfide content and ATP binding properties of nitrogenase component II from *Azotobacter vinelandii*. In: VEEGER, C. & NEWTON, W. E., eds. *Advances in Nitrogen Fixation Research*. The Hague, Nijhoff/Junk Publishers, 1984. p.123-31.
- 71 HAAS, D. & HOLLOWAY. Chromosome mobilization by the plasmid R68.45: a tool in *Pseudomonas* genetics. *Mol. Gen. Genet.*, 158:229-37, 1978.
- 72 HAGEMAN, R. V. & BURRIS, R. H. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 2699-702, 1978.
- 73 HARDY, K. *Bacterial plasmids*. Nairobi, Thomas Nelson, 1981. 104 p.
- 74 HARRIS, G.S., WHITE, T.C., FLORY, J.E. & ORME-JOHNSON, W.H. Genes required for formation of the apo MoFe protein of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase in *E. coli*. *J. Biol. Chem.*, 265:15909, 1990.
- 75 HARTMANN, A., FU, H. & BURRIS, R.H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. *J. Bacteriol.*, 165:864-70, 1986.
- 76 HASELKORN, R. Organization of the genes for nitrogen fixation in photosynthetic bacteria and cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 40:525-47, 1986.
- 77 HAWKES, T.R., MCLEAN, P.A. & SMITH, B.E. Nitrogenase from *nifV* mutant of *Klebsiella pneumoniae* contains an altered form of the iron molybdenum cofactor. *Biochem. J.*, 217:317-21, 1984.

- 78 HAWKES, T.R. & SMITH, B.E. The inactive MoFe protein NifB<sup>-</sup> kpi of *Klebsiella pneumoniae*. Its interaction with FeMo cofactor and the properties of the active MoFe protein formed. *Biochem. J.*, 223:783-92, 1984
- 79 HIRSCHMAN, J., WONG, P.-K., SEI, K., KEENER, J. & KUSTU, S. Products of nitrogen regulatory genes *ntrA* and *ntrC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription "in vitro": evidence that the *ntrA* product is a  $\sigma$  factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:7525-29, 1985.
- 80 HODGMAN, C. D., WEAST, R. C. & SELBY, M. S. *Handbook of chemistry and physics*. Cleveland, Chemical Rubber Publishing, 1960.
- 81 HOOVER, T.R., IMPERIAL, J., LUDDEN, P. & SHAH, V. Homocitrate is incorporated into the iron-molybdenum cofactor and affects substrate specificity of nitrogenase. In: BOTHE, H., BRUIJN, F.J. & NEWTON, W.E., ed. *Nitrogen fixation: hundred years after*. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.127.
- 82 HOOVER, T.R., ROBERTSON, A.D., CERNY, R.C., HAYES, R.N., IMPERIAL, J., SHAH, V.K. & LUDDEN, P.W. Identification of the V factor needed for synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase as homocitrate. *Nature*, 329:855-7, 1987.
- 83 HOOVER, T.R., SHAH, V.K., ROBERTS, G.P. & LUDDEN, P.W. *nifV*-dependent, low-molecular-weight factor required for in vitro synthesis of iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *J. Bacteriol.* 167:999-1003, 1986.
- 84 HOWARD, K.S., MACLEAN, P.A., HANSEN, F.B., LEMLEY, P.V., KOBLAN, K.S. & ORME-JOHNSON, W.H. *Klebsiella pneumoniae nifM* gene product is required for stabilization and activation of nitrogenase iron protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 261:772-8, 1986.

