

Tese de Doutorado

Luc Felicianus Marie Rouws

MUTAGÊNESE DE TRANSPOSON
COMO FERRAMENTA EM ESTUDOS
FISIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS
DA BACTÉRIA
GLUCONACETOBACTER
DIAZOTROPHICUS

Instituto de Bioquímica Médica
Universidade Federal do Rio de Janeiro
2008

UFRJ

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Luc Felicianus Marie Rouws

MUTAGÊNESE DE TRANSPOSON
COMO FERRAMENTA EM ESTUDOS
FISIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS
DA BACTÉRIA
GLUCONACETOBACTER
DIAZOTROPHICUS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, do Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

Orientadora: Adriana Silva Hemerly

Co-orientador: José Ivo Baldani

Rio de Janeiro
março/2008

FICHA BIBLIOGRÁFICA

Rouws, Luc Felicianus Marie

Mutagênese de transposon como ferramenta em estudos fisiológicos e ecológicos da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* / Luc Felicianus Marie Rouws. Rio de Janeiro, 2008. xx, 158 f.: il.; 31 cm.

Tese (doutorado) – UFRJ / Instituto de Bioquímica Médica / Programa de Pós-graduação em Química Biológica, 2008.

Orientadora: Adriana Silva Hemerly.

Referências Bibliográficas: f. 102-113.

1. transposome. 2. cana-de-açúcar. 3. *quorum sensing*. 4. motilidade. 5. biofilme. 6. reparo de DNA. 7. genoma funcional.
I. Hemerly, Adriana Silva. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-graduação em Química Biológica. III. Título.

Luc Felicianus Marie Rouws

Mutagênese de transposon como ferramenta em estudos fisiológicos e ecológicos da bactéria
Gluconacetobacter diazotrophicus.

Orientadora: Adriana Silva Hemerly

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica,
Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do
título de Doutor em Química Biológica.

Aprovada por:

Prof. Dr. Fabio Lopes Olivares,
Centro de Biociências e Biotecnologia, IB, UENF

Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Depto. de Bioquímica, UFPR

Prof. Dr. Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira
Inst. Bioquímica Médica CCS- UFRJ

Rio de Janeiro
Março/ 2008

*Dedico esta tese à minha esposa Janaína aos meus filhos Maarten e Lara,
aos meus pais e irmã, Rob, Anne e Saartje,
e aos meus familiares e amigos.*

*Dit proefschrift draag ik op aan Janaina, Maarten en Lara,
aan mijn ouders en zus, Rob, Anne en Saartje,
en aan mijn familie en vrienden.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus orientadores Adriana Hemerly e Ivo Baldani pela orientação e pelas valiosas discussões do trabalho. Agradeço ao meu revisor Orlando Martins pelas críticas construtivas e à Tereza, secretária da pós-graduação, pela ajuda nas questões burocráticas. Também queria agradecer a todos os colegas do laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia pela ajuda e pelo clima agradável de trabalho. Em especial agradeço aos pesquisadores Kátia, Jean, Márcia, Stefan, Verônica e Janaina pela ajuda e pelas discussões interessantes. Gostaria de agradecer ao professor Álvaro Leitão pela ajuda com as medições de luz UV-C. Agradeço à Patrícia Gitahy que sempre foi uma pessoa que resolvia muitas questões logísticas do laboratório, ao colega André de Oliveira pela ajuda nos experimentos de PCR de transcrição reversa, e aos colegas na pesquisa sobre a *G. diazotrophicus*, a Helma e a Elisete, pelas discussões interessantes e pela cooperação. Obrigado também ao Paulo Boa Sorte por me ajudar no experimento na casa de vegetação na fase final da minha tese. Estou grato ao Geraldo pela ajuda com a microscopia eletrônica, à Liamara pela ajuda com os testes de motilidade em tubos de vidro e à Aline pela ajuda no laboratório de sequenciamento. Também agradeço ao Cláudio, pela ajuda na preparação de experimentos de casa de vegetação e ao Mazinho, Marildo, Jorge, Luiz Carlos e Lúcio pela autoclavagem e demais ajuda técnica. Agradeço aos colegas do Jardim Botânico, Janaina Cavalcante e ao Eduardo por ter fornecido as plantas micropropagadas de cana-de-açúcar.

RESUMO

MUTAGÊNESE DE TRANSPOSON COMO FERRAMENTA EM ESTUDOS FISIOLÓGICOS E ECOLÓGICOS DA BACTÉRIA *GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS*

Luc Felicianus Marie Rouws

Orientadora: Adriana Silva Hemerly

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

O presente trabalho estabelece metodologias para a transformação genética e a mutagênese aleatória e sítio-dirigida da estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que é uma bactéria promotora de crescimento vegetal, isolada do interior da cana-de-açúcar. A sequência completa do genoma de *G. diazotrophicus* foi determinada e, para estudos de genoma funcional, ferramentas moleculares são imprescindíveis. Com o intuito de gerar mutantes insercionais aleatórios, *G. diazotrophicus* foi transformada com o transposon comercial *EZ::Tn5TM <kan-2>Tnp TransposomeTM* usando a técnica de eletroporação. A metodologia aplicada se mostrou altamente eficiente e estudos moleculares demonstraram que as mutações foram geneticamente estáveis *in vitro* e ocorreram de forma aleatória. Uma metodologia de PCR inverso seguida de sequenciamento foi desenvolvida, possibilitando a determinação de sítios de inserção de 31 mutantes aleatórios. Dois mutantes designados B12 e C12, com inserções em genes com provável função conhecida, foram usados em experimentos para validar a confiabilidade da metodologia de PCRI. O mutante B12 com a inserção em um gene homólogo de *uvrC*, que tem uma função em reparo de DNA, apresentou um fenótipo de hipersensibilidade à irradiação mutagênica com luz UV-C. Já o mutante C12, com a inserção em um homólogo do gene flagelar *flgA*, perdeu a motilidade dependente de flagelos e foi deficiente na formação de biofilmes em lâ de vidro. Experimentos de inoculação de plantas de cana-de-açúcar com o mutante flagelar C12 mostraram a estabilidade genética após seis semanas dentro da planta em condições de casa de vegetação, sugerindo que as inserções do transposon foram estáveis tanto *in vitro* quanto *in planta*, possibilitando o uso destes mutantes em experimentos ecológicos e de interação entre a planta e a bactéria.

Análises de bioinformática possibilitaram a identificação de um possível sistema de monitoramento populacional, ou *quorum sensing* (QS), no genoma da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*. A produção de moléculas autoindutoras não foi observada, mas experimentos de PCR de transcrição reversa mostraram a expressão dos genes de QS, *GdluxI*, *GdluxR1* e *GdluxR2* durante o crescimento de *G. diazotrophicus*. Usando o *EZ::Tn5TM <kan-2> transposon insertion kit*, foi possível gerar mutantes sítio-dirigidos no gene *GdluxI*, que codifica uma proteína de síntese de autoindutor. Embora testes preliminares não revelaram fenótipos para estes mutantes, os dados apresentados nesta tese mostram a utilidade das ferramentas de transposon *EZ::Tn5TM* para os estudos fisiológicos e ecológicos de *G. diazotrophicus*.

Palavras chave: transposome, cana-de-açúcar, *quorum sensing*, motilidade, biofilme, reparo de DNA, genoma funcional.

Rio de Janeiro
Março de 2008

ABSTRACT

TRANSPOSON MUTAGENESIS AS A TOOL FOR PHYSIOLOGICAL AND ECOLOGICAL STUDIES OF *GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS*

Luc Felicianus Marie Rouws

Orientadora: Adriana Silva Hemerly

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

This thesis presents the establishment of methods for the genetic transformation and for the generation of random and site-directed mutants of *G. diazotrophicus* strain PAL5, a plant growth promoting bacterium found inside sugarcane plants. The complete genome sequence of *G. diazotrophicus* has been determined, and for functional genomics studies, molecular biology tools are necessary. Aiming to generate random insertional mutants, *G. diazotrophicus* cells were transformed by electroporation with the commercial transposon EZ::Tn5TM <kan-2>Tnp TransposomeTM. The applied methodology showed highly efficient and molecular analyses demonstrated that mutants were genetically stable *in vitro* and that insertions occurred in a random fashion. An inverse PCR method (IPCR) followed by sequencing was established, enabling the determination of the insertion sites for 31 random mutants. Two mutants, designated B12 and C12 with insertions in genes with a known probable function, were used for a phenotypical validation of this methodology of insertion site determination. Mutant B12, with the insertion in a *uvrC*-like gene, which was predicted to act in DNA repair, showed a hypersensitive phenotype to mutagenic UV-C irradiation. The mutant C12, with an insertion in a homolog of the flagellar gene *flgA*, lost motility, lacked flagella and was deficient in biofilm formation on glasswool. Therefore, the observed phenotypes were compatible with the determined insertion sites, confirming the reliability of the methodology. Inoculation experiments of sugarcane plants with the flagellar mutant C12 showed genetic stability after six weeks growth in greenhouse conditions, suggesting that transposon insertions were genetically stable *in vitro* and *in planta*, allowing the use of these mutants in studies on plant-bacteria interactions and on the ecology of *G. diazotrophicus*.

Bioinformatics analyses allowed the identification of a possible *quorum sensing* (QS) system in the genome of *G. diazotrophicus* strain PAL5. The production of auto-inducer molecules by *G. diazotrophicus* could not be demonstrated but reverse transcription PCR experiments showed the expression of the putative quorum sensing genes *GdluxI*, *GdluxR1* and *GdluxR2* during *G. diazotrophicus* growth. Using the EZ::Tn5TM <kan-2> transposon insertion kitTM, site-directed insertional mutants in the putative autoinducer synthesis protein gene *GdluxI* could be generated and partially characterized. Although preliminary experiments didn't reveal phenotypes for these mutants, the data presented in this thesis show the usefulness of the EZ::Tn5TM transposon tools for physiological and ecological studies of *G. diazotrophicus*.

Key words: transposome, sugarcane, *quorum sensing*, motility, biofilm, DNA repair, functional genomics.

Rio de Janeiro
Março de 2008

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aa	aminoácidos
AIA	ácido indol acético (auxina)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
°C	graus Celcius
cDNA	DNA de fita simples gerado por transcrição reversa a partir de RNA
cm	centímetro
DNA	ácido desoxiribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
D.O.(xxx)	densidade ótica (comprimento de onda em nanômetro)
EDTA	etilenodiaminotetracetato de sódio
FBN	fixação biológica de nitrogênio
g	grama
GA ₁ e GA ₃	Giberelinas
ha	hectare
h(s)	hora(s)
HLA	Homoserina Lactona Acilada
J	joule
Kb	quilobase
kg	quilograma
l	litro
M	molar
m	metro
ME	pontas mosaicas do elemento de transposição EZ::Tn5 TM
min ou ‘	minuto
N	nitrogênio
n(g, l, m,M)	nano(grama, litro, metro,molar)
ORF	<i>Open Reading Frame</i> ou janela de leitura aberta
PCA	proteína carregadora de acil
PCR	reação em cadeia da polimerase
PCRI	PCR inverso
pb	pares de base

QS	<i>Quorum Sensing</i> ou monitoramento populacional
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase.
s ou “	segundo
SDS	dodecil sulfato de sódio
SMART	<i>Simple Modular Architecture Research Tool</i>
TAE	tampão tris-acetato EDTA pH 8,0
Taq	DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i> .
T-DNA	DNA transferido de <i>A. tumefaciens</i> para planta durante a infecção.
U	unidade de enzima
μ(g, l, m,M)	micro(grama, litro, metro, molar)
V	volt
W	watt (J/s)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação gráfica do EZ-Tn5 <kan-2> Transposon	23
Figura 2: Representação gráfica da mutagênese do plasmídeo pB1 e da geração das sondas PRTN e PRLUXI	27
Figura 3: Representação gráfica do PCR inverso (PCRI) para a determinação de sítios de inserção	34
Figura 4: Recuperação da estirpe PAL5 de <i>G. diazotrophicus</i> após a eletroporação com o plasmídeo pKT230	43
Figura 5: PCR de colônias de transformantes de PAL5 e de bactérias contaminantes, com primers específicos para <i>G. diazotrophicus</i>	44
Figura 6: O plasmídeo pKT230 foi isolado de PAL5 transformado	44
Figura 7: Análise de <i>Southern blot</i> de 27 mutantes aleatórios	47
Figura 8: Produtos de PCRI, obtidos dos mutantes A1-A10	50
Figura 9: PCRI dos mutantes B1-B17 com diferentes temperaturas de anelamento	50
Figura 10: Representação gráfica da localização do transposon nos mutantes sequenciados	56-62
Figura 11: Representação gráfica da posição dos sítios de inserção nos 31 mutantes	62
Figura 12: <i>Southern blot</i> mostra estabilidade genética para 7 mutantes.	64

Figura 13: O mutante B12 (<i>uvrC::EZ::Tn5</i>) é hipersensível à irradiação com luz UV-C	64
Figura 14: Sequência de polipeptídeos do homólogo FlgA da estirpe PAL5 de <i>G. diazotrophicus</i>	67
Figura 15: O mutante C12 (<i>flgA::EZ::Tn5</i>) tem um fenótipo não móvel	67
Figura 16: O mutante C12 (<i>flgA::EZ::Tn5</i>) não apresenta flagelo na sua superfície	69
Figura 17: O mutante C12 (<i>flgA::EZ::Tn5</i>) apresentou um defeito na capacidade de formar biofilmes em lã de vidro	71-72
Figura 18: Análise molecular e fenotípica do mutante C12 reisolado de plantas de cana-de-açúcar	74
Figura 19: Representação gráfica de possíveis genes de <i>quorum sensing</i> no genoma da estirpe PAL5 de <i>G. diazotrophicus</i>	76
Figura 20: PCR de transcrição reversa mostra que os genes <i>GdluxI</i> , <i>GdluxR1e</i> e <i>GdluxR2</i> são transcritos	79
Figura 21: Seleção do plasmídeo pB1TN17 com uma inserção do elemento <i>EZ::Tn5</i> dentro do gene <i>GdluxI</i>	81
Figura 22: Representação gráfica da recombinação dupla desejada para a mutagênese de <i>GdluxI</i> usando o plasmídeo mutagênico pB1TN17	83
Figura 23: <i>Southern blot</i> de mutantes putativos de <i>GdluxI</i>	85
Figura 24: Confirmação do sucesso da mutagênese do gene <i>GdluxI</i> por PCR	85
Figura 25: Morfologia de colônias de mutantes <i>GdluxI</i>	87

Tabela 1: Avaliação da eficiência das reações de PCRI	51-52
Tabela 2: Sequências obtidas para 31 produtos de PCRI dos mutantes aleatórios estudados	54
Tabela 3: Identidade dos sítios de inserção do elemento EZ::Tn5 nos 31 mutantes avaliados neste estudo	55

SUMÁRIO

	Página
CAPA	i
FOLHA DE ROSTO	ii
FICHA CATALOGRÁFICA	iii
FOLHA DE APROVAÇÃO	iv
DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xi
SUMÁRIO	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> , uma bactéria promotora de crescimento da cana-de-açúcar	1
1.2. Alguns aspectos genéticos da FBN e do metabolismo de carbono de <i>G. diazotrophicus</i>	3
1.3. A resposta molecular da cana-de-açúcar à presença de bactérias diazotróficas endofíticas	4
1.4. Exemplos de mecanismos de interação planta-bactéria que poderiam ter um papel na interação entre a <i>G. diazotrophicus</i> e a cana-de-açúcar	6
1.4.1. Comunicação por pequenas moléculas	6
1.4.2. Sistemas de transporte bacterianos envolvidas na interação planta-bactéria	9
1.4.3. Estruturas de superfície envolvidas na interação planta-bactéria	11
1.5. A mutagênese na fase pós-genômica	12

2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Condições de cultivo das bactérias	16
3.2. Manipulações de plantas	16
3.2.1. Plantas propagadas <i>in vitro</i>	16
3.2.2. Inoculação de plantas com <i>G. diazotrophicus</i>	17
3.2.3. Contagem de bactérias nas plantas após a inoculação	17
3.2.4. Transplante para a casa de vegetação	18
3.2.5. Reisolamento de bactérias de plantas	18
3.3. Preparação de DNA	19
3.3.1. Preparação de DNA total de <i>G. diazotrophicus</i>	19
3.3.2. Preparação de DNA plasmidial pelo método de lise alcaline	20
3.3.3. Preparação do plasmídeo pKT230	20
3.4. Transformação e mutagênese da estirpe PAL5 de <i>G. diazotrophicus</i>	21
3.4.1. Preparação de células competentes da estirpe PAL5 de <i>G. diazotrophicus</i>	21
3.4.2. Transformação da estirpe PAL5 de <i>G. diazotrophicus</i> com o plasmídeo pKT230	22
3.4.3. Transformação da estirpe PAL5 com <i>Ez::Tn5TM <kan-2>Tnp transposomeTM</i>	22
3.4.4. Construção e análise do plasmídeo pB1TN17 para a mutagênese de <i>GdluxI</i>	24
3.4.5. Transformação da estirpe PAL5 com o plasmídeo pB1TN17	25
3.5. Métodos moleculares para a análise de transformantes	25
3.5.1. Digestões com enzimas de restrição e ligações	25
3.5.2. Análise de mutantes por <i>Southern blot</i>	25
3.5.3. Verificação da identidade de <i>G. diazotrophicus</i> por PCR	28
3.5.4. Ensaio de estabilidade genética <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	29
3.5.5. Definição das enzimas de restrição usadas em reações de PCR inverso	30

3.5.6. Preparação de DNA molde para PCR inverso	30
3.5.7. PCR Inverso	31
3.5.8. Sequenciamento dos produtos de PCR inverso	33
3.5.9. Análises de bioinformática	35
3.6. Estudos de expressão gênica de <i>GdluxI</i>	35
3.6.1. Isolamento de RNA para estudos de expressão de <i>GdluxI</i> , <i>GdluxR1</i> e <i>GdluxR2</i>	35
3.6.2. PCR de transcrição reversa	36
3.7. Bioensaios <i>in vitro</i>	38
3.7.1. Ensaios de motilidade	38
3.7.2. Ensaios de biofilme	39
3.7.3. Ensaios de sensibilidade à irradiação com luz UV-C	40
3.8. Microscopia eletrônica de Transmissão	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Transformação e mutagênese aleatória da estirpe PAL5 de <i>G. diazotrophicus</i>	42
4.1.1. Transformação da estirpe PAL5 de <i>G. diazotrophicus</i> com o plasmídeo pKT230	42
4.1.2. Transformação da estirpe PAL5 de <i>G. diazotrophicus</i> com <i>EZ::Tn5TM <kan-2>Tnp TransposomeTM</i>	45
4.1.3. Análise de <i>Southern blot</i> de mutantes indica um modo aleatório de inserção do elemento <i>EZ::Tn5</i>	45
4.1.4. Determinação de sítios de inserção por meio de PCR inverso seguido de sequenciamento	48
4.1.5. Inserções do elemento <i>EZ::Tn5</i> são geneticamente estáveis <i>in vitro</i>	63
4.1.6. Verificação fenotípica de mutantes para validar o sistema de mutagênese	63
4.1.6.1. Caracterização da estirpe mutante B12 com a inserção do elemento <i>EZ::Tn5</i> em um gene putativo <i>uvrC</i>	63
4.1.6.2. Caracterização do mutante C12 com a inserção do elemento <i>EZ::Tn5</i> em um gene putativo <i>flgA</i>	65
4.1.7. Estabilidade genética do mutante C12 <i>in vivo</i>	73

4.2. Mutagênese de um possível sistema de <i>quorum sensing</i> na estirpe PAL5 de <i>G.diazotrophicus</i>	75
4.2.1. Identificação de genes de <i>quorum sensing</i> no genoma de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5	75
4.2.2. Produção de moléculas autoindutoras não foi detectada em bioensaios	77
4.2.3. Os genes putativos <i>GdluxI</i> , <i>GdluxRI</i> e <i>GdluxR2</i> são expressos durante o crescimento	77
4.2.4. Mutagênese insurrecional sítio-dirigida de <i>GdluxI</i>	80
4.2.5. A análise <i>Southern blot</i> indica que ocorreu recombinação dupla para três mutantes	84
4.2.6. Confirmação do sucesso da mutagênese por meio de PCR	84
4.2.7. A mutação do gene <i>GdluxI</i> não altera a morfologia das colônias de <i>G. diazotrophicus</i>	86
4.2.8. Avaliação da capacidade de mutantes no gene <i>GdluxI</i> de colonizar e de promover o crescimento de plantas de cana-de-açúcar	88
5. DISCUSSÃO	90
5.1. Transformação e mutagênese de <i>G. diazotrophicus</i>	90
5.2. O uso do PCRI para a determinação de sítios de inserção	92
5.3. Estudos sobre o modo de inserção dos mutantes	93
5.4. A estabilidade das inserções do elemento <i>EZ::Tn5 in vitro</i> e <i>in vivo</i> fornece uma ferramenta útil para estudos fisiológicos e ecológicos	94
5.5. Hipersensibilidade do mutante B12 à luz UV-C	95
5.6. Motilidade dependente de flagelo e formação de biofilmes	96
5.7. A mutagênese sítio-dirigida usando o <i>EZ::Tn5TM <kan-2> transposon insertion kit</i>	98
5.8. <i>Quorum sensing</i> do tipo LuxRI em <i>G. diazotrophicus</i> ?	99
6. CONCLUSÕES	101
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
8. ANEXOS	114

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, uma bactéria promotora de crescimento da cana-de-açúcar

Hoje, o reconhecimento geral do aquecimento global, provocado provavelmente pela queima de combustíveis fósseis, colocou o etanol brasileiro no foco da atenção internacional (MARRIS, 2006). Um dos fatores que contribuem para a balança energética favorável da produção de etanol a partir de cana-de-açúcar brasileira é o envolvimento de bactérias promotoras de crescimento associadas com a planta.