- 85 HOWARD, J.B., DAVIS, R., NOLDENHAUER, B., CASH, V.L. & DEAN, D. *J. Biol. Chem.*, **264**:11270-74, 1989.
- 86 HUNT, T. P. & MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG*, and *glnL*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**:8453-7, 1985.
- 87 IMPERIAL, J., UGALDE, R.A., SHAH, V.K. & BRILL, W.J. Role of *nifQ* gene in the incorporation of molybdenum into nitrogenase *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **158**:187-94, 1984.
- 88 JOERGER, R.D., JACOBSON, M.R. & BISHOP, P.E. Two *nifA*-like genes required for expression of alternative nitrogenases by *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **171**:3258-67, 1989.
- 89 JOERGER, R.D. JACOBSON, M.R., PREMAKUMAR, R., WOLFINGER, E.D. & BISHOP, P.E. Nucleotide sequence and mutational analysis of the structural genes (*anfH**DGK*) for the second alternative nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*, **171**:1075-86, 1989.
- 90 KAHN, D., DAVID, M., BATUT, J., DAVERAN, M.L. GARNERONE, A.M., HERTIG, C., PAQUES, F., LI RUO YA & BOISTARD, P. Cascade activation of *nif* genes in *Rhizobium meliloti*. In: BOTHE, H., BRUIJN, F.J. & NEWTON, W.E., ed. *Nitrogen fixation: hundred years after*. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.357-61.
- 91 KANEMOTO, R.H. & LUDDEN, P.W. Effect of ammonia, darkness, and phenazine methosulfate on whole-cell nitrogenase activity and Fe protein modification in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.*, **158**:713-20, 1984.

- 92 KENNEDY, C. The genetics of nitrogen fixation. In: HOPWOOD, D.A. & CHATER, K.F., ed. *Genetics of bacterial diversity*. London, Academic Press, 1989. p.107-27.
- 93 KENNEDY, C. & TOUKDARIAN, A. Genetics of Azotobacters: Applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.*, **41**:227-58, 1987.
- 94 KIMBER, S.J., BISHOP, E.O & SMITH, B.E. Evidence on the role(s) of ATP in the mechanism of nitrogenase from proton NMR relaxation studies on metal and nucleotide binding to the molybdenum-iron protein. *Bioch. Bioph. Acta* **705**:385-95, 1982.
- 95 KNOPIK, M.A., FUNAYAMA, S., RIGO, L.U., SOUZA, E.M. & PEDROSA, F.O. Cloning and molecular characterization of the *nifA* gene of *Azospirillum brasilense* strain FP2. In: *Fifth International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-legumes. Program and abstracts*. Florence, Italy, 1990. p. 11.
- 96 KUSTU, S., BURTON, D., GARCIA, E., MCCARTER, L. & MCFARLAND, N. Nitrogen control in *Salmonella*: regulation by the *glnR* and *glnF* gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**:4576-80, 1979.
- 97 LEONARDO, J.M. & GOLDBERG, R.B. Regulation of nitrogen metabolism in glutamine auxotrophs of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **142**:99-110, 1980.
- 98 LEWIN, B. *Genes*. New York, John Wiley, 1983. 715 p.
- 99 LIANG, J., MADDEN, M., SHAH, V.K. & BURRIS, R.H. Citrate substitutes for homocitrate in nitrogenase of a *nifV* mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemistry*, **29**:8577-81, 1990

- 100 L. JONES, T. & BURRIS, R.H. ATP hydrolysis and electron transfer in the nitrogenase reaction with different combinations of the iron protein and the molybdenum-iron protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **275**:93-101, 1972
- 101 LOWE, D.J., FISHER, K. & THORNELEY, R.N.F. *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase mechanism of acetylene reduction and its inhibition by carbon monoxide. *Biochem. J.*, **272**:621-5, 1990.
- 102 LOWE, D.J., POSTGATE, J.R. & THORNELEY, R.N.F. Biochemical constraints of biological nitrogen fixation. In: MALIK, K.A., NAQVI, S.H.M. & ALEEM, M.I.H., ed. *Nitrogen and the environment*. Faisalabad (Pakistan), Nuclear Institute for Agriculture and Biology, 1985. p.73-91.
- 103 LOWERY, R.G., SAARI, L.L. & LUDDEN, P.W. Reversible regulation of the nitrogenase iron protein from *Rhodospirillum rubrum* by ADP-ribosylation in vitro. *J. Bacteriol.*, **166**:513-8, 1986.
- 104 LOWRY, O.M., ROSENROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Mol. Chem.*, **193**:265-75, 1951.
- 105 LUDDEN, P.W. & BURRIS, R.H. Activating factor for the iron protein of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Science*, **194**:424-6, 1976.
- 106 LUDDEN, P.W., ROBERTS, G.P., LOWERY, R.G., FITZMAURICE, W.P., SAARI, L.L., LEHMAN, L., LIES, D., WOEHLER, D., WIRT, H., MURREL, S.A., POPE, R.R. & KANEMOTO, R.H. Regulation of nitrogenase activity by reversible ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase. In: BOTHE, H., BRUIJN, F.J. & NEWTON, W.E., ed. *Nitrogen fixation: hundred years after*. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.157-62.

- 107 MacNEIL, T., MacNEIL, D., ROBERTS, G. P., SUPIANO, M. A. & BRILL, W. J. Fine structure mapping and complementation analysis of *nif* (nitrogen fixation) genes in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **136**:253-66, 1978.
- 108 MAGASANIK, B. Regulation of bacterial nitrogen assimilation by glutamine synthetase. *TIBS*, **2**:9-12, 1977.
- 109 MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. & SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545p.
- 110 McFARLAND, N., McCARTER, L., ARTZ, S. & KUSTU, S. Nitrogen regulatory locus "*glnR*" of enteric bacteria is composed of cistrons *ntxB* and *ntxC*: Identification of their protein products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**:2135-39, 1981.
- 111 McLEAN, P.A. & DIXON, R.A. Requirement of *nifV* gene for production of wild type nitrogenase enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, **292**:655-56, 1981.
- 112 McLEAN, P.A., PAPAETHYMIU, V., MUNCK, E. & ORME-JOHNSON, W.H. Use of isotopic hybrids of the MoFe protein to study the mechanism of nitrogenase catalysis. In: BOTHE, H., BRUIJN, F.J. & NEWTON, W.E., ed. *Nitrogen fixation: hundred years after*. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.101-6.
- 113 MERRICK, M. Nitrogen control of *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of the *ntxA* gene and analogies between *ntxC* and *nifA*. *EMBO J.*, **2**:39-44, 1983.

- 114 MERRICK, M.J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In BOTHE, H., BRUIJN, F.J. & NEWTON, W.E., ed. *Nitrogen fixation: hundred years after*. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.293-302.
- 115 MERRICK, M. & GIBBINS, J.R. The nucleotide sequence of the nitrogen regulation gene *ntrA* of *Klebsiella pneumoniae* and comparison with conserved features in bacterial sigma factors. *Nucl. Acids Res.*, *13*:7607-20, 1985.
- 116 MERRICK, M.J. & STEWART, W.D.P. Studies on the regulation and function of the *Klebsiella pneumoniae ntrA* gene. *Gene*, *35*:297-303, 1985.
- 117 MILLER, P.W. & EADY, R.R. Molybdenum nitrogenase of *A. choococcum* tight binding of MgADP to the MoFe protein. *Biochem. J.*, *263*:725-9, 1989.
- 118 MORGAN, T.V., McCracken, J., ORME-JOHNSON, W.H., MIMS, W.B. MORTENSON, L.E. & PEISACH, J. Pulsed electron paramagnetic resonance studies of the interaction of MgATP and D<sub>2</sub>O with the iron protein of nitrogenase. *Biochem.*, *29*:3077-82, 1990.
- 119 NELSON, M.J., LEVY, M.A. & ORME-JOHNSON, W.H. Metal and sulfur composition of iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *80*:47-50, 1983.
- 120 NEWTON, W.E., McDONALD, J.W., FRIESEN, G.D., BURGESS, B.K., CONRADSON, S.D. & HODGSON, K.O. Molybdenum-iron-sulfur complexes and their relevance to the molybdenum site of nitrogenase. In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E. eds. *Current perspectives in nitrogen fixation*. Canberra, The Australian Academy of Science, 1980. p 30-9.