Tradicionalmente, a cana-de-açúcar brasileira tem sido cultivada com baixos níveis de adubação nitrogenada. Em média 60 kg.ha⁻¹ de N é adicionado como fertilizante, enquanto que entre 80 e 100 kg.ha⁻¹ de N é retirado no processo de colheita (BODDEY *et al.*, 2003). Portanto, deveria ocorrer uma diminuição de N no solo. O fato desta diminuição não ocorrer levou alguns cientistas brasileiros a propor o envolvimento de bactérias fixadoras de nitrogênio. Estudos de balanços de N, usando o isótopo ¹⁵N como um marcador, demonstraram claramente a ocorrência da incorporação de N atmosférico na biomassa e algumas variedades de cana-de-açúcar obtiveram até 60% do N por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (LIMA *et al.*, 1987; URQUIAGA *et al.*, 1992). Estudos para avaliar o efeito da inoculação com a bactéria de rizosfera *Azospirillum spp.* em cereais, indicaram que provavelmente as bactérias capazes de estimular o crescimento vegetal eram aquelas capazes de colonizar o interior das plantas (BALDANI *et al.*, 1986). Tentativas de isolar bactérias fixadoras de N₂ a partir de suco de cana levaram à identificação de *Acetobacter diazotrophicus*, uma bactéria Gram-negativa, que foi encontrada no interior de colmos, folhas e raízes de cana-de-açúcar (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; GILLIS *et al.*, 1989). Posteriormente, esta bactéria foi renomeada como *Gluconacetobacter diazotrophicus* (YAMADA *et al.*, 1997 & 1998).

A *G. diazotrophicus* parece ser bem adaptada à vida dentro da cana-de-açúcar, uma vez que o seu melhor crescimento ocorre em pH 5,5 e na presença de 10% de sacarose, condições estas encontradas dentro desta planta (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; GILLIS *et al.*, 1989). Em meios de cultura ricos em sacarose esta bactéria produz ácido glucônico que faz com que o pH caia abaixo de 3, apesar disso a FBN continua (STEPHAN *et al.*, 1991). A *G. diazotrophicus* apresenta resistência ao estresse osmótico, uma vez que seu

crescimento ocorre na presença de até 30% de sacarose. A FBN ocorre, nesta bactéria, mesmo na presença de 10 mM de NO_3^- , o que tem sido atribuído à ausência de atividade de nitrato redutase (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; GILLIS *et al.*, 1989). Além disso, a presença de NH_4^+ não inibe completamente a atividade da nitrogenase, especialmente na presença de altas concentrações de açúcar (REIS & DÖBEREINER, 1998).

Até hoje, além da cana-de-açúcar, a *G. diazotrophicus* foi encontrada no interior dos tecidos de algumas outras plantas como batata doce (*Ipomoea batatas*) (PAULA *et al.*, 1989), capim colonião (*Pennisetum purpureum*) (DÖBEREINER, 1988), abacaxi (*Ananas comosus*) (TAPIA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2000) e café (*Coffea arabica*) (JIMENEZ-SALGADO *et al.*, 1997).

Vários trabalhos foram realizados para estudar a colonização da cana-de-açúcar pela *G. diazotrophicus* e o papel da bactéria na promoção do crescimento da planta. Para isto, foi necessário o desenvolvimento de uma metodologia que permitia o uso de plantas livres de microrganismos. REIS *et al.* (1999) desenvolveram uma técnica para inocular plantas de cana-de-açúcar micropropagadas *in vitro*. Esta metodologia tem, desde então, sido usada para estudar o efeito isolado da inoculação de plantas com a *G. diazotrophicus*. Foi demonstrado que a *G. diazotrophicus* tem a capacidade de colonizar a cana-de-açúcar através de aberturas formadas durante a emergência de raízes laterais e pela ponta da raiz e que ocorre uma colonização intensa da base do colmo como também da parte aérea da planta via o xilema (JAMES *et al.*, 1994 & 2001).

A primeira comprovação de que a *G. diazotrophicus* pode contribuir para o crescimento da cana-de-açúcar via o processo de FBN foi apresentada por SEVILLA *et al.* (2001). Estes autores inocularam plantas micropropagadas com a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* e com um mutante não fixador de nitrogênio (mutação no gene *nifD*). Na ausência de N mineral, a inoculação da cana-de-açúcar com PAL5 estimulou o crescimento da cana-de-açúcar em um experimento em casa de vegetação. Experimentos com gás N_2 enriquecido em ^{15}N mostrou também que as plantas inoculadas com a estirpe PAL5 selvagem incorporavam mais N obtido pela FBN do que as plantas não inoculadas ou que as plantas inoculadas com o mutante *nifD*. A inoculação com o mutante *nifD* provocou um menor nível de promoção de crescimento da planta que a estirpe selvagem PAL5. Mesmo assim, em condições de suficiência de N, tanto o mutante *nifD* quanto a PAL5 melhoraram o crescimento das plantas de cana-de-açúcar quando comparado com plantas não inoculadas. Estes dados indicam que há dois mecanismos provocando o efeito benéfico da bactéria sobre a planta: a FBN, e outro(s) fator(es) que estimulam o crescimento.

A produção de giberilinas (GA₁ e GA₃) e de auxina (ácido indol-acético, ou AIA) tem sido demonstrada *in vitro* (FUENTES-RAMÍREZ *et al.*, 1993; BASTIÁN *et al.*, 1998). A produção destas substâncias moduladoras de crescimento poderiam explicar porque mutantes incapazes de fixar nitrogênio estimulam o crescimento da planta. LEE *et al.* (2004) identificaram um mutante de *G. diazotrophicus* que produziu apenas 6% de AIA em relação a bactéria selvagem. Complementação deste mutante com uma biblioteca de cosmídios indicou que a mutação ocorreu em um gene de citocromo C (LEE *et al.*, 2004). Não se sabe, porém, qual seria a função do citocromo C na síntese e na(s) via(s) de síntese do AIA.

1.2. Alguns aspectos genéticos da FBN e do metabolismo de carbono de *G. diazotrophicus*

A enzima chave da FBN é a nitrogenase que é conservada em uma ampla variedade de organismos procarióticos (DEAN & JACOBSEN, 1992). As nitrogenases são compostas por 2 componentes: a proteína Fe-Mo, ou dinitrogenase, codificada pelos genes *nifD* e *nifK* e a proteína Fe, ou dinitrogenase reductase, codificada pelo gene *nifH*.

Em *G. diazotrophicus*, um cluster de 30,5 kilobases (Kb) contendo os genes *nif*, necessários para o funcionamento do complexo de nitrogenase, foi identificado e parcialmente analisado (LEE *et al.*, 2000). Este cluster contém, entre outros, os genes *nifHDK* que codificam as proteínas estruturais da nitrogenase, e o gene que codifica o regulador “mestre” dos genes *nif*, a proteína NifA. A regulação da expressão do gene *nifA* em *G. diazotrophicus*, em relação à concentração do nitrogênio na célula, é regulada em resposta a concentração de N como em outras bactérias (DIXON & KAHN, 2004), mas de forma independente do regulador NtrC (TEIXEIRA *et al.*, 1999).

A expressão do gene *nifA* não é regulada por O₂, mas a proteína NifA de *G. diazotrophicus* percebe o estado de oxigênio por meio de um motivo Cys-X₄-Cys. Provavelmente, este motivo funciona como sítio de ligação para um cofator metálico (TEIXEIRA *et al.*, 1999; DIXON & KAHN, 2004).

Em *G. diazotrophicus* 3 proteínas do tipo PII foram identificadas, e designadas GlnB, GlnK1 e GlnK2 (PERLOVA *et al.*, 2003). Experimentos com um mutante triplo (*glnB glnK1 glnK2*) mostraram que nenhuma destas homólogas é necessária para a expressão dos genes *nif*. A proteína GlnK2 age, mesmo em condições de baixo N, como um inibidor da

expressão dos genes *nif*, enquanto as homólogas GlnB e GlnK1 parecem ter a capacidade de aliviar a repressão exercida por GlnK2 (PERLOVA *et al.*, 2003).

Acredita-se que *G. diazotrophicus* não possui um sistema de transporte de sacarose (ALVAREZ & MARTINEZ-DRETZ, 1995) e, por isso, depende da secreção da levansucrase LsdA para utilizar esta fonte de carbono (HERNANDEZ *et al.*, 1995 & 2000). Esta levansucrase, designada de LsdA, é transportada através da membrana exterior por meio de um sistema de transporte do tipo II, e mutações nos genes codificando este sistema aboliram a capacidade da *G. diazotrophicus* de utilizar a sacarose como fonte de nitrogênio (ARRIETA *et al.*, 2004). Portanto, a glicose liberada pela ação da LsdA sobre a sacarose pode ser a principal fonte de carbono e de energia dentro da cana-de-açúcar, que é rica em sacarose.

Embora o complexo da nitrogenase seja sensível à desativação por O₂ livre, foi observado que ambos o crescimento e a atividade diazotrófica da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* são influenciados de forma positiva com maior concentração de O₂ em culturas com alta concentração de sacarose (FLORES-ENCARNACIÓN *et al.*, 1999). Provavelmente, a *G. diazotrophicus* consiga manter a atividade da nitrogenase por meio do aumento da taxa de respiração, desta forma aumentando o consumo de O₂ e protegendo o complexo nitrogenase (FLORES-ENCARNACIÓN *et al.*, 1999; GONZÁLEZ *et al.*, 2006).

1.3. Resposta molecular da cana-de-açúcar à presença de bactérias diazotróficas endofíticas

Diferentes genótipos de cana-de-açúcar apresentam diferentes taxas de FBN, indicando que fatores genéticos da planta poderiam controlar a eficiência da interação planta-bactéria (URQUIAGA *et al.*, 1992). NOGUEIRA *et al.* (2005) demonstraram que vários genes codificando glutamina sintetases, enzimas chaves no metabolismo de nitrogênio em plantas, são diferencialmente expressas em genótipos de cana-de-açúcar com alta (SP70-1143) e com baixa (chunee) taxa de FBN, fornecendo uma possível explicação para as diferenças observadas para a eficiência da FBN em diferentes variedades e espécies de plantas.

Nos últimos anos, vários trabalhos também têm mostrado que a cana-de-açúcar responde, a nível molecular, à inoculação de bactérias diazotróficas. VINAGRE *et al.* (2006) descreveram um novo membro da classe de quinase receptora da cana-de-açúcar, SHR5, que pode estar envolvido na sinalização entre a cana-de-açúcar e bactérias endofíticas

diazotróficas. Experimentos de PCR de transcrição reversa (RT-PCR) mostraram que estresses abióticos e a presença de auxinas e de bactérias fitopatogênicas não tiveram efeito sobre os níveis de mRNA deste receptor. Em contraste, quando as plantas foram cultivadas na presença de bactérias promotoras de crescimento como *G. diazotrophicus*, foi observado uma repressão dos níveis de mRNA de SHR5, sugerindo que este receptor possa estar envolvido na associação de bactérias promotoras de crescimento com a planta de cana-de-açúcar. (VINAGRE *et al.*, 2006).

Embora o hormônio vegetal etileno seja principalmente conhecido pelo seu papel em processos de desenvolvimento vegetal, este hormônio também está envolvido na sinalização entre plantas e bactérias, como por exemplo na formação do nódulo na interação rizóbio/leguminosa (PENMETSA & COOK, 1997). Em um estudo com cana-de-açúcar foram selecionados membros da via de sinalização de etileno, um putativo receptor de etileno, e putativos fatores de transcrição da família ERF, que estavam presentes nos conjuntos de dados de ESTs (Etiquetas de Sequências Expressas), diferencialmente expressos durante a associação com bactérias promotoras de crescimento (CAVALCANTE *et al.*, 2007).

Em experimentos de RT-PCR a expressão do gene *SCER1*, um putativo receptor de etileno, foi fortemente induzida a partir de 24 hs após a inoculação com as bactérias promotoras de crescimento *G. diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae*. Em contraste, a inoculação com bactérias e vírus fitopatogênicos provocou uma repressão forte dos níveis de mRNA deste gene (CAVALCANTE *et al.*, 2007).

A expressão do gene *SCERF2*, codificando um putativo fator de transcrição, também foi induzido 7 dias após a inoculação com *G. diazotrophicus* e *H. seropedicae*, enquanto os níveis de mRNA do gene *SCERF2* que codifica um outro putativo fator de transcrição da via de sinalização de etileno, diminuíram ligeiramente após a inoculação. Juntos, os dados de expressão dos genes *SCRE1*, *SCERF1* e *SCERF2* sugerem que estes genes não somente respondem à presença de bactérias promotoras de crescimento, mas possivelmente possam também discriminar entre agentes patogênicos e bactérias benéficas (CAVALCANTE *et al.*, 2007).

Tem sido sugerido que, durante a fase inicial do contato entre a planta e a bactéria benéfica, a última é percebida como um possível patógeno, e que respostas de defesa são ativadas. Uma vez que a interação benéfica esteja estabelecida, estes mecanismos estariam supressos (SIKORSKI *et al.*, 1999).

Deste ponto de vista é interessante mencionar experimentos realizados por ROCHA *et al.* (2007). Neste estudo, micro-arranjos contendo cDNAs representando 1545 genes,

principalmente envolvidos na transdução de sinais, foram hibridizados com cDNA marcado proveniente de plantas não inoculadas ou inoculadas com bactérias promotoras de crescimento (ROCHA *et al.*, 2007). Foram encontrados vários genes com expressão diferencial na presença de bactérias promotoras de crescimento. Interessante foi a observação de que alguns genes envolvidos com mecanismos de defesa a patógenos foram induzidos. A expressão de dois genes de resistência de plantas (genes R) aumentou na presença tanto de *G. diazotrophicus* como de *H. seropedicae*. Adicionalmente, a inoculação da planta com *G. diazotrophicus* induziu a expressão de um gene de biossíntese de ácido salicílico, uma substância produzida por plantas como resposta ao ataque de patógenos. Outros genes com expressão modulada na presença de bactérias promotoras de crescimento codificavam fosfatases e fatores de transcrição do tipo *zinc-finger* (ROCHA *et al.*, 2007).

1.4. Exemplos de mecanismos de interação planta-bactéria que poderiam ter um papel na interação entre a *G. diazotrophicus* e a cana-de-açúcar

O sistema de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas às plantas mais estudado é o da simbiose entre plantas leguminosas e rizóbios, onde as bactérias vivem e fixam nitrogênio em nódulos formados pela planta. Neste sistema, as bactérias fornecem nitrogênio fixado à planta, que fornece em troca fontes de carbono. Plantas da família das gramíneas (atualmente Poaceae), como a cana-de-açúcar, não formam estruturas facilmente observáveis como nódulos, o que dificulta o estudo deste tipo de interação.

Como visto anteriormente, há vários exemplos de respostas da planta à presença de *G. diazotrophicus* que podem ser importante na interação benéfica. Ao contrário, fatores genéticos da *G. diazotrophicus* importantes para uma interação benéfica com a planta hospedeira até hoje são desconhecidos. Durante a interação de bactérias patogênicas e simbióticas com os organismos hospedeiros, a sinalização química, sistemas de transporte e as estruturas presentes na superfície das bactérias geralmente têm um papel importante. Alguns aspectos serão descritos em mais detalhe.

1.4.1. Comunicação por pequenas moléculas

Os rizóbios (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, entre outros) que vivem em simbiose com plantas leguminosas são o grupo de bactérias

diazotróficas endofíticas mais bem estudados. Estas bactérias, diferentemente de *G. diazotrophicus*, são endosimbiontes, ou seja, durante a simbiose vivem dentro de células dos nódulos da planta hospedeira. A formação do nódulo e de uma interação benéfica é um processo complexo que requer uma sinalização planta-bactéria contínua e adequada (SOTO *et al.*, 2006). As bactérias são atraídas por flavonóides presentes nos exudatos da planta e se ligam às raízes. Os flavonóides do exudato da raiz induzem a expressão de genes *nod*, nas bactérias, que são responsáveis pela produção de lipochitooligo-sacarídeos, os denominados fatores Nod (SPAINK, 1996). Os fatores Nod e outras moléculas sinalizadoras, como proteínas e exopolissacarídeos, possibilitam que bactérias ligadas aos pêlos radiculares penetrem na raiz por meio de estruturas tubulares para alcançar o córtex radicular, onde o nódulo está se desenvolvendo.

TRUJILLO-LÓPEZ *et al.* (2006) observaram um aumento na colonização de raízes de plântulas de feijão por *G. diazotrophicus*, quando estas foram tratadas com luz ultravioleta anteriormente à inoculação. Os autores sugerem que a indução da síntese de substâncias provenientes do metabolismo secundário vegetal, pela radiação, possa ser responsável pelo aumento no nível de colonização, de forma semelhante ao observado na interação de rizóbios com as plantas leguminosas.

Um outro tipo de comunicação mediada por pequenas moléculas é o chamado de monitoramento populacional, ou *quorum sensing* (QS) em inglês, um termo que descreve a capacidade das bactérias de alterar o seu comportamento em resposta as mudanças na densidade da população da própria espécie, ou até de outras espécies. Em bactérias Gram-negativas, o sistema mais bem estudado é o QS do tipo LuxIR, que se baseia em um circuito de sinalização de dois componentes. Tipicamente, as bactérias Gram-negativas, com capacidade de QS, possuem proteínas homólogas de LuxI e LuxR, que foram originalmente descobertas em *Vibrio fischeri* (ENGELBRECHT *et al.*, 1983). As proteínas LuxI catalizam a síntese de uma homoserina lactona acilada (HLA) específica, as vezes também designada como autoindutor ou *quormone* em inglês. Este autoindutor difunde livremente para dentro e para fora da célula e sua concentração aumenta em proporção com a densidade populacional. As proteínas LuxR reconhecem autoindutores específicos, quando a concentração do autoindutor atinge um nível crítico. Os complexos LuxR-HLA reconhecem promotores de genes alvos e regulam a transcrição destes (ENGELBRECHT *et al.*, 1983; ENGELBRECHT & SILVERMAN, 1984 & 1987). Um dos genes positivamente regulados é o próprio *luxI*, desta forma, criando um *feedback* positivo. Esta forma de regulação transcricional permite que o organismo modifique sua estratégia de vida em resposta à densidade populacional.

A avaliação da produção de HLAs por bactérias é geralmente realizada usando estirpes bacterianas repórteres. Estas bactérias têm em comum a expressão de algum fenótipo que pode ser facilmente observado quando HLAs estão presentes. Um exemplo é a estirpe mutante NT1 de *Agrobacterium tumefaciens* (PIPER *et al.*, 1993), que é uma estirpe curada do plasmídeo Ti, e portanto incapaz de produzir HLAs. Esta estirpe contém o plasmídeo pZLR4, que carrega o gene *lacZ* (β -galactosidase) fusionado com o gene *traG* de *A. tumefaciens*, cuja expressão é induzida na presença de uma variedade de HLAs. Desta forma, na presença do substrato de LacZ, X-gal, a coloração azul da estirpe NT1 indica a presença de HLAs.

Alguns exemplos de funções reguladas por QS do tipo LuxRI são a conjugação de plasmídeos em *A. tumefaciens* (PIPER *et al.*, 1993), a produção de antibiótico pela bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora* (BAINTON *et al.*, 1992), a produção de biofilmes e a expressão de genes envolvidos em virulência em *Pseudomonas aeruginosa* (DAVEIS *et al.*, 1998; PASSADOR *et al.*, 1993).

O QS do tipo LuxRI também atua em bactérias simbióticas de plantas como os rizóbios. Em *R. leguminosarum*, vários sistemas de QS, chamados de *raiRI*, *rhiRI*, *cinRI*, e *traRI*, foram identificados e interagem em uma rede sinalizadora complexa (WISNIEWSKI-DYE & DOWNIE, 2002). Mesmo assim, estudos de mutagênese não permitiram esclarecer de forma muito clara o papel destes sistemas na interação com a planta hospedeira, embora o sistema *rhi* pareça influenciar a eficiência da nodulação da planta hospedeira (GONZÁLEZ & MARKETON, 2003).

A bactéria *R. etli* possui dois sistemas de QS chamados de *raiRI* (ROSEMEYER *et al.*, 1998), que está envolvido no controle da quantidade de nódulos formados na planta hospedeira de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e o sistema *cinRI*, que é importante na FBN, sendo que os nódulos contendo bacterióides mutantes no gene *cinI* apresentam uma diminuição de 70% na quantidade de FBN (DANIELS *et al.*, 2002). Os genes *cinI* e *raiI*, neste organismo, produzem um total de 7 HLAs diferentes, portanto cada proteína do tipo LuxI tem a capacidade de produzir diferentes HLAs (ROSEMEYER *et al.*, 1998).

Na bactéria *Sinorhizobium meliloti*, endosimbionte da planta leguminosa *Medicago sativa*, foram identificados o par de genes de QS, *sinR* e *sinI* (MARKETON *et al.*, 2002). Mutação do gene *luxI* aboliu a produção de vários HLAs neste organismo e, mutações tanto no gene *sinI* quanto em *sinR* causaram uma diminuição na quantidade - e um atraso na aparência - de nódulos rosas (ativos), na planta hospedeira.

Embora muitas bactérias sejam capazes de produzirem HLAs, a sinalização mediada pelos sistemas LuxRI é altamente específica para cada espécie. Esta especificidade pode ser explicada por diferenças sutis entre HLAs e os seus receptores. Proteínas do tipo LuxI formam HLAs juntando grupos acílicos laterais de proteínas carregadoras de acil (PCAs) com a parte homocisteína de S-adenosilmetionina. Estas reações são muito precisas porque as proteínas LuxI reconhecem PCAs contendo cadeias acílicas específicas, que podem apresentar diferenças em comprimento, em saturação, e em conteúdo e natureza de grupos laterais (TAGA & BASSLER, 2003).

Também existe QS que permite a comunicação entre espécies de diferentes de bactérias. O QS mais bem conhecido deste tipo ocorre tanto em bactérias Gram-negativas quanto em bactérias Gram-positivas e depende do autoindutor AI-2 (um furanosil borate di-ester), sintetizado pela ação da proteína LuxS (XAVIER & BASSLER, 2003).

Há exemplos da interferência de eucariotos no QS das bactérias. A macroalga *Delisea pulchra* produz uma mistura de furanonas halogenadas que inibem o crescimento de microrganismos patogênicos na sua superfície. Estas furanonas têm semelhanças estruturais com HLAs, e evitam a ligação de HLA de *Serratia liquefaciens* com o receptor LuxR correspondente. Neste sistema, a inibição da sinalização de HLA evita a motilidade dependente de QS, e conseqüentemente a colonização por *S. liquefaciens* (RASMUSSEN *et al.*, 2000).

Finalmente, existem bactérias com a capacidade de evitar uma sinalização bem sucedida em outras bactérias. Bactérias *Bacillus* sp. produzem uma enzima HLA lactonase, que hidrolisa a ligação lactona de HLAs, desta forma desativando-as. Foi demonstrado que plantas transgênicas expressando esta hidrolase, apresentaram um fenótipo resistente à infecção com a bactéria *E. carotovora* (DONG *et al.*, 2001). A desativação de HLAs desta forma é chamada em inglês de *quorum quenching*.

1.4.2. Sistemas de transporte bacterianos envolvidos na interação planta-bactéria

Nas interações simbióticas e/ou patogênicas os sistemas que as bactérias usam para a secreção de macromoléculas, como proteínas, têm funções importantes. Sistemas de transporte do tipo II são responsáveis pela secreção extracelular de toxinas e de enzimas hidrolíticas que muitas vezes estão envolvidas em patogênese de animais e de plantas (SANDKVIST, 2001). A secreção de tipo II ocorre em duas etapas. Inicialmente, proteínas a serem secretadas são produzidas com um peptídeo-sinal, permitindo a translocação através da

membrana citoplasmática para o espaço periplasmático pelo sistema denominado *Sec*. Em seguida, o peptídeo sinal é removido, a proteína pode sofrer modificações, e é secretada para o meio extracelular pela maquinaria de transporte tipo II (SANDKVIST, 2001). Em *G. diazotrophicus* um sistema de transporte tipo II essencial para a secreção da enzima levansucrase foi descrita, como foi mencionado acima (ARRIETA *et al.*, 2004).

Bactérias patogênicas frequentemente utilizam sistemas de transporte do tipo III para exportar proteínas, em uma única etapa, através das membranas bacterianas para o meio extracelular ou injetar diretamente proteínas em células eucariotas. Estas proteínas podem influenciar o metabolismo do hospedeiro para beneficiar o patógeno (HE *et al.*, 2004). De maneira surpreendente, foram identificados sistemas de transporte tipo III nos genomas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Mesorhizobium loti* (MARIE *et al.*, 2001). As proteínas transportadas por sistemas de transportes do tipo III, em rizóbios, são chamadas de Nops (do inglês, *nodulation outer proteins*). O papel dos Nops não é bem compreendido, mas têm indicações de que algumas proteínas deste tipo podem influenciar a resposta de defesa do hospedeiro para possibilitar a interação simbiótica (SOTO *et al.*, 2006). Uma análise do genoma da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* revelou que esta bactéria não apresenta sistemas de transporte tipo III (dados não publicados).

Um outro tipo de transporte envolvido em patogênese e mais recentemente descrito, também em relações simbióticas, é o transporte do tipo IV. O modelo de transporte do tipo IV é o sistema VirB/D4 que intermedia a injeção do T-DNA em células vegetais por *Agrobacterium tumefaciens* através de uma estrutura protéica chamada de T-pilus (LAI & KADO, 2000). Genomas de vários rizóbios mostraram a presença de genes similares aos genes envolvidos neste tipo de transporte; porém, pouco se sabe ainda sobre a função destes sistemas. Possivelmente, eles têm um papel análogo ao transporte do tipo III (SOTO *et al.*, 2006). Sistemas de transporte do tipo IV também foram encontrados no genoma da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* (dados não publicados).

Vale mencionar que hoje, além dos sistemas mais bem estudados e mencionados acima, outros sistemas de transporte adicionais estão desconhecidos. Uma revisão interessante neste contexto foi publicada (PAPANIKOU *et al.*, 2007).

1.4.3. Estruturas de superfície envolvidas na interação planta-bactéria

O gênero *Azoarcus* é um modelo para os estudos envolvendo a interação entre gramíneas e bactérias diazotróficas endofíticas (HUREK & REINHOLD-HUREK, 2003). Foi demonstrado que estruturas de superfície desta bactéria, chamadas de *pili* do tipo IV, têm um papel importante no estabelecimento desta bactéria na superfície da raiz e na colonização de plântulas de arroz (DÖR *et al.*, 1998; BOHM *et al.*, 2007). Os *pili* do tipo IV têm um papel similar em bactérias patogênicas de animais e de humanos onde estão envolvidos na ligação às células de epitélio do hospedeiro (DÖR *et al.*, 1998). Os *pili* do tipo IV também têm um papel na formação de biofilmes (O'TOOLE & KOLTER, 1998). Na bactéria fitopatogênica *Xylella* foi mostrado um papel de *pili* tipo IV na locomoção da bactéria dentro da planta contra o fluxo do xilema por meio de motilidade do tipo *twitching motility* (MENG *et al.*, 2005). Várias proteínas constituintes da maquinaria dos *pili* tipo IV são homólogas das proteínas dos sistemas de transporte tipo II, e acredita-se que os dois sistemas têm a mesma origem evolucionária (BURROWS, 2005; SANDKVIST, 2001).

A *Azospirillum brasilense* é uma bactéria rizosférica promotora de crescimento e fixadora de N, isolada originalmente na Holanda (BEIJERINCK, 1925) e posteriormente da rizosfera de milho no Brasil (VON BULOW & DÖBEREINER, 1975). Atualmente, a *A. brasilense* já foi isolado de uma variedade de plantas, e, como é o caso de *G. diazotrophicus*, a *A. brasilense* beneficia o crescimento vegetal por meio de síntese de auxinas e possivelmente pela FBN (VANDE BROEK & VANDERLEYDEN, 1995). *A. brasilense*, por estar associada a plantas gramíneas como é o caso para *G. diazotrophicus* e *Azoarcus*, pode servir como modelo na procura dos mecanismos de interação entre a *G. diazotrophicus* e a cana-de-açúcar. A *A. brasilense* coloniza a superfície da raiz da planta hospedeira trigo, em duas etapas. A primeira etapa é uma interação fraca e reversível, uma etapa que envolve o flagelo polar deste organismo (CROES *et al.*, 1993). No caso, o flagelo tem diferentes funções: primeiramente, o flagelo media a primeira etapa da absorção pela raiz da planta hospedeira, (CROES *et al.*, 1993). Porém, também foi demonstrado que a motilidade e a quimiotaxia, mediadas por flagelo, têm um papel nesta interação (VANDE BROEK, 1998). Na segunda etapa da colonização da superfície da planta por *A. brasilense* é formada uma interação forte, envolvendo exopolissacarídeos (MICHIELS *et al.*, 1991; VANDE BROEK *et al.*, 1998). Com respeito ao flagelo, é interessante mencionar que muitas proteínas envolvidas na formação do flagelo são homólogas de proteínas de sistemas de transporte do tipo III (BLOCKER *et al.*, 2003).

Como no caso de *A. brasilense*, exopolissacarídeos e flagelos poderiam estar envolvidos na interação entre a *G. diazotrophicus* e a cana-de-açúcar.

1.5. A mutagênese na fase pós-genômica

Recentemente a rede Riogene (www.riogene.lncc.br), completou o sequenciamento do genoma da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*. As informações geradas neste projeto darão um impulso na pesquisa da genética desta bactéria. Na fase atual, ou seja, a fase pós-genômica, os dados de sequenciamento gerados serão usados como subsídio para estudos de laboratório com o objetivo final de otimizar os efeitos positivos na interação entre a *G. diazotrophicus* e a cana-de-açúcar. Para este objetivo é importante a disponibilidade de ferramentas para intervir, a nível molecular, na genética da bactéria.

Uma ferramenta que tem sido muito usada em estudos genéticos no passado, mas que continua de grande importância nos estudos de hoje, é a mutagênese por transposon. Transposons são elementos genéticos móveis, que “saltam” para novas posições no DNA, e que foram inicialmente descobertos em plantas (McCLINTOCK, 1948). Na sua forma mais simples, o transposon é um elemento de DNA definido por curtas sequências invertidas e específicas nas duas pontas. O transposon codifica uma proteína chamada de transposase, que cataliza a transposição. Além de um gene codificando a transposase, transposons costumam conter genes de resistência à, por exemplo, antibióticos (HAYES, 2003). Inserções de transposons podem alterar a regulação e a expressão de genes; portanto, mutagênese por transposon pode ser utilizada na identificação de genes (HAMER *et al.*, 2001). A presença de genes resistência à antibióticos nos transposons facilita a seleção de mutantes gerados desta forma. Nos estudos de mutagênese com transposon, normalmente, coleções de mutantes são submetidas a diferentes condições, e mutantes afetados em alguma condição específica podem revelar genes com funções de interesse. Este tipo de avaliação de coleções de mutantes é geralmente denominado, em inglês, de *screening*.

Resumindo, as partes essenciais que definem o transposon são um elemento de DNA delimitado por sequências invertidas, e uma transposase (REZNIKOFF *et al.*, 1999). Além da transposase, muitas vezes outros genes estão presentes no elemento de transposição, como genes de resistência a antibiótico.

Um transposon muito usado em estudos em procariotos é o transposon Tn5. A transposição de Tn5 ocorre por meio de um mecanismo de “cortar e colar”, onde o transposon

é “recortado” do sítio original e “colado” em outro sítio (REZNIKOFF *et al.*, 1999). Na primeira etapa da transposição, as pontas invertidas se juntam, formando um complexo sináptico com duas unidades da transposase. O DNA nas pontas do transposon é clivado, liberando o transposon. Em seguida, o transposon liberado é complexado com duas unidades de transposase e se insere em um outro sítio. Para que isso ocorra, o DNA alvo é clivado por meio de um mecanismo que provoca uma duplicação de 9 pares de base no sítio de inserção, uma cópia antes, e outra cópia depois da inserção (REZNIKOFF *et al.*, 1999).

Um possível problema que pode surgir ao usar transposons, pela ação do gene de transposase, é a instabilidade genética após a inserção do transposon no sítio alvo. Este problema tem sido solucionado pela construção de mini-transposons, que são transposons, carregados em plasmídeo vetores, que foram modificados de forma que o gene de transposase seja deslocado de dentro, para uma posição fora do elemento de transposição. Desta forma, o elemento de transposição perde a capacidade de transposição após ter-se inserido em um novo sítio. Exemplos de mini-transposons são as construções feitas por SIMON *et al.* (1989).

Usando os mini-transposons como base, uma variedade de diferentes tipos de ferramentas de transposon foi desenvolvida. Por exemplo, genes repórteres (como por exemplo *lacZ* e *phoA*) sem promotor têm sido integrados em mini-transposons com o objetivo de gerar fusões transcricionais ou traducionais, possibilitando selecionar mutantes pelo nível de expressão do gene interrompido ou determinar o destino de proteínas dentro da célula (para uma revisão, veja HAYES, 2003).

GORYSHIN *et al.* (2000) descreveram o sistema de *transposome*TM. O transposome é tipicamente formado de um gene de resistência à antibiótico, flanqueado pelas sequências invertidas de Tn5. Este elemento de transposição é complexado *in vitro* com uma forma hiperativa da proteína transposase, formando o complexo sináptico, neste caso chamado de transposome. O transposome pode ser transferido para células alvo por meio da técnica de eletroporação. Um cofator para o funcionamento da transposase é o Mg²⁺ e, acredita-se que, o transposome é ativado pela Mg²⁺ presente no citoplasma do organismo transformado. Após a reação da transposição, a proteína transposase é degradada. O sistema de transposome já foi usado em uma variedade de bactérias, entre elas várias bactérias fitopatogênicas como por exemplo *Xylella* (GUILHABERT *et al.*, 2001; KOIDE *et al.*, 2004, LI *et al.*, 2007), *Xanthomonas* (SUN *et al.*, 2003) e *Pseudomonas* (BRETZ *et al.*, 2002).

Sistemas de mutagênese baseados no transposome estão sendo comercializados pela empresa Epicentre, que produz vários kits com diferentes características. O sistema de transposome está disponível na forma de um kit chamado de *transposon insertion kit*TM que

pode ser usado para a mutagênese de DNA *in vitro*. Neste caso, a transposase e o elemento de transposição vem separados e devem ser misturados com DNA alvo pelo usuário. Um outro exemplo é o kit *EZ::Tn5TM <kan-2>Tnp TransposomeTM* que foi desenvolvido para a mutagênese *in vivo*. No caso, o elemento de transposição já vem complexado com a transposase, e este complexo pode ser utilizado para transformação através da técnica de eletroporação.

Em contraste com o nível de conhecimento da FBN e do metabolismo de carbono de *G. diazotrophicus*, pouco ou nenhum conhecimento existe sobre os fatores de *G. diazotrophicus* envolvidos na interação com a cana-de-açúcar. Portanto, a presente tese visa estabelecer e validar métodos de transformação e de mutagênese para o uso em estudos envolvendo a *G. diazotrophicus* com o objetivo de ajudar no esclarecimento de fatores genéticos envolvidos na fisiologia e na interação benéfica com a cana-de-açúcar.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi estabelecer e avaliar métodos de transformação gênica e de mutagênese aleatória e sítio-dirigida, como ferramentas em estudos fisiológicos e ecológicos de *G. diazotrophicus* na fase pós-genômica.

2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer uma metodologia de transformação e um sistema eficiente de mutagênese de transposon da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* por meio da técnica de eletroporação.
- Desenvolver um sistema eficiente para a determinação de sítios de inserção de transposon no genoma da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*.
- Avaliar a robustez do sistema de mutagênese, demonstrando aleatoriedade e estabilidade genética de mutantes.
- Demonstrar a utilidade e a confiabilidade do sistema de mutagênese aleatória, verificando os fenótipos esperados para alguns mutantes com inserções de transposon em sítios conhecidos.
- Identificar um sistema de *quorum sensing* no genoma da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* e avaliar a sua importância através de estudos de mutagênese.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Condições de cultivo das bactérias

A estirpe DH10B de *Escherichia coli*, utilizada como hospedeiro para a clonagem e a multiplicação de plasmídeos, foi cultivada a 37°C em meio Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK *et al.*, 1989). Para o cultivo de *G. diazotrophicus* estirpe PAL5, foram usados os meios de cultura Dygs (RODRIGUES NETO *et al.*, 1986; ANEXO) e C2 (TEIXEIRA *et al.*, 1999; ANEXO). Para os meios sólidos foi adicionado 15 g/l de agar (Oxoid). Para o cultivo de PAL5, o antibiótico seletivo canamicina foi adicionado na concentração 200 µg/ml, conforme descrito (TEIXEIRA *et al.*, 1999). O antibiótico ampicilina foi usado na concentração de 400 µg/ml, que mostrou a inibição do crescimento da estirpe PAL5 em placas Dygs após 3 dias de incubação, e permitiu o crescimento de estirpes derivadas contendo o marcador amp^R. Para os ensaios de motilidade e de formação de biofilme, entre outros, foram usadas modificações dos meios de cultura LGI (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; ANEXO) e LGI-P (REIS *et al.*, 1994; ANEXO) com adição de 50 mg/l de extrato de levedura para crescimento em meio de cultura sólido. O meio semi-sólido utilizado foi LGI-P contendo 0,15 g/l de agar e sem fonte de nitrogênio. Testes de motilidade em placa foram realizados em agar de motilidade, sendo que o meio LGI-P, continha 5% de glicose (fonte de carbono), 10 mM de (NH₄)₂SO₄ (fonte de nitrogênio), e 0,25% de agar. Testes de biofilme foram feitos em meio LGI-gluc, que correspondeu ao meio LGI com 1 mM de ácido glutâmico como fonte de nitrogênio. O cultivo de *G. diazotrophicus* foi sempre a 30°C.

3.2. Manipulações de plantas

3.2.1. Plantas propagadas *in vitro*

Plantas de cana-de-açúcar, genótipo SP70-1143, propagadas e enraizadas *in vitro* em meio de cultura MS 1x (MURASHIGE & SKOOG, 1962) foram obtidas no laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico (Rio de Janeiro) aproximadamente 40 dias após o último transplante. Os perfilhos das plantas foram separados

e transferidos para recipientes contendo 50 ml de meio de cultura líquido MS 10 x diluído (MS 0,1x) conforme descrito por REIS *et al.* (1999), de forma que cada recipiente conteve aproximadamente três perfílos. As plantas foram incubadas durante 3 dias em câmara de crescimento com 12 hs de luz ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), proveniente de lâmpadas fluorescentes, por dia, à temperatura de aproximadamente 28°C. Após este período, recipientes com plantas com qualquer sintoma de contaminação foram descartados.