- 121 NINFA, A.J. & MAGASANIK, B. Covalente modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**:5909-13, 1986.
- 122 ORME-JOHNSON, W.H. Molecular basis of biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Biophys. Chem.*, **14**:419-59, 1985.
- 123 OW, D.W. & AUSUBEL, F.M. Regulation of nitrogen metabolism genes by *nifA* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, **301**:307-13, 1983.
- 124 OW, D.W., XIONG, Y., GU, Q. & SHEN, S.-C. Mutational analysis of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase promoter: sequences essential for positive control by *nifA* and *ntrC* (*glnG*) gene products. *J. Bacteriol.*, **161**:868-74, 1985.
- 125 PAHEL, G. & TYLER, B. A new *glnA*-linked regulatory gene for glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **133**:139-48, 1979.
- 126 PAU, R.N., MITCHENALL, L.A., EADY, R.R. & ROBSON, R.L. Genetics of Mo-independent nitrogenase. In: BOTHE, H., BRUIJN, F.J. & NEWTON, W.E., eds. *Nitrogen fixation: hundred years after*. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.13-20.
- 127 PAU, R.N., MITCHENALL, L.A. & ROBSON, R.L. Genetic evidence for an *Azotobacter vinelandii* nitrogenase lacking molybdenum and vanadium. *J. Bacteriol.*, **171**:124-9, 1989.
- 128 PAUL, W. & MERRICK, M. The nucleotide sequence of the *nifM* gene of *Klebsiella pneumoniae* and identification of a new *nif* gene: *nifZ*. *Euro. J. Biochem.*, **170**: 259-65, 1987.

- 129 PAUL, W. & MERRICK, M. The roles of the *nifW*, *nifZ* and *nifM* genes of *Klebsiella pneumoniae* in nitrogenase biosynthesis. *Eur. J. Biochem.*, 178:675-82, 1989.
- 130 PEDROSA, F.O. Physiology, biochemistry, and genetics, of *Azospirillum* and other root-associated nitrogen-fixing bacteria. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*, 6:345-84, 1988.
- 131 PEDROSA, F.O., SOUZA, E.M.S., MACHADO, H.B.M., RIGO, L.U. & FUNAYAMA, S. Regulation of *nif* genes expression in *A. brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. In: SKINNER, F.A., BODDEY, R.M. & FENDRIK, I. eds. Nitrogen fixation with non-legumes. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1989. p. 155-163.
- 132 PEDROSA, F.O. & YATES, M.G. *Nif* mutants of *Azospirillum brasilense*: evidence for a *nifA*-type regulation. In: KLINGMÜLLER, W., ed. *Azospirillum II: genetics, physiology, ecology*. Basel, Birkhauser-Verlag, 1983. p.66-77.
- 133 PEDROSA, F.O. & YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. *FEMS Microbiol. Lett.*, 23:95-101, 1984.
- 134 PEREIRA, J.A.R., CAVALCANTE, V.A., BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp and *H. seropedicae*. In: SKINNER, F.A., BODDEY, R.M. & FENDRIK, I. eds. Nitrogen fixation with non-legumes. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1989. p. 219-24.
- 135 PERROUD, B.; BANDHARI, S. K. & ELMERICH, C. The *nifHDK* operon of *Azospirillum brasilense* Sp7. In: KLINGMULLER, W., ed. *Azospirillum III: Genetics, Physiology, Ecology*. Berlin,

Springer-Verlag, 1985. p.10.

- 136 PIMENTEL, J.P., OLIVARES, F., PITTARD, R.M.,  
URQUIAGA, S., AKIBA, F. & DÖBEREINER, J.  
Dinitrogen fixation and infection of grass  
leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and  
*Herbaspirillum seropedicae*. *Plant & Soil*, 1991 (no  
prelo).
- 137 POPE, M.R., MURREL, S.A. & LUDDEN, P.W. Covalent  
modification of the iron protein of nitrogenase  
from *Rhodospirillum rubrum* by adenosine  
diphosphoribosylation of a specific arginin &  
residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3173-3177,  
1985.
- 138 POSTGATE, J.R. *The fundamentals of nitrogen fixation*.  
Cambridge, Cambridge University Press, 1982.
- 139 PREMAKUMAR, R., LEMOS, E.M. & BISHOP, P.E. Evidence  
for two dinitrogenase reductases under  
regulatory control by molybdenum in  
*Azotobacter vinelandii*. *Biochim. Biophys. Acta*,  
797:64-70, 1984.
- 140 RIVERA-ORTIZ, J.M. & BURRIS, R.H. Interactions among  
substrates and inhibitors of nitrogenase. *J.*  
*Bacteriol.*, 123:537-47, 1975.
- 141 ROBERTS, G.P. & BRILL, W.J. Gene product relationship  
of the *nif* regulon of *Klebsiella pneumoniae*. *J.*  
*Bacteriol.*, 144:210-6, 1980.
- 142 ROBERTS, G.P., MACNEIL, T., MACNEIL, D. & BRILL, W.J.  
Regulation and characterization of protein products  
coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of  
*Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 136:267-79,  
1978