3.2.2. Inoculação de plantas com *G. diazotrophicus*

G. diazotrophicus foi cultivada durante 24 hs até uma $\text{D.O.}_{(600)} = 0,6$ em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio de cultura Dygs líquido. Foram utilizados a estirpe PAL5 selvagem, os mutante mut17-4 e mut17-5 (*Gd luxI::EZ::Tn5*), o mutante mut17-6 (com uma cópia intacta de *Gd luxI*) e o mutante C12 (*flgA::EZ::Tn5*). Células em fase logarítmica de crescimento foram precipitadas por centrifugação, lavadas com 4 ml de meio de cultura MS 1x e suspensas em uma quantidade de MS 1x para uma $\text{D.O.}_{(600)} = 0,25$. Foram feitas diluições em série (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) e 100 μl destas diluições foram plaqueados em placas Dygs para posteriormente possibilitar a contagem das células. As mesmas suspensões bacterianas foram usadas para inocular as plantas três dias após o transplante. De cada bactéria, 100 μl de suspensão foram adicionados a 10 recipientes contendo plantas. Como controle não inculado, 10 recipientes com plantas receberam 100 μl de meio MS 0,1x. As plantas foram novamente colocadas na câmara de vegetação sob as mesmas condições descritas acima.

3.2.3. Contagem de bactérias nas plantas após a inoculação

A contagem e o reisolamento de *G. diazotrophicus* presente no interior das plantas (4 repetições por tratamento) foi realizada 5 dias após a inoculação. Foi obtida 1 g de matéria fresca constituída por aproximadamente 50% de raiz e 50% de colmo de cada repetição. Este material foi esterilizado basicamente conforme OLIVEIRA *et al.* (2002), sendo que o tempo de esterilização em solução de cloramina T (1%) foi reduzido para 1 min com o intuito de evitar a morte de bactérias no interior dos tecidos frágeis das plantas cultivadas *in vitro*. Em seguida foram realizadas duas lavagens com água destilada estéril. O material foi homogeneizado usando-se pistilo e graal, suspenso em solução salina e diluído

seriadamente até 10^{-7} . Alíquotas de 100 μ l das diluições 10^{-3} a 10^{-7} foram inoculadas em recipientes com 5 ml de meio de cultura LGI-P semi-sólido, com três repetições para cada diluição. Após 5 dias de incubação a 30°C, foi avaliado o aparecimento de películas bacterianas, típicas da presença de *G. diazotrophicus*.

3.2.4. Transplante para a casa de vegetação

Seis dias após a incubação, as plantas que não foram utilizadas na contagem, foram transplantadas para a casa de vegetação de biossegurança (Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ) para a aclimatização. Foram separados e transplantados 18 perfilhos de plantas micropropagadas de cada tratamento (não inoculada, PAL5 selvagem, mut17-4, mut17-5, mut17-6 e C12) para as células de bandejas de isopor contendo areia-vermiculita húmida (três vezes autoclavada) como substrato. Durante os primeiros 4 dias, as bandejas com as plantas foram mantidas cobertas com sacos de plástico para evitar a transpiração excessiva das plantas. Após a retirada dos sacos plásticos, 20 ml de meio MS 1x sem sucrose foi adicionado e esta adubação foi repetida 14 dias mais tarde. O substrato foi mantido úmido pela adição de água destilada estéril. A temperatura da casa de vegetação foi mantida em 30°C durante o dia.

Seis semanas após a aclimação, 6 plantas de cada tratamento foram transferidas para vasos contendo aproximadamente 4,5 l de areia-vermiculita estéril para a continuação da avaliação do efeito da inoculação no crescimento das plantas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 6 repetições.

3.2.5. Reisolamento de bactérias de plantas

As plantas aclimatadas em casa de vegetação e que não foram transplantadas para os vasos, foram utilizadas para o reisolamento e contagem de *G. diazotrophicus* conduzidos em dois experimentos distintos. O primeiro experimento foi realizado 6 semanas após a aclimação. Foram escolhidas três plantas (3 repetições) dos tratamentos não inoculado, Pal5, mut17-5 e C12. Cem (100) mg da parte basal do colmo de cada planta foram obtidos, lavados com água destilada e desinfestados em uma solução de cloramina T (1%) durante 4 min. Após duas lavagens com água destilada estéril, o material foi macerado com pistilo e graal, suspenso em solução salina para diluição, e diluído seriadamente até 10^{-6} . Cem (100)

μl das diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-6} foram distribuídos em placas LGI-P, contendo 50 mg/l de extrato de levedura e 20 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida para inibir o crescimento de fungos. O aparecimento de colônias foi avaliado três a 10 dias após a incubação a 30°C. Colônias, obtidas de plantas inoculadas com o mutante C12 foram avaliadas por PCR de colônia.

O segundo experimento foi realizado 8 semanas após a aclimação. Foram escolhidas 3 plantas (3 repetições) de cada tratamento. As raízes das plantas foram lavadas em água corrente seguida de água destilada. De cada planta, 1 g de material de raiz foi desinfectado em cloramina T (1%) durante 4 min. Depois de duas lavagens em água destilada estéril, as raízes foram homogeneizadas e seriadamente diluídas conforme descrito para o primeiro experimento.

3.3. Preparação de DNA

3.3.1. Preparação de DNA total de *G. diazotrophicus*

Dois (2) ml de uma cultura líquida de PAL5 em fase de crescimento logarítmico em meio Dygs foram precipitados por centrifugação a 8000 rpm, 4°C por 10 min. As células foram lavadas uma vez com 500 μl de tampão TE, centrifugadas novamente, e ressuspendidas em 567 μl de tampão TE. Depois, uma solução de SDS (10%) e 3 μl de proteinase K (20 mg/ml) foram adicionadas, o material foi homogeneizado e incubado a 37°C durante uma hora. Foram adicionados 100 μl de uma solução de NaCl (5 M), seguidos de 80 μl de uma solução de CTAB (CTAB 10% em NaCl 0,7 M). O material foi novamente homogeneizado e incubado a 65°C, por 10 min, seguido por 30 min sob agitação leve, a temperatura ambiente. Foi adicionado 1 volume de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), o material foi homogeneizado por repetidas inversões durante 2 min e centrifugado por 10 min a 14000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e, após a adição de 5 μl de RNase (5 mg/ml), foi incubado durante 1 h a 37°C para degradar o RNA. A etapa de purificação com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi repetida e foi adicionado 1 volume de uma solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O material foi homogeneizado durante 2 min e centrifugado (10 min, 14000 rpm, 4°C). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA foi precipitado, adicionando-se 0,6 volume de isopropanol. Após a homogeneização e incubação à temperatura ambiente por 5 min, o DNA

foi retirado com bastão de vidro e lavado duas vezes com EtOH (70%), seco ao ar, e ressuspendido em um volume adequado de tampão TE (pH 8,0).

3.3.2. Preparação de DNA plasmidial pelo método de lise alcaline

A lise alcaline foi realizada conforme descrito por SAMBROOK *et al.* (1989) com poucas modificações. Em um tubo de ensaio, contendo 5 ml de meio de cultura líquido foi inoculada uma única colônia bacteriana, de uma placa fresca, e esta cultura foi incubada sob agitação até que a mesma atingisse à fase logarítmica final. Um e meio (1,5) ml desta cultura foram transferidos para um microtubo do tipo Eppendorf. As células foram precipitadas por meio de centrifugação a 14000 rpm, por 30 s, em uma centrífuga de mesa. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi suspenso em 100 µl de solução I (50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)). Foram adicionados 200 µl de solução II (0,2 N NaOH, 1% SDS). O material foi homogeneizado por meio de repetidas inversões e incubado em gelo durante, no máximo, 5 min. Foram adicionados 150 µl de solução III e o material foi homogeneizado e incubado em gelo durante 10 min, imediatamente após a adição. Depois desta incubação, o material foi centrifugado durante 10 min a 14000 rpm e a 4°C. O sobrenadante cristalino foi transferido para um novo tubo, separando-o do precipitado que foi descartado. Para realizar a precipitação do DNA plasmidial na amostra, dois volumes de EtOH absoluto foram adicionados. O material foi centrifugado por 5 min a temperatura ambiente a 14000 rpm. O precipitado foi lavado com EtOH (70%), seco ao ar e o DNA foi dissolvido em um volume adequado de tampão TE (pH 8,0).

3.3.3. Preparação do plasmídeo pKT230

O plasmídeo pKT230 (BAGDASARIAN *et al.*, 1981) foi obtido da seguinte forma: o plasmídeo pMSKC4 (SEVILLA & KENNEDY, 2000), que é uma construção repórter derivada do plasmídeo pKT230, foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen) para remover o gene repórter *cobA*; após a digestão, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese de gel de agarose, e a banda correspondente ao plasmídeo pKT230 foi isolada. Este fragmento foi tratado com ligase T4 (Invitrogen) para restaurar o plasmídeo pKT230 na forma circular. O plasmídeo foi transferido para a estirpe DH10B de *E. coli* pela eletroporação, usando o equipamento “electro cell manipulator 600” (BTX Inc. EUA), para a

sua multiplicação. A preparação do plasmídeo para a eletroporação da estirpe PAL5 foi realizada pela lise alcalina, conforme descrito acima.

3.4. Transformação e mutagênese da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*

3.4.1. Preparação de células competentes da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*

As células eletrocompetentes foram preparadas conforme descrito a seguir: um tubo de ensaio contendo 5 ml de meio de cultura C2 (TEIXEIRA *et al.*, 1999) foi inoculado com uma colônia da estirpe PAL5, obtida de uma placa fresca de meio Dygs. Esta pré-cultura foi incubada a 200 rpm, a 30°C, até atingir a fase logarítmica de crescimento (aproximadamente 24 hs de crescimento). Dois (2) ml desta pré-cultura foram transferidos para um frasco do tipo Erlenmeyer com volume de 2 l, contendo 200 ml de meio de cultura C2 líquido. Esta cultura foi incubada sob as mesmas condições da pré-cultura, durante aproximadamente 20 h, até atingir uma densidade ótica $D.O._{(600)} = 0,6$ a $0,7$. O frasco contendo as células foi então resfriado sobre gelo por 30 min. A partir deste momento, todas as etapas foram realizadas sobre gelo, inclusive as soluções usadas, as quais foram autoclavadas e resfriadas antes do uso. A cultura de 200 ml foi distribuída em 4 tubos do tipo Falcon com 50 ml cada, e centrifugada durante 10 min a 4000 rpm e a 4°C, em rotor de ângulo fixo (centrífuga Eppendorf 5810R) para precipitar as células. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados em posição invertida, sobre papel absorvente, durante 5 s, para possibilitar a drenagem completa do sobrenadante. Foi adicionado 50 ml de glicerol 10% a cada tubo. Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos, evitando movimentos bruscos dos tubos. Esta etapa é demorada e leva cerca de uma hora. Após a completa ressuspensão, as células foram novamente centrifugadas (4000 rpm, 4°C, 10 min) e o sobrenadante descartado. A lavagem com glicerol 10% foi repetida sob as mesmas condições descritas anteriormente. A segunda etapa de ressuspensão das células foi mais rápida que a primeira, já que parte das impurezas extracelulares foi removida durante a primeira lavagem, diminuindo a coesão nos sedimentos. As células foram novamente centrifugadas (4000 rpm, 4°C, 10 min) e os sedimentos foram ressuspensos em 4 ml de glicerol 10%. Observa-se que a quantidade de glicerol nesta última etapa pode variar conforme a quantidade de células obtida. Após a completa ressuspensão, as células eletrocompetentes foram distribuídas em alíquotas de 100 µl em tubos microtubos, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -70 °C para uso futuro.

3.4.2. Transformação da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* com o plasmídeo pKT230

Alíquotas de 100 µl de células de PAL5 eletrocompetentes foram descongeladas sobre gelo por aproximadamente 10 min. Em eletrocubetas com espaço de 2 mm (BIO-RAD) previamente geladas foi colocado aproximadamente 500 ng de DNA do plasmídeo de teste pKT230. Em seguida, 100 µl de células eletrocompetentes da estirpe PAL5, preparadas conforme descrito anteriormente, foram adicionadas. Após a homogeneização, a cubeta foi colocada entre os eletrodos do equipamento “electro cell manipulator 600” (BTX Inc. EUA) e foi aplicado um pulso elétrico com os seguintes parâmetros: 186 Ω, em modo “high voltage”, 2,5 kilovolts, constante de tempo aproximadamente 0,8 ms. Imediatamente após o pulso, 2 ml de meio C2 (30°C) foram adicionados. A suspensão de células em meio C2 foi homogeneizada e transferida para um tubo do tipo Falcon de 15 ml e incubada em incubadora durante 2 hs a 30°C, com rotação de 200 rpm para possibilitar a recuperação das células e a expressão dos genes marcadores introduzidos durante a transformação. As células foram distribuídas em placas com meio Dygs contendo 200 µg/ml de canamicina. Estas placas foram incubadas a 30°C durante 3 dias, até que as colônias pudessem ser visualizadas.

3.4.3. Transformação da estirpe PAL5 com *EZ::Tn5TM <kan-2>Tnp TransposomeTM*

A transformação foi realizada conforme descrito acima com 1 µl (20 ng) de *EZ::Tn5TM <kan-2>Tnp TransposomeTM*. Após a transformação, as células foram distribuídas em placas com meio Dygs contendo 200 µg/ml de canamicina. A aparência das colônias foi avaliada após 3 dias de incubação a 30°C.

EZ-Tn5™ <KAN-2> Transposon
(1221 bp.)

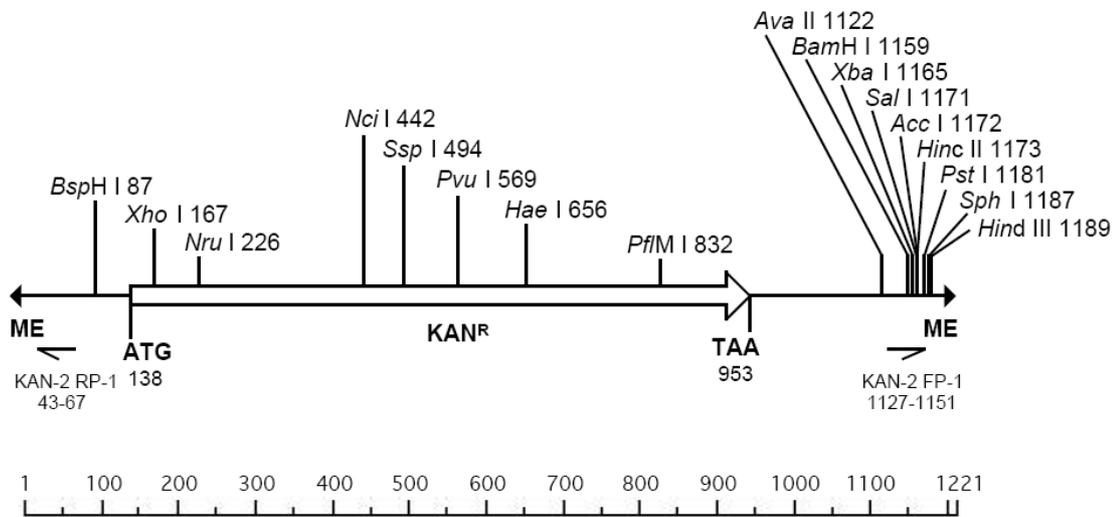


Figura 1: Representação gráfica do EZ-Tn5 <kan-2> Transposon. O gene de resistência ao antibiótico canamicina está representado pela flecha KAN^R. Os primers FP-1 e RP-1 estão representados por KAN-2 RP-1 e KAN-2 RP1, respectivamente. As sequências mosaicas do transposon estão representadas por ME.

3.4.4. Construção e análise do plasmídeo pB1TN17 para a mutagênese de *GdluxI*

O banco de seqüências das bibliotecas de sequenciamento *shotgun* de *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 foi usado para identificar clones contendo fragmentos genômicos codificando o gene *GdluxI*. Foi selecionado o clone 0998H01 (biblioteca 9, placa 98, poço H01), que contém o plasmídeo derivado de pUC18, denominado de pB1. O plasmídeo pB1 contém a ORF completa de *GdluxI*. O kit comercial *EZ::Tn5TM <kan-2>* *transposon insertion kit* (Epicentre) foi usado para gerar inserções de transposon no plasmídeo pB1 *in vitro*. A reação de transposição foi realizada em uma mistura contendo os seguintes componentes:

DNA (pB1 0,4 µg/µl)	0,7 µl
Transposon (1 pmol/µl)	0,7 µl
Tampão <i>EZ::Tn5</i> (10x)	1 µl
Transposase (1 U/µl)	1 µl
H ₂ O q.s.p.	10 µl.

Esta mistura foi incubada durante 2 hs a 37°C. Foi adicionado 1 µl de *EZ::Tn5 10x stop solution*. Após a homogeneização, a mistura foi incubada por 10 min a 70°C e posteriormente estocada a -20°C.

Células eletrocompetentes da estirpe DH10B de *E. coli* foram transformadas com 1 µl do plasmídeo pB1, submetido à reação de transposição. Após a transformação, as células foram distribuídas em placas de meio de cultura LB com 50 µg/ml de canamicina para selecionar transformantes com o plasmídeo pB1 com inserções do transposon (que contém um gene de resistência ao antibiótico canamicina). Para eliminar plasmídeos mutantes com inserções no gene de resistência ao antibiótico ampicilina (Amp^R), os transformantes foram selecionados em placas contendo canamicina (50 µg/ml) e ampicilina (100 µg/ml).

Os transformantes com resistência a ambos os antibióticos foram selecionados. Destes clones, os plasmídeos derivados de pB1 (com inserção do transposon) foram purificados por meio de mini-prep e submetidos à análise de restrição com a enzima *EcoRV*. Os plasmídeos com padrão de restrição desejado foram submetidos ao sequenciamento. As seqüências obtidas foram avaliadas e usadas para identificar plasmídeos com a inserção do transposon dentro da ORF de *GdluxI*.

3.4.5. Transformação da estirpe PAL5 com o plasmídeo pB1TN17

Uma alíquota (100 µl) de células eletrocompetentes da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*, preparada conforme descrito acima, foi transformada com 100 ng de DNA do plasmídeo selecionado, pB1TN17. Após 3 dias de incubação em placas contendo 200 µg/ml de canamicina, colônias foram observadas. Estas colônias foram transferidas para placas contendo 200 µg/ml de canamicina e 400 µg/ml de ampicilina para identificar os transformantes com inserções ocorridas através de recombinação simples. Para as análises moleculares, foram selecionados os transformantes com resistência apenas à canamicina e alguns mutantes para ambos os antibióticos.

3.5. Métodos moleculares para a análise de transformantes

3.5.1. Digestões com enzimas de restrição e ligações

Digestões de DNA foram realizadas usando endonucleases da Invitrogen conforme as recomendações do fabricante. Digestões para simples confirmação e clonagem foram incubadas durante 1 a 4 hs, enquanto digestões para análise *Southern blot* foram realizadas de um dia para o outro.

As ligações de DNA foram realizadas com a enzima T4 ligase (Promega) conforme as recomendações do fabricante. As reações foram incubadas de um dia para o outro, a 16°C.

3.5.2. Análise de mutantes por *Southern blot*

Nos experimentos de *Southern blot* dos mutantes aleatórios, foi utilizada a sonda PRTN que é um fragmento *XhoI/BamHI* de 1 Kb do elemento de transposição EZ::Tn5. A mesma foi preparada da seguinte forma: O plasmídeo pB1TN17 foi digerido com a enzima de restrição *XhoI* e o fragmento liberado de aproximadamente 1,9 Kb, contendo grande parte do elemento EZ::Tn5, foi clonado no sítio *SalI* do plasmídeo pUC18, gerando o plasmídeo pPRTN (Figura 2). A sonda PRTN foi liberada do plasmídeo pela digestão de pPRTN com a enzima de restrição *BamHI* (Figura 2).

A sonda PRLUXI foi obtida a partir do plasmídio pB1 após a digestão deste com enzima de restrição *EcoRV* (Figura 2). Após a separação em gel de agarose, a banda referente ao gene *GdluxI* foi selecionada. O DNA foi purificado e usado como sonda.

Cerca de 25 ng das sondas foi marcada radioativamente com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, durante três hs, a temperatura ambiente, usando o kit *random primers DNA labelling system* (Invitrogen). A transferência de DNA para filtros de nylon foi realizada conforme descrito por SAMBROOK *et al.* (1989) com pequenas modificações. Alíquotas de DNA genômico de 500 ng a 1 μg foram digeridas de um dia para o outro com uma enzima de restrição de interesse. O DNA foi separado em gel de agarose a 0,7% em tampão TAE, a voltagem de no máximo 4 V/cm. O DNA foi corado com brometo de etídeo e visualizado com luz ultravioleta, o gel foi alinhado com uma régua e fotografado.

O gel foi incubado em solução de desnaturação (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) durante 45 min sob agitação suave e, posteriormente, lavado com água destilada. Depois da desnaturação, o gel foi incubado durante 30 min em solução de neutralização (1 M Tris-HCl (pH 7,4), 1,5 M NaCl), a solução foi trocada e a incubação foi continuada durante mais 15 min. O DNA desnaturado, presente no gel, foi então transferido para filtro de nylon Hybond-N (Amersham) pelo método de transferência capilar. Como solução de transferência foi utilizado uma solução de 10 x SSC (preparado de estoque de 20 x SSC: 173,3 g/l NaCl, 88,2 g/l citrato de sódio, pH 7,0). Após a transferência de um dia para o outro, o DNA foi irreversivelmente ligado ao filtro em forno a 80°C, durante 1 h. Os filtros foram guardados a 4°C para uso futuro. As hibridizações foram realizadas em um forno de hibridização hybridiser HB-1D (Techne) a 65°C. Os filtros foram pré-hibridizados em Modified Church Buffer (MCB) durante 1 h, a sonda foi aquecida a 100°C durante 5 min para desnaturar e adicionada ao tampão de pré-hibridação e a hibridação foi realizada de um dia para o outro. Os filtros foram lavados 4 vezes por 20 min com uma solução de 0,1% SDS e 1 x SSC e depois expostos com filmes MXG (Kodak) para a visualização.

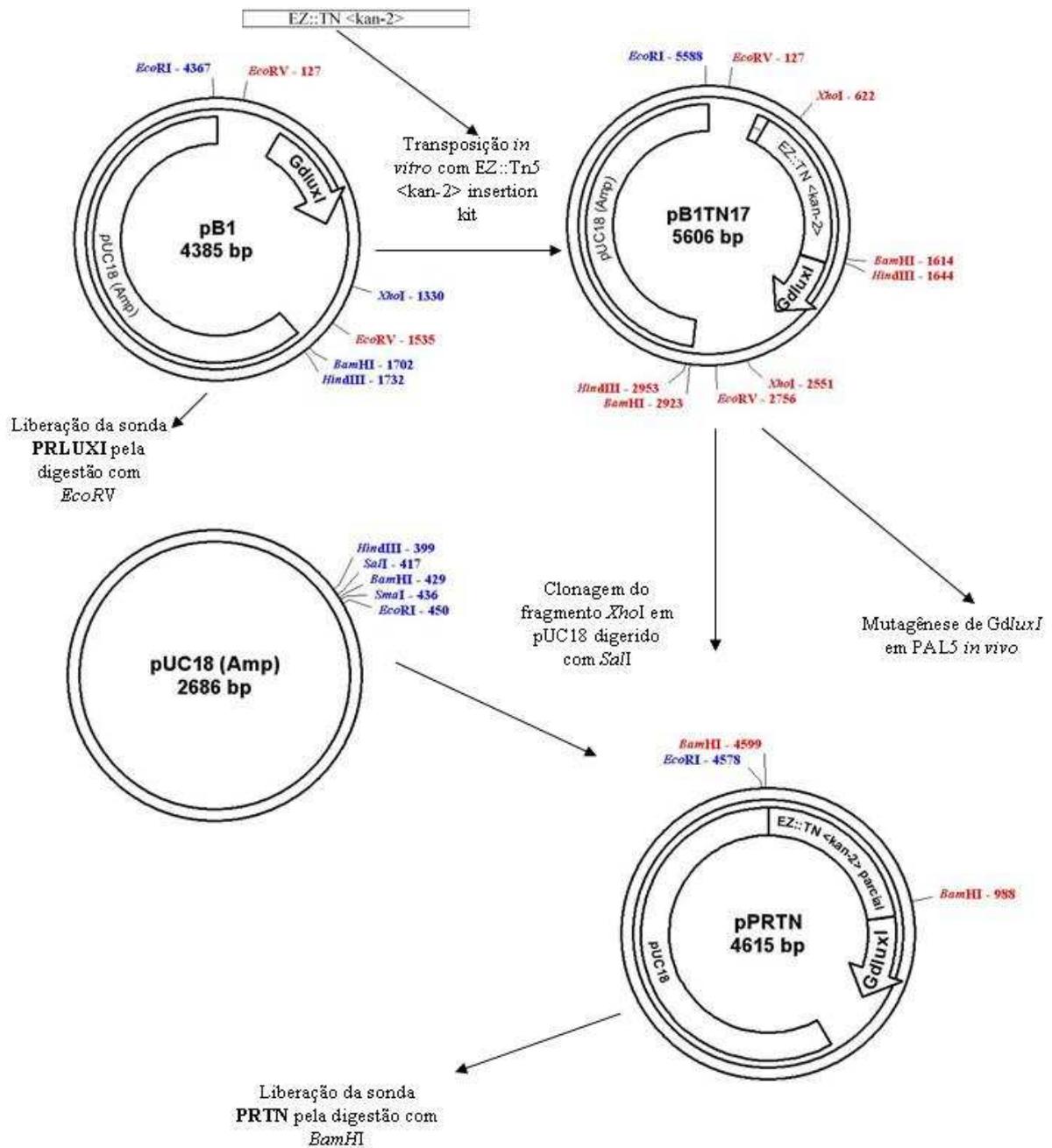


Figura 2: Representação gráfica da mutagênese do plasmídeo pB1 e da geração das sondas PRTN e PRLUXI.

3.5.3. Verificação da identidade de *G. diazotrophicus* por PCR

A confirmação da identidade de *G. diazotrophicus*, e a presença de genes e de inserções do elemento EZ::Tn5 em sítios sob investigação foi realizada através da análise de PCR. Todas as reações de PCR foram realizadas usando o kit Taq polymerase (Invitrogen). Os primers AD e 1440 (KIRCHHOF *et al.*, 1998), usados nas reações de PCR de colônias para verificar a identidade de *G. diazotrophicus* tem a seguinte sequência:

primer AD TGCGGCAAAAGCCGGAT

primer 1440 GTTGGCTTAGAAGCAGCC

A amplificação do locus com o gene similar a *flgA* foi realizada com o seguinte par de primers:

flgA-left TTACGACACGCTGTCGATTC

flgA-right CATGACAACGGCAACACTTC.

A amplificação do gene *GdluxI* foi realizada com o par de primers 42R/43R (veja item 3.6.2). As reações foram realizadas usando DNA purificado ou material de colônia como molde para a amplificação. No caso de PCR de colônia, pequenas quantidades de material de colônias foram inoculadas nas pré-misturas dos componentes da reação, resumidas nas três composições a seguir. Estas composições referem-se ao PCR com DNA, de forma que, nos casos de PCR de colônia, o DNA (1 µl) foi substituído pela mesma quantidade de água e inoculação com material de colônia.

Deste modo, as composições utilizadas nas reações de PCR (números em μl) foram as seguintes:

	AD/1440	flgA-left/flgA-right	42R/43R
DNA (50 ng/ μl)	1	1	1
Tampão de PCR (10x) (Invitrogen)	5	5	5
MgCl ₂ (50 mM) (Invitrogen)	4	1,5	1,5
dNTPs (10 μM)	1	1	1
Primer 1 (10 μM)	1	2	1
Primer 2 (10 μM)	1	2	1
Taq polimerase (5 U/ μl) (Invitrogen)	0,2	0,2	0,2
H ₂ O	q.s.p. 50	q.s.p. 50	q.s.p. 50

As misturas de PCR foram preparadas sobre gelo, levadas ao termociclador e submetidas aos seguintes programas:

AD/1440		flgA-left/flgA-right		42R/43R	
93 °C	3 min	93 °C	3 min	93 °C	3 min
Mais 30 ciclos de:		Mais 35 ciclos de:		Mais 30 ciclos de:	
93 °C	45 s	93 °C	45 s	93 °C	45 s
60 °C	45 s	50 °C	45 s	50 °C	45 s
72 °C	60 s	72 °C	2 min 30 s	72 °C	2 min
Extensão final:		Extensão final:		Extensão final:	
72 °C	10 min	72 °C	10 min	72 °C	10 min

A presença de produtos de PCR foi avaliada por eletroforese de 5 μl de cada reação e o DNA foi visualizado utilizando-se de luz ultravioleta, após coloração do gel com brometo de etídeo.

3.5.4. Ensaios de estabilidade genética *in vitro* e *in vivo*

Os mutantes A8, A9, A10, B2, B3, B8 e B12 foram repicados para placas com meio de cultura Dygs contendo canamicina. Após 3 dias, uma colônia foi selecionada para cada

mutante e inoculada em 5 ml de meio de cultura Dygs líquido contendo canamicina em tubos de ensaio. Estas culturas foram incubadas durante 24 hs, a 30°C, sob agitação a 200 rpm até formar uma cultura densa com uma D.O.₍₆₀₀₎ de aproximadamente 0,6. Estas culturas foram então diluídas 500 vezes em meio de cultura Dygs fresco, e o ciclo de crescimento de 24 hs foi repetido até que as culturas atingissem a mesma D.O.₍₆₀₀₎ = 0,6. Portanto, foi possível inferir que a quantidade mínima de gerações, ou duplicações bacterianas, durante cada ciclo de crescimento foi de aproximadamente 9 (uma vez que $2^9 = 512$, ou, aproximadamente o fator de diluição de 500). Este procedimento foi repetido várias vezes, de forma que os mutantes passaram por 6 ciclos de crescimento, correspondendo a $6 \times 9 = 54$ ou, no mínimo, 50 gerações. No final do crescimento prolongado, o DNA total foi extraído dos mutantes. Este DNA e o DNA obtido no início do estudo para os mesmos mutantes foi usado em experimentos de *Southern blot* como descrito anteriormente.

O mutante C12 foi utilizado em um experimento de estabilidade genética *in vivo*. *G. diazotrophicus* foi reisolada de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com o mutante C12, 6 semanas após o crescimento em casa de vegetação (veja item 3.2.5.). Os primers flgA-left e flgA-right (item 3.5.3.) foram utilizados nos ensaios de PCR de colônias.

3.5.5. Definição das enzimas de restrição usadas em reações de PCR inverso

Para o PCRI é importante o uso de enzimas de restrição de corte frequente, já que fragmentos menores são mais facilmente amplificados nas subsequentes reações de PCR. Além disso, as enzimas devem cortar apenas poucas vezes o transposon. Por isso, foi feito um levantamento das enzimas de restrição com um ou dois sítios dentro do transposon. A frequência de restrição destas enzimas foi determinada em um contig de 1,22 megabases, representativo para o genoma de PAL5, usando o programa pDRAW32 (www.acaclone.com). Posteriormente, foi avaliada a capacidade das enzimas selecionadas (*AluI*, *PstI*, *PvuI* e *RsaI*) de digerir o DNA genômico de PAL5.

3.5.6. Preparação de DNA molde para PCR Inverso

Alíquotas de 500 ng a 1 µg de DNA total da estirpe PAL5 foram digeridas durante 4 hs, a 37°C, em volumes de 25 µl com enzimas de restrição *PstI* e *PvuI* da seguinte forma:

DNA	500 ng-1 µg
Tampão de restrição	2,5 µl
Enzima de restrição	10 U
H ₂ O	q.s.p. 25 µl.

Após a digestão, as enzimas de restrição nas amostras foram desativadas por aquecimento, durante 15 min, a 60°C para *Pst*I e a 85°C para *Pvu*I. Em seguida, o material foi tratado com ligase T4 para a geração de fragmentos de DNA circulares. A reação foi realizada de um dia para o outro, a 16°C, em um volume de 100 µl da seguinte composição:

DNA (a amostra da digestão)	25 µl
Tampão (5X)	20 µl
Ligase T4	2 µl (2 U)
H ₂ O	53 µl.

Posterior à reação de ligação, o DNA foi precipitado durante no mínimo 2 hs, a -20°C, após a adição de 10 µl de acetato de sódio 3 M, pH 5,5 e 200 µl de EtOH absoluto. O DNA foi centrifugado durante 30 min a 14000 rpm, a 4°C, o precipitado foi lavado com EtOH 70%, seco ao ar e dissolvido em 20 µl de H₂O e subsequentemente utilizado como DNA molde em reações de PCR.

3.5.7. PCR Inverso

Quatro primers foram usados para a estratégia de PCRI. Os primers FP-1 e RP-1 foram fornecidos no kit de transposome (Epicentre). Dois primers adicionais (PVU-left e PVU-right) foram desenhados de forma a ter uma temperatura de *melting* similar à temperatura dos primers FP-1 e RP-1, conforme exposto a seguir.

Primer	Sequência (5'-3')	T <i>melting</i>
FP-1	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	72°C
RP-1	GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG	68°C
PVU-left	GAAAACAGCATTCCAGGTATTAGA	68°C
PVU-right	CAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAG	66°C

As reações de PCR foram realizadas da seguinte forma: O DNA digerido com *Pst*I e tratado com ligase foi usado como DNA molde para PCR com os primers FP-1 e RP-1. Esta reação possibilita a amplificação da borda que flanqueia o lado “RP-1” do transposon. Novos primers, PVU-left e PVU-right, foram desenhados para serem usados em combinação com os primers FP-1 e RP-1. A combinação de primers FP-1/PVU-right possibilita a amplificação da borda “FP-1” a partir de DNA molde obtido após digestão com *Pvu*I. A combinação de primers RP-1/PVU-left possibilita a amplificação da borda “RP-1” deste DNA molde.

As reações de PCR foram feitas em volumes de 50 μ l com a seguinte composição:

DNA molde	2 – 5 μ l (50-100 ng)
Tampão de PCR	5 μ l
dNTPs (2,5 mM)	4 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 μ l
Primer 1 (10 μ M)	1 μ l
Primer 2 (10 μ M)	1 μ l
Polimerase Taq (5 U/ μ l)	0,5 μ l
H ₂ O	q.s.p. 50 μ l.

As amostras foram levadas ao termociclador e submetidas ao seguinte programa:

95°C	durante 5 min,	seguido de 35 ciclos de:
95°C	durante 45 s	
56°C/58°C	durante 1 s	
72°C	durante 2 s,	seguido de uma etapa de extensão final de:
72°C	durante 5 s.	

Nos primeiros experimentos foi usada uma temperatura de anelamento de 56°C; porém, um teste comparativo justificou a mudança para 58°C nos demais experimentos (ver resultados). Em alguns casos o volume de PCR foi aumentado para 100 μ l para aumentar o rendimento do PCR, sendo que a estequiometria da reação foi sempre respeitada. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose (1%). Quando os produtos de PCR apresentavam produtos inespecíficos, na forma de rastro (*smear*), as bandas nítidas foram sacadas do gel para a purificação do produto de amplificação. Produtos de PCR que

apresentaram bandas bem definidas foram purificados diretamente. Nos dois casos foi usado o kit *wizard sv gel and pcr clean-up system* (Promega), sendo o DNA purificado dissolvido em 50 µl de H₂O.

3.5.8. Sequenciamento dos produtos de PCR Inverso

Alíquotas de 1 a 5 µl (aproximadamente 500 ng) de DNA amplificado e purificado como descrito anteriormente foram sequenciadas. A reação de sequenciamento foi realizada com o *DYEnamic ET dye terminator kit* (Amersham) em um volume final de 10 µl, contendo:

DNA	500 ng
Primer (5 µM)	1 µl
Sequencing premix	4 µl
H ₂ O	q.s.p. 10 µl.

O programa de PCR para a reação de sequenciamento foram 30 ciclos das seguintes etapas:

95°C	durante 20 min
50°C/56°C	durante 15 s
60°C	durante 60 s.

A temperatura de anelamento de 50°C foi usada nos primeiros experimentos de sequenciamento; porém, com a otimização da metodologia a temperatura foi elevada para 56°C. Os produtos de PCR I obtidos com os pares de primer FP-1/RP-1 e RP-1/PVU-left foram sequenciados com o primer RP-1 e os produtos obtidos com o par de primers FP-1/PVU-right foram sequenciados com o primer FP-1.

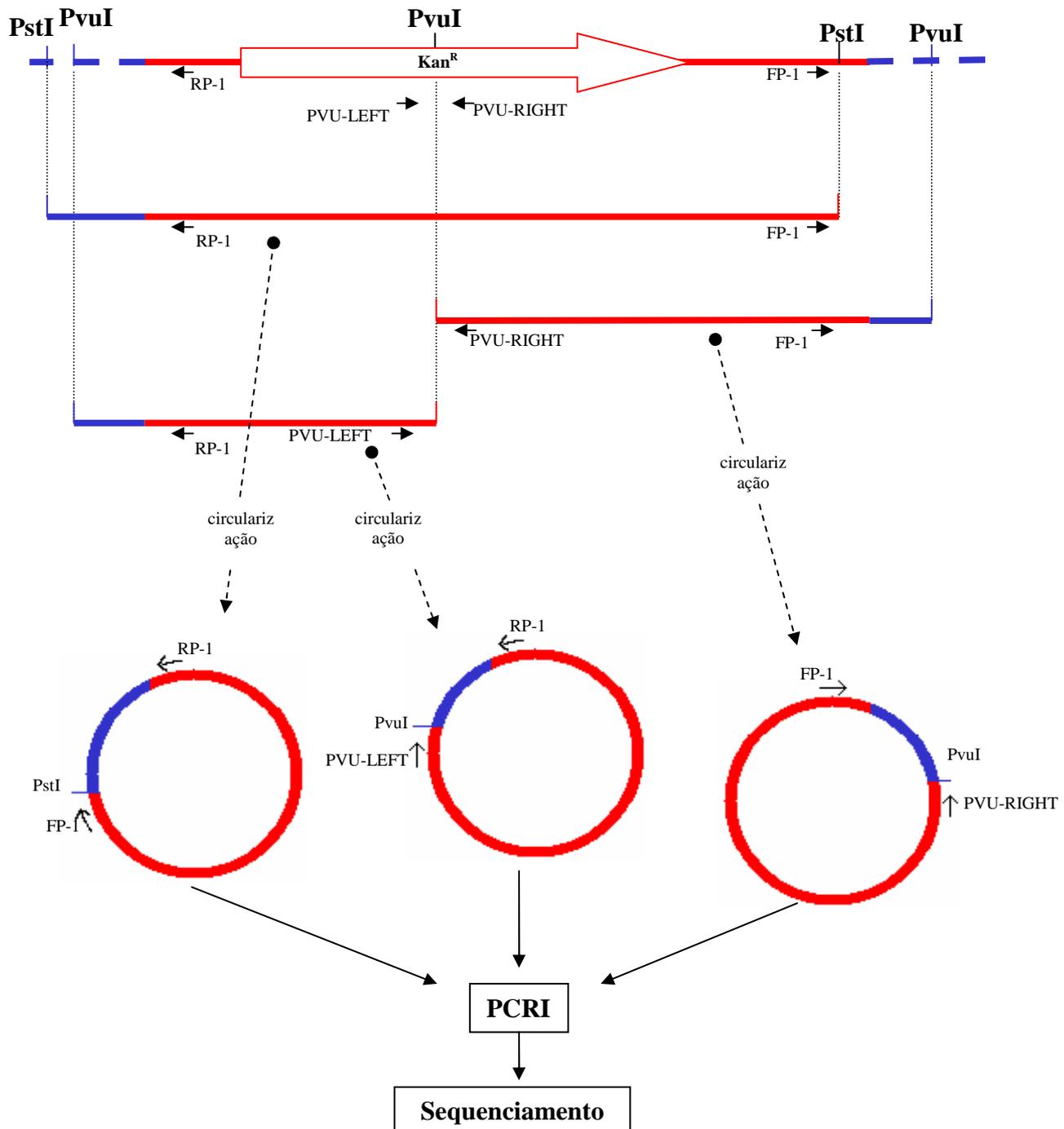


Figura 3: Representação gráfica do PCR inverso (PCRI) para a determinação de sítios de inserção. DNA genômico (azul) de mutantes contendo o transposon (vermelho) inserido nos seus genomas é digerido com as enzimas de restrição selecionadas *PstI* ou *PvuI*. O produto da digestão é tratado com a enzima ligase para provocar a circularização dos fragmentos que são usados como DNA molde em reações de PCR com os primers FP-1, RP-1, PVU-left e PVU-right. Os produtos de PCRI puderam ser sequenciados em seguida.