- 143 ROBSON, R.L., CHESSHIRE, J.A., WHEELER, C., JONES, R., WOODLEY, P.E. & POSTGATE, J. Genome size and complexity in *Azotobacter chroococcum*, *J. Gen. Microbiol.*, **130**:1603-12, 1984.
- 144 ROBSON, R.L., WOODLEY, P.R., PAU, R.N. & EADY, R.R. Structural genes for vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. *EMBO J.*, **8**:1217-24, 1989.
- 145 ROBSON, R., WOODLEY, P.R. & JONES, R. Second gene (*nifH<sup>st</sup>*) coding for a nitrogenase iron-protein in *Azotobacter chroococcum* is adjacent to a gene coding for ferredoxin-like protein. *EMBO J.*, **5**: 1159-63, 1986.
- 146 RUBINSON, J.F. CORBIN, J.L. & BURGESS, B.K. Nitrogenase reactivity: methyl isocyanide as substrate and inhibitor. *Biochemistry*, **22**:6260-68, 1983.
- 147 SAARI, L.L.; TRIPLETT, E. W. & LUDDEN, P. W. Purification and properties of the activating enzyme for iron protein of nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.*, **259**:15502-8, 1984.
- 148 SANTERO, E., HOOVER, T., KEENER, J. & KUSTU, S. "In vitro" activity of the nitrogen fixation regulatory protein NifA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**:7346-50, 1989.
- 149 SANTERO, E., TOUKDARIAN, A., HUMPHREY, R. & KENNEDY, C. Identification and characterization of two nitrogen fixation regulatory regions, *nifA* and *nfrX*, in *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter chroococcum*. *Mol. Microbiol.*, **2**:303-14, 1988.

- 150 SCHÖLLHORN, R. & BURRIS, R. H. Acetylene as a competitive inhibitor of  $N_2$  fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **58** :213-6, 1967.
- 151 SHAH, V.K. & BRILL, W.J. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**:3249-53, 1977.
- 152 SHAH, V.K., HOOVER, T.R., IMPERIAL, J., PAUSTRON, T.D., ROBERTS, G.P. & LUDDEN, P.W. Role of the *nif* products and homocitrate in the biosynthesis of iron-molybdenum cofactor. In: BOTHE, H., BRUIJN, F.J. & NEWTON, W.E., ed. *Nitrogen fixation: hundred years after*. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.115-20.
- 153 SHAH, V. K., STACEY, G. & BRILL, W. J. Electron transport to nitrogenase: purification and characterization of pyruvate:flavodoxin oxidoreductase, the *nifJ* gene product. *J. Biol. Chem.*, **258**:12064-8, 1983.
- 154 SHEN, S-C.; XUE, Z-T.; KONG, Q-T. & WU, Q-L. An open reading frame upstream from the *nifH* gene of *Klebsiella pneumoniae*. *Nucl. Acids Res.*, **11**:4241-50, 1983.
- 155 SMITH, B.E., BISHOP, P.E., DIXON, R.A., EADY, R.R., FILLER, W.A., LOWE, D.J., RICHARDS, A.J.M., THONSON, A.J., THORNELEY, R.N.F. & POSTGATE, J.R. The iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. In: EVANS, H.J., BOTTOMLEY, P.J. & NEWTON, W.E., eds. *Nitrogen fixation research progress*. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.597-603.