3.5.9. Análises de bioinformática

As sequências obtidas das bordas do transposon foram comparadas com a sequência genômica da estirpe PAL5 usando a ferramenta BLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1997) da página www.bionotes.com.br e www.bioqmed.ufrj.br/blast. A análise de identidades de genes e de produtos protéicos de *G. diazotrophicus* foi feita usando as ferramentas BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) disponíveis na página do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). O peptídeo-sinal do produto protéico do homólogo *flgA* de *G. diazotrophicus* foi identificado através da ferramenta SMART (LETUNIC *et al.*, 2004).

3.6. Estudos de expressão gênica de *GdluxI*

3.6.1. Isolamento de RNA para estudos de expressão de *GdluxI*, *GdluxR1* e *GdluxR2*

PAL5 foi cultivada em 100 ml de meio de cultura Dygs líquido, sob agitação (150 rpm, 30°C). Alíquotas de células de 10 ml foram tiradas durante 4 fases do crescimento, quando a cultura apresentava uma de $D.O._{(600)} = 0,042$ (fase lag inicial), $D.O._{(600)} = 0,075$ (fase log inicial), $D.O._{(600)} = 0,129$ (fase log) e $D.O._{(600)} = 0,29$ (fase log). As células foram precipitadas por centrifugação durante 10 min, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

A extração de RNA foi realizada usando-se soluções preparadas com água DEPC, da seguinte forma: células foram suspensas em 1140 µl de tampão TE com 60 µl de SDS (10%) e incubadas durante 1 h sob leve agitação. Foram adicionados 200 µl de NaCl (5M), e após a homogeneização, foram adicionados 200 µl de uma solução de CTAB (10%) em NaCl (0,7%). Esta mistura foi incubada durante 1 h sob leve agitação. Posteriormente foi feita a extração com 1 volume de cloroformio:isoamil-álcool (24:1) sob leve agitação manual sobre gelo, durante 10 min. Após centrifugação por 15 min, 10000 RPM, 4°C, o sobrenadante aquoso foi levado a um recipiente estéril novo e extraído com 1 volume de fenol:clorofórmio:isomil-álcool (25:24:1), sob leve agitação manual sobre gelo, durante 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo recipiente estéril e extraído novamente com 1 volume de cloroformio:isoamil-álcool (24:1). Após a extração, o sobrenadante foi transferido para um novo recipiente estéril e os ácidos nucleicos foram

precipitados durante 1 h, a -20°C , adicionando-se 1/10 volume de NaOAc (3M, pH4,8) e 2 volumes de EtOH absoluto. O material foi centrifugado (10000 rpm, 10 min, 4°C) e o precipitado foi lavado 2 vezes com EtOH (70%).

Finalmente, o precipitado foi dissolvido em 200 μl de tampão de DNase. O material foi tratado com 10 U de DNase, durante 30 min, a 37°C , para degradar o DNA presente nas amostras. O RNA foi precipitado como descrito anteriormente, depois dissolvido em 200 μl de tampão de DNase e tratado com 10 U de Dnase, durante 30 min, a 37°C , para garantir a completa degradação de todo o DNA presente nas amostras. O RNA foi extraído com 1 volume de fenol, seguido por uma extração com clorofórmio e o RNA foi precipitado e lavado 2 vezes conforme descrito anteriormente. O RNA foi dissolvido em H_2O MilliQ, a qualidade do RNA foi avaliada em gel de agarose e, em seguida, a concentração do RNA foi ajustada a uma concentração final de 500 ng/ μl .

3.6.2. PCR de transcrição reversa

Para verificar se os genes *GdluxI*, *GdluxR1* e *GdluxR2* foram expressos, experimentos de PCR de transcrição reversa (RT-PCR) foram realizados com RNA coletado em 3 pontos da curva de crescimento ($\text{D.O.}_{(600)} = 0,042$; $\text{D.O.}_{(600)} = 0,075$; $\text{D.O.}_{(600)} = 0,29$). usando o kit comercial *ThermoScriptTM RT-PCR System* (Invitrogen). Neste experimento foram usados os seguintes primers:

40F TTAAGCAACGGCAGATGTTC
40R TACCGCTTTGGTAAATGCAA
42F TCAGGGACCTTGTCACGATA
42R CGCGTTTTGGCAAGTATCTA
43F TACGCGACTCTGCCTTTATG
43R CTCTCCGCATGATCGAATAA.

Para a síntese da primeira fita dos respectivos genes, foram feitas misturas contendo os seguintes componentes:

RNA	2 µl (Aproximadamente 1µg)
Primer 40R (<i>GdluxR1</i>)	1 µl (10 pmol)
Primer 42R (<i>GdluxR2</i>)	1 µl (10 pmol)
Primer 43R (<i>GdluxI</i>)	1 µl (10 pmol)
dNTPs	2 µl (2,5 mM)
H ₂ O	5 µl.

Estas misturas foram aquecidas a 65°C, por 5 min, para desnaturar o RNA. Foi então adicionado uma pré-mistura contendo os seguintes componentes:

Tampão de RT-PCR	4 µl
DTT	1 µl
RNase OUT TM	1 µl
H ₂ O DEPC	1 µl
Thermoscript TM RT	1 µl (15 U).

Após a mistura, as amostras foram incubadas durante 45 min, a 50°C, em termocilador para permitir a síntese de cDNA. Subsequentemente, a reação foi interrompida, incubando-se as amostras a 85°C, por 5 min, e, posteriormente, as amostras foram incubadas com 1 µl de RNaseH por 20 min, a 37°C, para a degradação do RNA. O cDNA foi estocado a -20°C e usado em reações de PCR.

Reações de PCR foram realizadas, usando os pares de primers 40F/40R, 42F/42R e 43F/43R e com 2 µl dos cDNAs, gerados com os primers 40R, 42R e 43R como molde. O controle negativo consistiu em PCR com 2 µl de RNA (sem transcrição reversa) como molde com o par de primers 40F/40R.

As misturas para as reações de PCR tiveram a seguinte composição:

cDNA (ou RNA para controle negativo)	2 µl
tampão de PCR (10x)	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	4 µl
dNTPs (2,5 mM)	4 µl
primer F (40F/42F/43F) (10 µM)	1 µl
primer R (40R/42R/43R) (10 µM)	1 µl
Taq polimerase (5 U/µl)	0,2 µl
H ₂ O	q.s.p. 50 µl.

As reações de PCR foram realizadas com o seguinte programa:

93 °C	durante 3 min,	seguido de 30 ciclos de:
93 °C	durante 45 s	
50 °C	durante 45 s	
72°C	durante 1 min,	seguido de uma extensão final de:
72 °C	durante 10 min.	

3.7. Bioensaios in vitro

3.7.1. Ensaios de motilidade

O Mutante C12 (*flgA::EZ::Tn5*) foi submetido a experimentos para verificar se o mesmo apresentava o fenótipo esperado para um mutante de flagelo, ou seja, um fenótipo sem motilidade. Foram realizados 2 ensaios distintos com o objetivo de estudar motilidade da estirpe PAL5.

O primeiro ensaio realizado foi o método designado como “tubo de vidro em meio semi-sólido” (L. Perin, Embrapa Agrobiologia, comunicação pessoal), que foi realizado da seguinte forma: tubos de vidro com diâmetro interno de aproximadamente 5 mm e comprimento de 3-4 cm foram colocados verticalmente em vidros contendo 5 ml de meio de cultura LGI-P semi-sólido. Cerca de 20 µl da estirpe selvagem PAL5 e das estirpes mutantes,

crescidas em meio de cultura Dygs líquido, foram colocados dentro dos tubos. Após 5-10 dias de incubação a 30°C, a formação de película no meio de cultura semi-sólido fora do tubo foi avaliada.

Um segundo tipo de ensaio de motilidade foi realizado em placas de petri. Foi testado e definido um meio de cultura baseado no meio LGI-P, contendo 5% de glicose como fonte de carbono, além de 10 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,25% de agar. Neste trabalho, este meio de cultura será chamado de agar de motilidade. Como medida de motilidade foi usada a dilatação da colônia bacteriana, a partir do ponto de inoculação no centro das placas de petri. Diariamente, foi avaliado o diâmetro da área ocupada pelas bactérias.

3.7.2. Ensaio de biofilme

Foi avaliada a formação de biofilmes pela estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* em lâ de vidro, basicamente conforme descrito por OOSTHUIZEN *et al.* (2001). A lâ de vidro (Leco Ltd, USA) (0,05 g) foi colocada em frascos do tipo Erlenmeyer com volume de 100 ml, contendo 25 ml de meio de cultura LGI-gluc (fonte de C: glicose (5 g/l); fonte de N: ácido glutâmico (1 mM)).

Células de *G. diazotrophicus* cultivadas em agar de motilidade foram inoculadas nos frascos Erlenmeyer e as culturas foram incubadas durante 72 hs, a 30°C, com agitação de 200 rpm. A D.O.₍₆₀₀₎ da suspensão de células das culturas foi avaliada, e posteriormente as mesmas foram descartadas. Foi adicionado 1 ml de cristal violeta, na concentração de 1%, a cada frasco, de forma que toda a lâ de vidro entrou em contato com o corante. Após aproximadamente 10 a 20 min, a lâ de vidro foi lavada rapidamente 2 vezes com 50 ml de solução salina (0,7% NaCl), seguido por 2 lavagens com 50 ml de solução salina, sob agitação de 150 rpm, durante 15 min. O corante cristal violeta que permaneceu aderido aos biofilmes (ou seja, às células aderidas à lâ de vidro) após as lavagens, foi extraído com 2 x 2 ml de EtOH absoluto. A D.O.₍₅₆₀₎ foi avaliada por meio de espectrofotometria e este valor foi usado como medida para quantificar a formação de biofilme. O experimento de formação de biofilme foi feito com 4 repetições. O erro padrão dos dados foi determinado e a diferença estatística entre os tratamentos foi comprovada usando o teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.7.3. Ensaios de sensibilidade à irradiação com luz UV-C

A estirpe PAL5 e a estirpe mutante B12 (*uvrC::EZ::Tn5*) de *G. diazotrophicus* foram cultivadas de um dia para o outro em tubos de ensaio com meio de cultura Dygs líquido. Cerca de 0,5 à 1,0 ml desta cultura foi precipitado por meio de centrifugação (5 min, 4000 rpm, 20°C), suspenso em solução salina estéril (0,7% NaCl) e diluído até uma D.O.₍₆₀₀₎ de aproximadamente 0,25. Estas suspensões foram diluídas 10⁵ vezes em solução salina (0,7% NaCl) e usadas em ensaios de sensibilidade à luz UV-C. Alíquotas de 50 µl das diluições de células (PAL5 selvagem, ou a estirpe mutante B12) foram distribuídas em placas com meio de cultura Dygs. As placas contendo as células foram submetidas a diferentes dosagens de luz UV-C proveniente de uma lâmpada Mineralight UVGL-58, que emite radiação com comprimento de onda de 254 nm (UV-C). A distância da lâmpada para as amostras foi de 25 cm, o que levou a uma intensidade de 0,5 J.m⁻².s⁻¹ (0,5 W.m⁻²) de UV-C como foi verificado com um radiômetro VL-215 LM com UV-C fotocélula (Laboratório de Radiobiologia Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS, UFRJ). Diferentes dosagens de UV-C foram administradas alterando o tempo de exposição. Imediatamente após a irradiação, as placas tratadas foram fechadas. Para os tratamentos com luz UV-C seguidos por um período de incubação em luz visível, as placas foram colocadas debaixo de lâmpadas fluorescentes (aproximadamente 50 µmol.m⁻².s⁻¹) por 90 min. Após este período, as placas foram incubadas a 30°C, durante 3 dias. As placas que não receberam luz visível após a irradiação com luz UV-C, foram imediatamente envolvidas em papel alumínio e incubadas a 30°C, durante 3 dias. O aparecimento de colônias foi avaliado em 3 repetições por tratamento. A quantidade de colônias foi avaliada e representada como porcentagem da quantidade de colônias presentes nas placas controle (não irradiadas). A média das três repetições e o erro padrão foram determinados e representados graficamente.

3.8. Microscopia eletrônica de transmissão

Amostras para a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram preparadas a partir de placas de motilidade conforme método descrito por VIDEIRA *et al.* (2003). Um capilar de vidro contendo 100 µl de água foi colocado verticalmente em cima da placa contendo as bactérias. Após 10-30 min, a água do capilar (agora contendo bactérias que

migraram para a mesma) foi retirada e depositada em uma grade de microscopia. Acetato de uranila foi usado como contrastante.

4. RESULTADOS

4.1. Transformação e mutagênese aleatória da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*

4.1.1. Transformação da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* com o plasmídeo pKT230

Com o objetivo de avaliar o uso da técnica de eletroporação para transformar a estirpe PAL5, foi realizado um experimento de eletroporação com aproximadamente 500 ng do plasmídeo pKT230 (BAGDASARIAN *et al.*, 1981) (Figura 4c). Este plasmídeo foi escolhido por conter um gene de resistência ao antibiótico canamicina e por ser do grupo de incompatibilidade IncQ que é compatível com a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* (SEVILLA & KENNEDY, 2000).

Um total de aproximadamente 1000 colônias pôde ser observado em placas com meio Dygs contendo 200 µg/ml de canamicina, após três dias de incubação (Figura 4 b). Portanto, a eficiência da transformação foi calculada como sendo de 2×10^3 transformantes/µg de DNA. Por outro lado, não foram observadas colônias no tratamento controle onde a transformação foi realizada com água ao invés de DNA (Figura 4 a).

A análise para verificar a identidade dos putativos transformantes como sendo transformantes da estirpe PAL5, através da amplificação do fragmento espécie-específico do gene 23S com os primers AD e 1440 (KIRCHHOF *et al.*, 1998), confirmou a capacidade de transformação da estirpe PAL5 pelo protocolo de eletroporação (Figura 5). Em alguns casos, foram observadas colônias de contaminantes; porém, não houve amplificação de fragmentos quando estas foram submetidas à análise por PCR, confirmando assim a identidade dos transformantes como derivados de PAL5 e a confiabilidade da reação do PCR como ferramenta auxiliar de seleção.

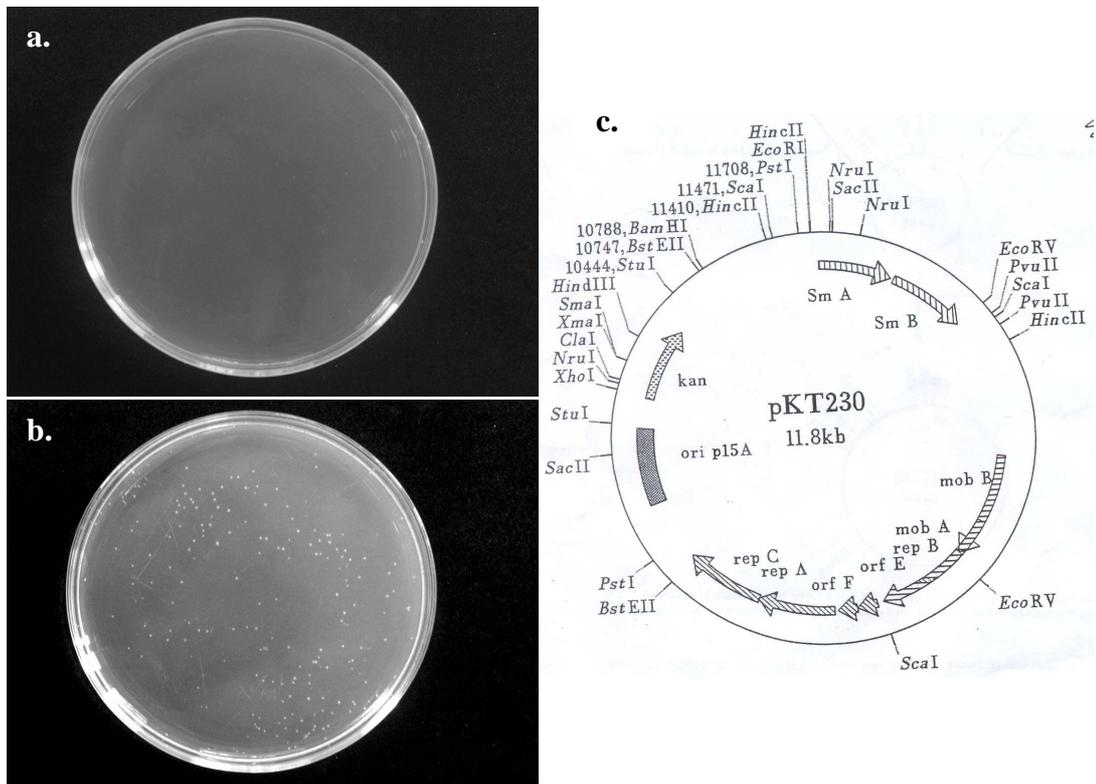


Figura 4: Recuperação da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* após a eletroporação com o plasmídeo pKT230. Células foram eletroporadas na ausência (a) ou presença (b) de 500 ng de DNA do plasmídeo pKT230 (c). As células foram distribuídas em placas com meio Dygs contendo 200µg/ml canamicina e a avaliação ocorreu após 3 dias de incubação a 30°C.



Figura 5: PCR de colônias de transformantes de PAL5 e de bactérias contaminantes, com primers específicos para *G. diazotrophicus*. Colônias derivadas de PAL5 (linhas 8, 9, 10, 11) e colônias contaminantes (linhas 4, 5, 6, 7, 12) foram submetidas a PCR com os primers AD e 1440, específicos para o gene 23S DNAr de *G. diazotrophicus*. Linha 1: controle positivo (PCR com 40 ng de DNA de PAL5), Linha 2: controle negativo (PCR com água), Linha 3: controle positivo (PCR com colônia de PAL5 selvagem).

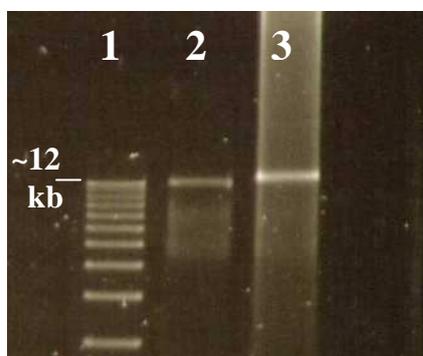


Figura 6: O plasmídeo pKT230 foi isolado de PAL5 transformado. O plasmídeo pKT230 obtido de *E. coli* (Linha 2) e o plasmídeo extraído da estirpe PAL5 transformada (Linha 3), foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* e separados em gel de agarose. Linha 1: marcador molecular *1 Kb plus DNA ladder* (Gibco).

Vale mencionar que o aparecimento de bactérias contaminantes ocorreu em um nível muito baixo e não prejudicou a geração de transformantes. Nos experimentos subsequentes de eletroporação, estes contaminantes não foram mais observados. Com o objetivo de confirmar a presença de pKT230 nos transformantes de PAL5, o DNA plasmídeo de um transformante foi extraído e tratado com a endonuclease *EcoRI*. O plasmídeo isolado do transformante de PAL5 foi do mesmo tamanho (11,8 Kb) do plasmídeo pKT230 original, confirmando que pKT230 estava presente e pode ser multiplicado nesta bactéria (Figura 6).

4.1.2. Transformação da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* com $EZ::Tn5^{TM}$ $\langle kan-2 \rangle Tnp$ *Transposome*TM

Com o intuito de gerar mutantes aleatórios foi realizado um experimento de transformação da estirpe PAL5 com alguns mini-transposons derivados de Tn5. Três dias após a eletroporação com até 1 µg dos plasmídeos suicidas derivados de Tn5, pSUP102Cm::Tn5-B20 e pSUP102Cm::Tn5-B21 (SIMON *et al.*, 1989), inúmeras micro-colônias foram observadas. Porém, estas colônias pararam de crescer nesta fase, e tentativas de transferi-las para placas contendo novo meio de cultura não tiveram sucesso. Por outro lado, a estratégia de mutagênese aleatória com o transposon comercial (Figura 1) mostrou o crescimento de um grande número de colônias em placas de meio Dygs com canamicina, após a transformação por meio de eletroporação da estirpe PAL5 com 20 ng de $EZ::Tn5^{TM}$ $\langle kan-2 \rangle Tnp$ *Transposome*TM.

Estas colônias continuaram a crescer após a transferência para placas frescas. No primeiro experimento, em torno de 10000 transformantes com resistência à canamicina foram obtidos, o que corresponde a uma eficiência de 5×10^5 transformantes/µg de $EZ::Tn5^{TM}$ $\langle kan-2 \rangle Tnp$ *Transposome*TM. Em outros experimentos, eficiências de até 1×10^6 transformantes/µg foram observadas.

4.1.3. Análise de *Southern blot* de mutantes indica um modo aleatório de inserção do elemento $EZ::Tn5$

Doze (12) transformantes resistentes ao antibiótico canamicina obtidos no primeiro experimento de eletroporação de PAL5 com *transposome*, foram aleatoriamente escolhidos para avaliar se apresentavam a sequência do transposon nos seus genomas. Além disso,

buscou-se verificar a natureza aleatória das inserções e se os mutantes apresentavam inserções únicas ou múltiplas.

Em meio de cultura Dygs líquido contendo canamicina, dois mutantes não cresceram de modo satisfatório e os outros 10, designados como mutantes A1-A10, foram usados para a análise. A digestão do DNA total com diferentes enzimas de restrição mostrou a digestão incompleta com as enzimas *BamHI* e *HindIII* enquanto que, para as enzimas *EcoRI*, *EcoRV* e *SalI*, foi observada a digestão completa do DNA.

A análise de *Southern blot* realizada com DNA dos mutantes digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e usando um fragmento do transposon como uma sonda, demonstrou a presença de bandas em todos os mutantes, confirmando assim o sucesso da transformação e a presença do transposon (Figura 7). Conforme esperado, a estirpe selvagem PAL5 não apresentou nenhuma banda. Nove transformantes apresentavam bandas únicas indicando a presença de inserções únicas, enquanto que, em um mutante, duas bandas foram observadas, sendo compatível com uma dupla inserção do transposon neste mutante. O tamanho das bandas nos diferentes transformantes foi variável, indicando que as inserções ocorreram de modo aleatório e não em um único sítio preferido. Experimentos de *Southern blot* também foram realizados com DNA obtido de 17 mutantes (B1-17) de um segundo experimento, conforme descrito para os mutantes A1-10. Todos estes mutantes apresentavam bandas únicas com tamanhos variáveis e nenhum destes mutantes apresentou inserções duplas (Figura 7). Como conclusão, estes experimentos de *Southern blot* mostraram que, entre os 27 mutantes analisados, 26 apresentaram inserções únicas e um único mutante apresentou uma inserção dupla.

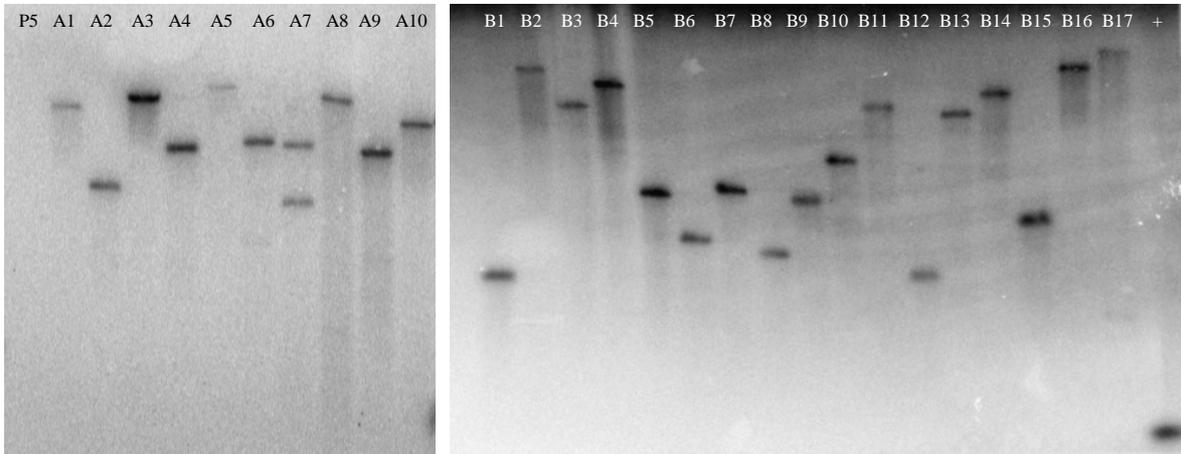


Figura 7: Análise de *Southern blot* de 27 mutantes aleatórios. DNA genômico, isolado de PAL5 selvagem (P5) e de mutantes do primeiro (mutantes A1-A10) e do segundo (mutantes B1-B17) experimento de eletroporação, foi digerido com *EcoRI* e usado em experimentos de *Southern blot*. As membranas foram hibridizadas com um fragmento do transposon marcado. Este fragmento foi também usado como controle positivo (+).

4.1.4. Determinação de sítios de inserção por meio de PCR inverso seguido de sequenciamento

Com o intuito de determinar os sítios exatos de inserção do transposon no genoma dos mutantes, várias tentativas de sequenciamento direto, usando DNA genômico dos mutantes como molde, e os primers FP-1 e RP-1 foram realizadas sem sucesso. Portanto, um método alternativo teve que ser definido e foi escolhida uma estratégia baseada em PCR inverso (PCRI) (MARTIN & MOHN, 1999).

A análise de bioinformática, descrita em materiais e métodos (ítem 3.5.5.), levou à seleção das enzimas de restrição *Pst*I, *Pvu*I, *Alu*I e *Rsa*I para a metodologia de PCRI. As frequências de restrição destas enzimas foram (em sítios/número de pares de base): 1/701 para *Alu*I, 1/2210 para *Pst*I, 1/864 para *Pvu*I e de 1/799 para *Rsa*I. Testes de digestão foram realizados com DNA genômico de PAL5 para verificar a utilidade de cada uma destas enzimas. Estes testes mostraram que o DNA de PAL5 foi resistente à clivagem com *Rsa*I. A digestão completa ocorreu com as enzimas *Pst*I, *Pvu*I e *Alu*I. Experimentos de PCRI usando DNA digerido com a enzima *Alu*I deram um rendimento baixo. Portanto, foram selecionadas as enzimas de restrição *Pst*I e *Pvu*I que apresentam corte frequente no genoma de PAL5, mas que apresentam um único sítio de restrição dentro do transposon. A Figura 3 (materiais e métodos) mostra uma representação gráfica da metodologia de PCRI aplicada neste estudo.

O primeiro experimento de PCRI foi realizado conforme descrito em materiais e métodos em ítems 3.5.6. e 3.5.7. usando DNA genômico dos mutantes A1-A10 digerido com a enzima *Pst*I. Após a geração de fragmentos circulares pelo tratamento com ligase, o PCR foi realizado com temperatura de anelamento de 56°C e com os primers FP-1 e RP-1 (Figura 8). Produtos de PCR foram obtidos para 8 mutantes (Figura 8 e Tabela 1). Nenhum produto de PCR foi observado quando PCRI foi realizado com DNA de PAL5 não transformado. Por outro lado, a análise por PCRI com a enzima de restrição *Pst*I realizado com DNA dos mutantes B1-B17 do segundo experimento (Figura 9), com a temperatura de anelamento de 56°C, mostrou produtos de ampliações fortes em 10 das 17 amostras. As temperaturas de ‘melting’ dos primers FP-1 (72°C) e RP-1 (68°C) são bastante acima da temperatura de anelamento de 56°C aplicada nestas reações de PCR. Com o objetivo de determinar se o aumento da temperatura de anelamento poderia melhorar a eficiência da reação de PCR, esta foi realizada a 58°C e 13 produtos foram obtidos (Figura 8). Portanto, o aumento da temperatura de anelamento de 56°C para 58°C melhorou a eficiência do PCR e foi mantida

nos demais experimentos de PCRI. O DNA dos mutantes A8-A10 e B1-B17 também foi submetido a PCRI com a enzima de restrição *PvuI*. Neste caso, o PCRI foi realizado com os pares de primer FP-1/PVU-right e RP-1/PVU-left (Figura 3).

Desta forma, usando as diferentes estratégias de PCRI, dos 27 mutantes (A1-A10 e B1-B17), no mínimo 1 produto de PCR foi obtido para 24 mutantes, ou seja, para 88% dos mutantes testados (Tabela 1). Todos os mutantes da série “B” (B1-B17) foram submetidos a PCRI com todas as combinações de primer disponíveis (FP-1/RP-1; PVU-right/FP-1; PVU-left/RP-1). Por isto, os mutantes da série “B” são os mais adequados para a determinação do índice de sucesso da metodologia de PCRI aplicada. Para 16 dos 17 mutantes foi possível obter produtos de PCRI, sendo o equivalente a aproximadamente 94%.

Um último experimento com DNA de 36 mutantes de um terceiro experimento de eletroporação foi realizado com o objetivo de determinar a viabilidade da metodologia de PCRI em média-grande escala, usando uma única enzima de restrição. O DNA destes mutantes foi digerido com a enzima *PstI*, circularizado com ligase de DNA e submetido a um PCRI com os primers FP-1/RP-1. Produtos de PCR foram obtidos para 19 mutantes (Tabela 1).

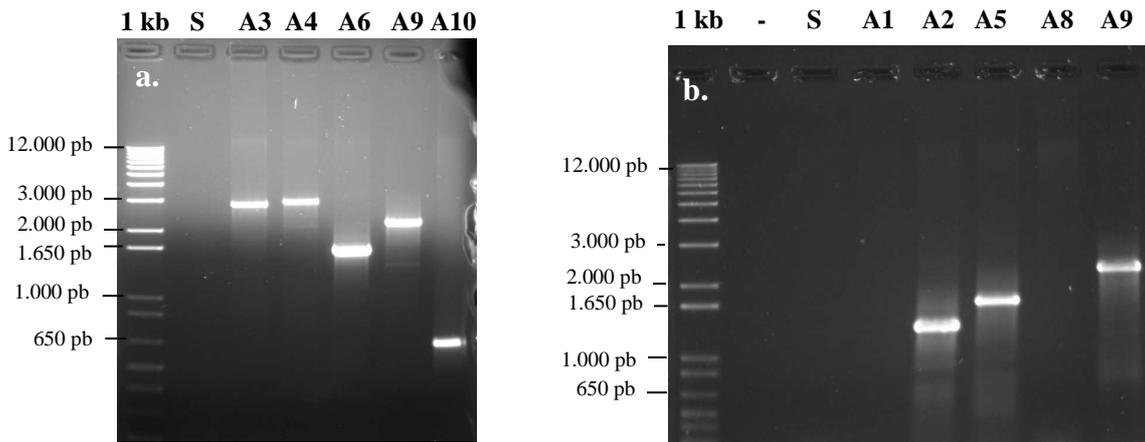


Figura 8: Produtos de PCRI, obtidos dos mutantes A1-A10. PCRI foi realizado a partir de DNA genômico de PAL5 selvagem ou de mutantes digerido com a enzima de restrição *Pst*I em 2 experimentos separados. **a)** Primeiro experimento. **b)** Segundo experimento. 1 Kb: *1 Kb plus DNA ladder*, P5: PAL5 selvagem, -: controle negativo (sem DNA).

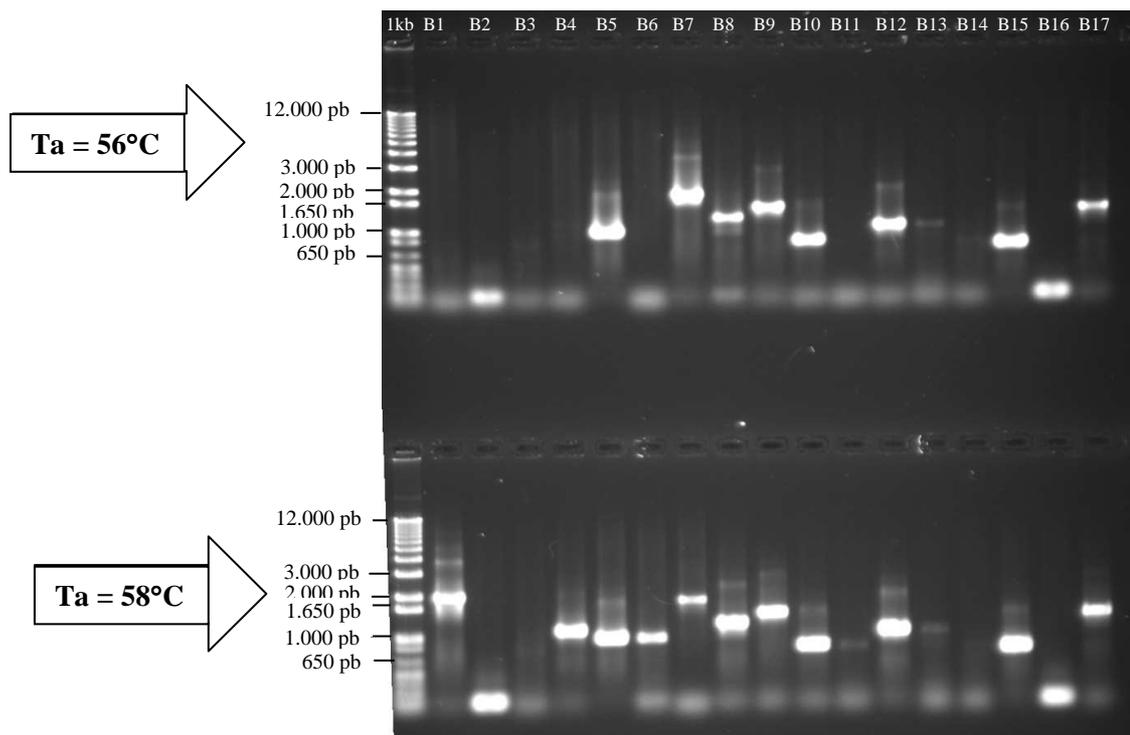


Figura 9: PCRI dos mutantes B1-B17 com diferentes temperaturas de anelamento. O DNA molde para PCRI foi preparado a partir de DNA genômico do mutantes B1-B17 digerido com *Pst*I. PCRI foi realizado em dupla, conforme descrito em materiais e métodos (item 3.5.7.), variando-se apenas a temperatura de anelamento (56°C e 58°C).

Tabela 1: Avaliação da eficiência das reações de PCRI

Mutante	Primers FP-1/RP-1	Primers FP-1/PVU-right	Primers RP-1/PVU-left
A1	-	-	NR
A2	+	+	NR
A3	+	+	NR
A4	+	-	NR
A5	+	-	NR
A6	+	-	NR
A7	-	-	NR
A8	+	+	NR
A9	+	+	NR
A10	+	+	NR
B1	+	+	+
B2	+	-	+
B3	-	+	+
B4	+	+	+
B5	+	-	+
B6	+	-	+
B7	+	+	-
B8	+	+	-
B9	+	-	+
B10	+	-	+
B11	+/-	-	-
B12	+	+/-	+
B13	+/-	+	-
B14	-	+	-
B15	+	+	+
B16	+	+	-
B17	+	+	+
C1	-	NR	NR
C2	+	NR	NR
C3	-	NR	NR
C4	+	NR	NR
C5	-	NR	NR
C6	-	NR	NR
C7	-	NR	NR
C8	+	NR	NR
C9	-	NR	NR
C10	+	NR	NR
C11	-	NR	NR
C12	+	NR	NR
C13	-	NR	NR
C14	+	NR	NR
C15	+	NR	NR
C16	-	NR	NR
C17	-	NR	NR

C18	+	NR	NR
C19	+	NR	NR
C20	+	NR	NR
C21	-	NR	NR
C22	+	NR	NR
C23	-	NR	NR
C24	-	NR	NR
C25	-	NR	NR
C26	-	NR	NR
C27	-	NR	NR
C28	+	NR	NR
C29	+	NR	NR
C30	+	NR	NR
C31	+	NR	NR
C32	+	NR	NR
C33	+	NR	NR
C34	+	NR	NR
C35	+	NR	NR
C36	+	NR	NR

+ Produto de PCR

+/- Produto de PCR fraco

- Sem produto de PCR

NR Não realizado.

Foram obtidas sequências para 31 mutantes (Tabela 2). A qualidade e a especificidade destas sequências pode ser verificada pela presença da sequência das pontas do transposon, seguida por sequências genômicas da estirpe PAL5. Foram obtidos produtos de PCRI para 16 dos 17 mutantes da série “B”, sendo geradas sequências com uma qualidade satisfatória para a determinação dos sítios de inserção em 13 mutantes. Desta forma, foi possível estimar em aproximadamente 75% o índice de sucesso da metodologia de PCRI, ou seja, 13 mutantes tiveram os sítios de inserção determinados dentre os 17 mutantes avaliados.

As sequências que flanqueavam os sítios de inserção do elemento EZ::Tn5 foram comparadas com o banco de sequências de nucleotídeos do genoma de PAL5. Desta forma, foi determinado o sítio de inserção do elemento EZ::Tn5 no genoma de cada mutante (Tabela 2, Figuras 10 e 11). A análise blastP das sequências de aminoácidos das ORFs encontradas no genoma de PAL5, possibilitou a predição funcional dos sítios de inserção (Tabela 3, Figura 10). Para 10 mutantes, as sequências das bordas dos dois lados da inserção foram determinadas (Tabela 2). A análise comparativa destas sequências demonstrou a duplicação dos 9 pares de bases no sítio de inserção, que é provocada pelo mecanismo de transposição de transposons derivados de Tn5. Na Tabela 2, as sequências duplicadas não aparecem como sequências idênticas. As sequências foram geradas a partir das duas fitas complementares do DNA e, por isso, as sequências obtidas com os primers FP-1 e RP-1 são invertidas e complementares.

Tabela 2: Sequências obtidas para 31 produtos de PCRI dos mutantes aleatórios estudados

Mutante	Sequência RP-1	Sequência FP-1
A2	GAGACAGGGGTGGTGT	
A5	GAGACAGATCATGCC	
A7		GAGACAGGCTCGAGCG
A8	GAGACAGAAATCGGAC	GAGACAGGTCCGATTT
A9	GAGACAGGATTGATGT	GAGACAGACATCAATC
A10	GAGACAGCCGAGGATG	GAGACAGCATCCTCGG
B1	GAGACAGTGAATNGCG	
B2	GAGACAGGTGCAGGCC	
B3	GAGACAGATATCCATC	GAGACAGGATGGATAT
B4	GAGACAGGTTCTGGGC	GAGACAGGCCCAGAAC
B5	GAGACAGTCTCCAGC	
B7	GAGACAGGGCTGGTGT	GAGACAGACACCAGCC
B8	GAGACAGATCCCGACT	GAGACAGAGTCGGGAT
B9	GAGACAGCGCGGCTCC	
B10	GAGACAGTTCTTCAGC	GAGACAGGCTGAAGAA
B12	GAGACAGATCCCCAGG	
B15	GAGACAGAGGTATAGG	GAGACAGCCTATACCT
B16		GAGACAGGTGCCGTTC
B17	GAGACAGGTGGGCAGC	GAGACAGGCTGCCAC
C10	GAGACAGGGCTGGGCG	
C14	GAGACAGGTCCAGCAG	
C15	GAGACAGGCCCCAGGT	
C18	GAGACAGGCGCAGGTC	
C19	GAGACAGGTTTCAAGC	
C20	GAGACAGGACCAGAAC	
C22	GAGACAGGCCTGGGCC	
C30	GAGACNGGTCGGCTGA	
C31	GAGACAGATTCTGGGC	
C33	GAGACAGGCCCAGGCC	
C34	GAGACAGACATGTNCG	
C35	GAGACAGCCTTTGCGC	

Vermelho: Sequência do transposon.