- 156 SMITH, B.E., BUCK, M., EADY, R.R., LOWE, D.J., THORNELEY, R.N.F., ASHBY, G., DEISTUNG, J., ELDRIDGE, M., FISHER, K., GORMAL, C., IOANNIDIS, I., KENT, H., ARBER, J., FLOOD, A., GARNER, C.D., HASNAIN, S. & MILLER, R. Recent studies on the structure and function of molybdenum nitrogenase. In: BOTHE, H., BRUIJN, F.J. & NEWTON, W.E., ed. *Nitrogen fixation: hundred years after*. Stuttgart, Gustav Fischer, 1988. p.91-100.
- 157 SMITH, B.E., CAMPBELL, F., EADY, R.R., ELDRIDGE, M., FORD, C.M., HILL, S., KAVANAGH, E.P., LOWE, D.J., MILLER, R.W., RICHARDSON, T.H., ROBSON, R.L., THORNELEY, R.N.F. & YATES, M.G. Biochemistry of nitrogenase and the physiology of related metabolism. *Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. B* 317:131, 1987.
- 158 SMITH, B.E., DIXON, R.A., HAWKES, T.R., LIANG, Y.-C., McLEAN, P.A. & POSTGATE, J.R. Nitrogenase from *nifV* mutants of *Klebsiella pneumoniae*. In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E. eds. *Current perspectives in nitrogen fixation*. Canberra, The Australian Academy of Science, 1980. p 139.
- 159 SMITH, B.E., EADY, R.R., LOWE, D.J. & GORMAL, C. The vanadium-iron protein of vanadium nitrogenase from *Azotobacter chroococcum* contains an iron-vanadium cofactor. *Biochem. J.*, 250:299-302, 1987.
- 160 SMITH, B.E., FILLER, W.A., DIXON, R.A., KEMP, R.M., NG, J.C. & HAWKES, T.R. The *nifH* gene product is essential for the production of the active FeMoco of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase. In: ULRICH, W.R., APARICIO, P.J., SYRRET, P.J. & CASTILHO, F., ed. *Inorganic nitrogen metabolism*. Berlin, Springer Verlag, 1987. p.198.

- 161 SOUZA, E.M. Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*. Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica da UFPR, 1990. 264 p.
- 162 SOUZA, E.M., FUNAYAMA, S., RIGO, L.U. & PEDROSA, F.O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *Can. J. Microbiol.*, **37**:425, 1991.
- 163 SOUZA, E.M., FUNAYAMA, S., RIGO, L.U., YATES, G.M. & PEDROSA, F.O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. *J. Gen. Microbiol.*, **137**:1511-22, 1991.
- 164 STASKAWICZ, B., DAHLBECK, D., KEEN, N. & NAPOLI, C. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* p.v. *glycinea*. *J. Bacteriol.*, **169**:5789-94, 1987.
- 165 STREICHER, S.L., SHANMUGAM, K.T., AUSUBEL, F.M., MORANDI, C. & GOLDBERG, R.B. Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae*: evidence for a role of glutamine synthetase as a regulator of nitrogenase synthesis. *J. Bacteriol.*, **120**:815-21, 1974.
- 166 SZETO, W.W., NIXON, B.T., RONSON, C.W. & AUSUBEL, F.M. Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti ntrC* gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. *J. Bacteriol.*, **169**:1423-32, 1987.

- 167 THÖNY, B., ANTHAMATTEN, D. & HENNECKE. Dual control of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic nitrogen fixation regulatory operon *fixR nifA*: analysis of "cis"- and "trans"-acting elements. *J. Bacteriol.*, **171**:4162-69, 1989.
- 168 THÖNY, B., FISCHER, H.-M., ANTHAMATTEN, D., BRUDERER, T. & HENNECKE, H. The symbiotic nitrogen fixation regulatory operon (*fixRnifA*) of *Bradyrhizobium japonicum* is expressed aerobically and is subject to a novel, *nifA*-independent type of activation. *Nucl. Acids Res.*, **15**:8479-99, 1987.
- 169 THORNELEY, R.N.F. & LOWE, D.J. Kinetics and mechanism of nitrogenase enzyme system. In: Spiro, T.G. ed. *Molybdenum enzymes*. New York, Wiley & Sons, 1985. p 221-84.
- 170 TOUKDARIAN, A. & KENNEDY, C. Regulation of nitrogen metabolism in *Azotobacter vinelandii*: isolation of *ntr* and *glnA* genes and construction of *ntr* mutants. *EMBO J.*, **5**:399-407, 1986.
- 171 TUBB, R.S. Glutamine synthetase and ammonium regulation of nitrogenase synthesis in *Klebsiella*. *Nature*, **251**:481-5, 1974.
- 172 WINNACKER, E.-L. *From genes to clones. Introduction to DNA technology*. New York, VCH publishers, 1987. 634 p.