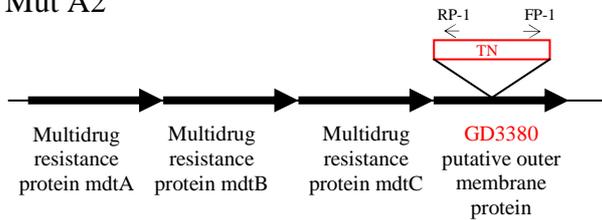
Preto: Sequência genômica.

Tabela 3: Identidade dos sítios de inserção do elemento EZ::Tn5 nos 31 mutantes avaliados neste estudo

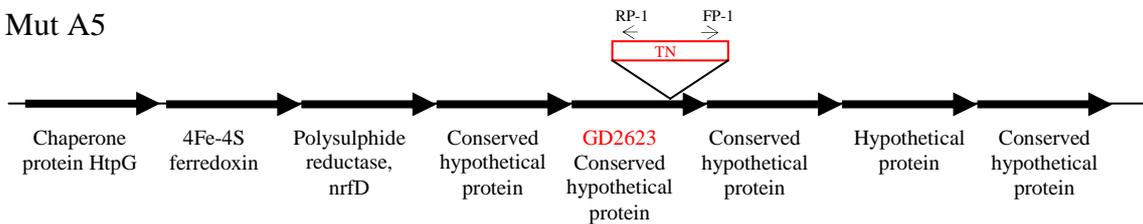
Estirpe mutante	ORF	Provável função no sítio de inserção
A2	GD3380	Putative outer membrane protein
A5	GD2623	Conserved hypothetical protein
A7	GD0992	IstB-like ATP binding protein (transposon functions)
A8	GD2907	Putative transposrter protein
A9	GD2044	NAD-dependent deacetylase npdA
A10	GD1359	Transcriptional regulator lysR
B1	GD2541	Glycosyl transferase
B2		Intergênico
B3	GD2178	Vanillate O-demethylase oxygenase subunit
B4	GD1847	TRP domain protein (unknown function)
B5	Contig 6	rRNA
B7	GD0674	Hypothetical protein
B8	GD2963	Transcriptional regulator exsB
B9	Contig 6	rRNA
B10	GD0871	Fumarate hydratase fumA
B12	GD1819	UvrABC system protein uvrC
B15	GD3021	Amino acid permease
B16	GD0552	Histidine amino lyase hutH
B17	GD1821	Hypothetical protein
C1	GD1428	Putative permease protein
C2	GD1018	Conjugal transfer protein trbB
C3	GD0885	Probable periplasmic serine protease degP
C4	GD0062	Conserved hypothetical protein
C5		Intergênico
C6	GD2318	Glycine cleavage system P protein gvcP
C7	GD1812	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase guaB
C8	GD2643	Putative transporter protein
C9	GD2003	Xanthine dehydrogenase chaperone xdhC
C10		Intergênico
C11	GD2840	Nonribosomal peptide synthetase
C12	GD1694	Flagellar protein precursor flgA

Figura 10: Representação gráfica da localização do transposon nos mutantes sequenciados.

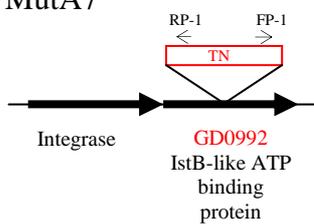
Mut A2



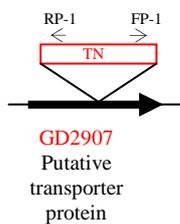
Mut A5



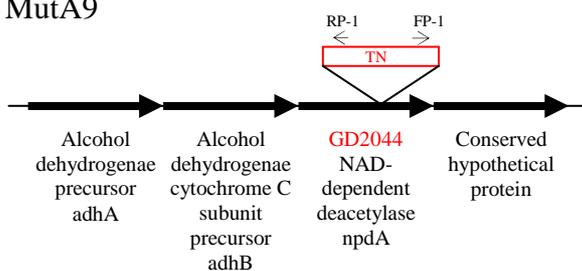
MutA7



MutA8

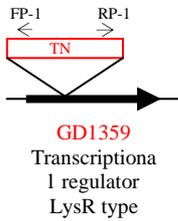


MutA9

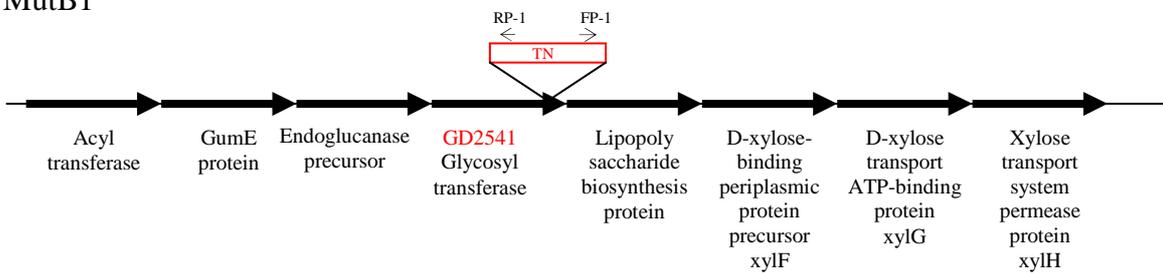


Continua...

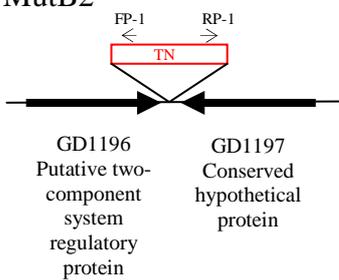
MutA10



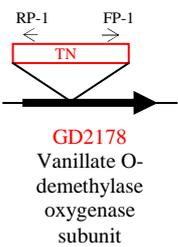
MutB1



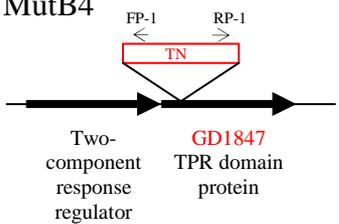
MutB2



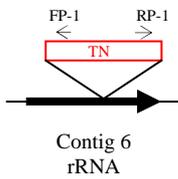
MutB3



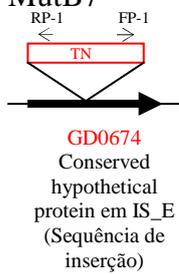
MutB4



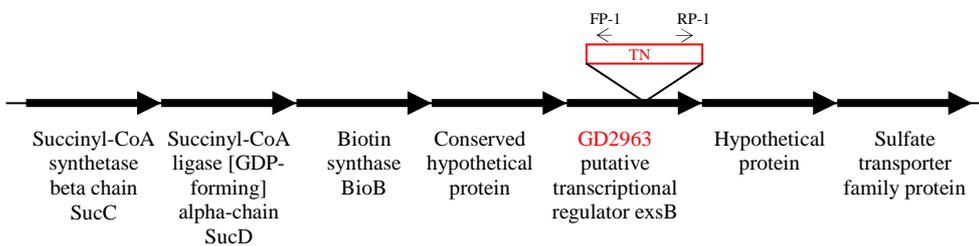
MutB5



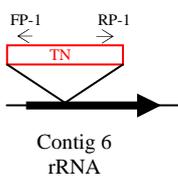
MutB7



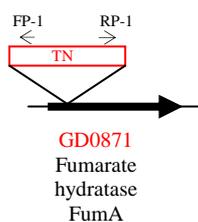
MutB8



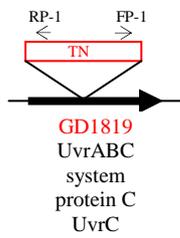
MutB9



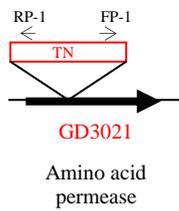
MutB10



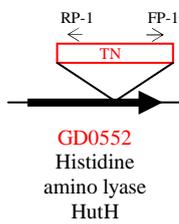
MutB12



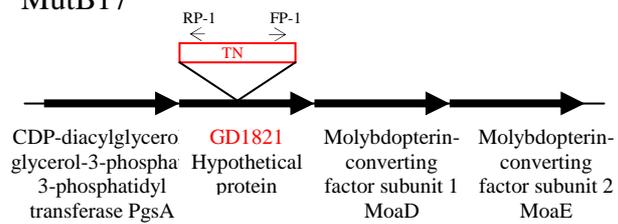
Mut15



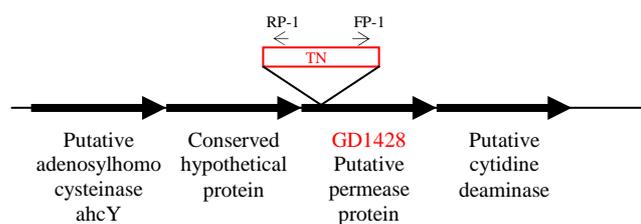
Mut16



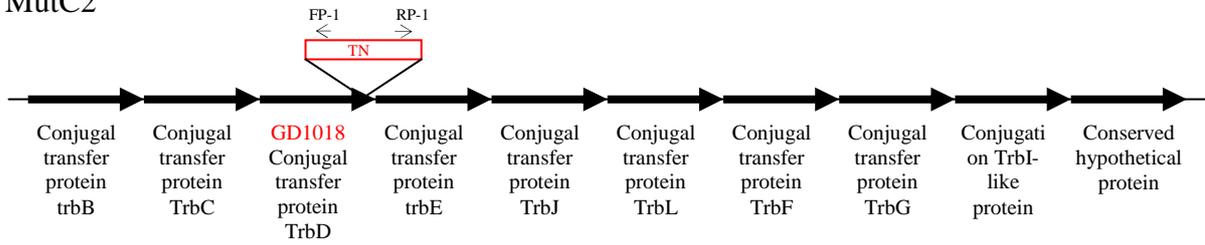
MutB17



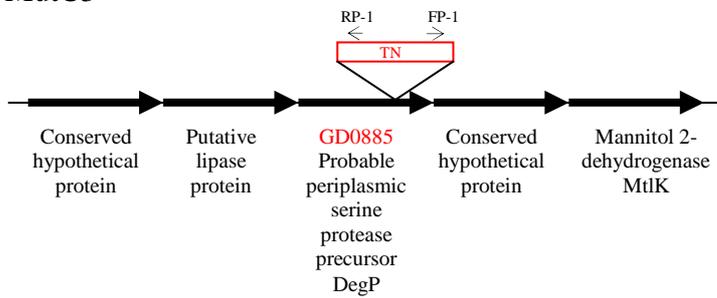
MutC1



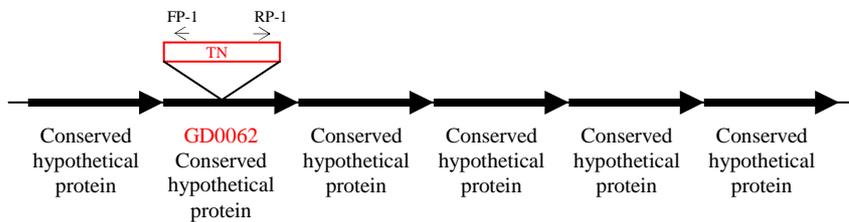
MutC2



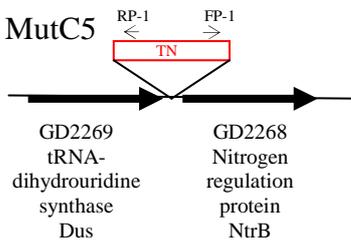
MutC3



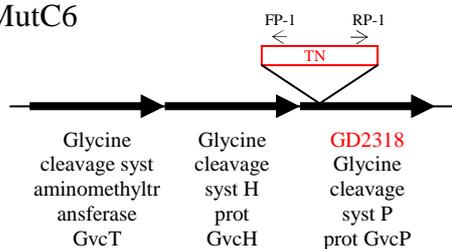
MutC4



MutC5



MutC6



Continua...

MutC12

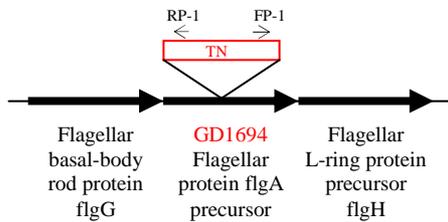


Figura 10: Representação gráfica da localização do transposon nos mutantes sequenciados. As ORFs do genoma de PAL5 estão representadas por flechas com legenda descrevendo a provável função dos genes. Os genes de rRNA não têm número de ORF. O elemento de transposição EZ::Tn5 está representado por uma caixa vermelha.

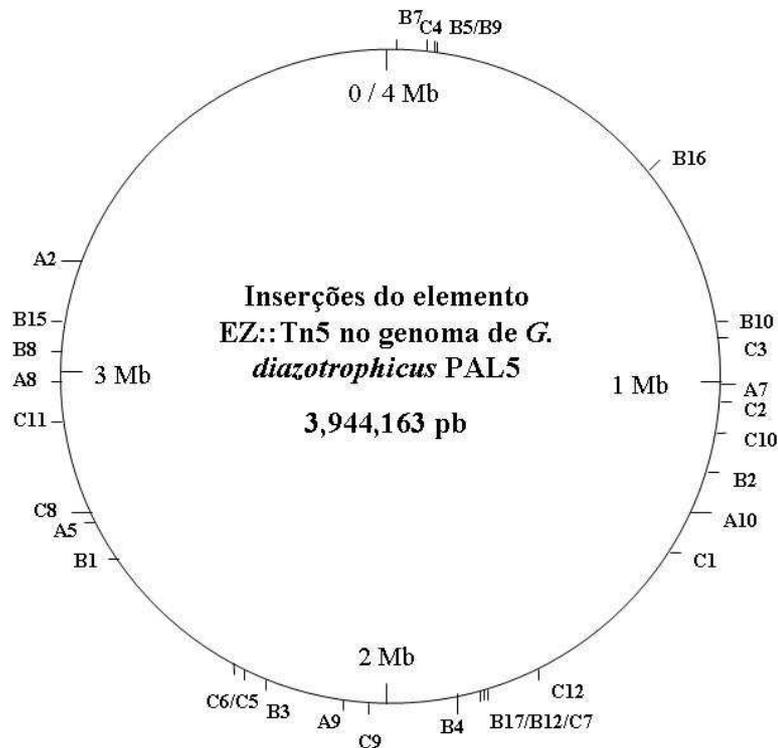


Figura 11: Representação gráfica da posição dos sítios de inserção nos 31 mutantes. Foi determinada a posição do sítio de inserção do elemento EZ::Tn5 no genoma (representado como um círculo) de 31 mutantes derivados da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*.

4.1.5. Inserções do elemento EZ::Tn5 são geneticamente estáveis *in vitro*

Em estudos com mutantes gerados usando transposons, é importante que o transposon, uma vez inserido no DNA, fique geneticamente estável e não se mova para outros sítios. Os resultados de *Southern blot*, realizados com DNA recolhido antes e depois do crescimento prolongado durante no mínimo 50 gerações, mostraram que, nos sete mutantes estudados, a banda que representa a inserção do elemento EZ::Tn5 foi do mesmo tamanho no início e no final do experimento (Figura 12). Pode-se concluir que a inserção do elemento EZ::Tn5 foi geneticamente estável por, no mínimo, 50 gerações.

4.1.6. Verificação fenotípica de mutantes para validar o sistema de mutagênese

Com o intuito de verificar a confiabilidade do presente método de mutagênese, foi adotada uma estratégia de genética reversa. Foi avaliado se os fenótipos esperados foram confirmados para mutantes com inserções em genes com função conhecida.

4.1.6.1. Caracterização da estirpe mutante B12 com a inserção do elemento EZ::Tn5 em um gene putativo *uvrC*

A estirpe mutante B12 teve a inserção do elemento EZ::Tn5 em um gene homólogo de *uvrC*, que está envolvido em reparo de DNA em outros organismos. O sistema de reparo UvrABC, no qual a proteína UvrC participa (como parte do sistema UvrABC), está envolvido em reparo de mutações provocadas por radiação de UV-C. Em outros organismos, mutantes no gene *uvrC* apresentam um fenótipo hipersensível à radiação de UV-C. Por isso, foi especulado que a estirpe mutante B12 possivelmente tivesse um defeito em reparo de DNA provocado por radiação de UV-C e a consequente hipersensibilidade. Para testar esta hipótese, células da estirpe selvagem PAL5 e do mutante B12 (*uvrC::EZ::Tn5*) foram expostas a diferentes dosagens de luz UV-C (254 nm) e a sobrevivência foi avaliada. Em comparação com a estirpe selvagem PAL5, o mutante B12 apresentou um fenótipo hipersensível.

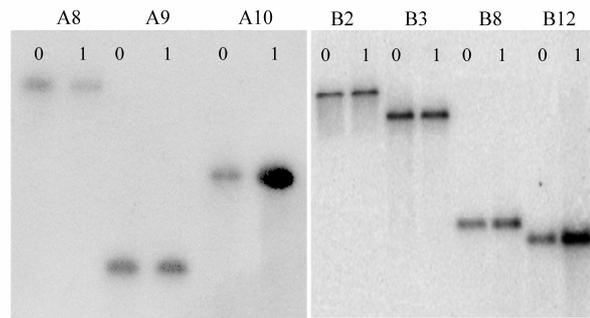


Figura 12: Southern blot mostra estabilidade genética para 7 mutantes. DNA foi extraído dos mutantes A8, A9, A10, B2, B3, B8 e B12, antes (0) e depois (1) de crescimento prolongado foi digerido com enzima de restrição *EcoRI* e usado em experimentos de *Southern blot* com um fragmento do elemento *EZ::Tn5* radioativamente marcado como uma sonda.

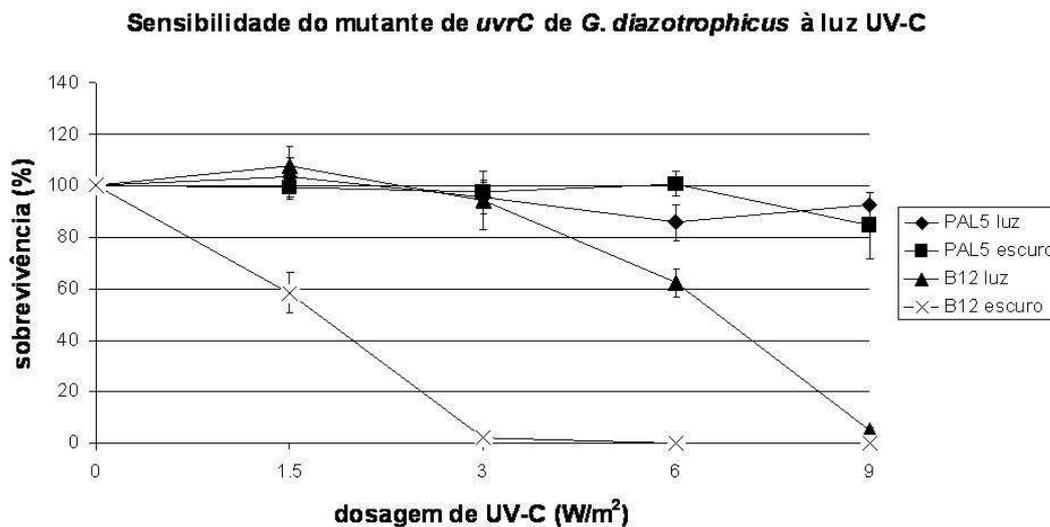


Figura 13: O mutante B12 (*uvrC::EZ::Tn5*) é hipersensível à irradiação com luz UV-C. Quantidades conhecidas de células da estirpe PAL5 selvagem e do mutante B12 foram distribuídas em placas com meio de cultura e submetidas a diferentes dosagens de luz UV-C (254 nm). Imediatamente após a exposição, placas foram embrulhadas em papel alumínio (tratamento escuro) ou colocadas debaixo de lâmpadas fluorescentes durante 90 minutos e depois incubadas a 30°C por 3 dias. A quantidade de colônias foi então avaliada. A quantidade de colônias presente em placas não irradiadas para cada condição (PAL5 luz, PAL5 escuro, B12 luz, B12 escuro) foi definida como 100% e a sobrevivência foi relacionada a este valor. O gráfico mostra as médias de 3 repetições e as barras representam o erro padrão da média para cada tratamento.

Os resultados mostraram que a sobrevivência de células do mutante B12, após exposição a uma dose de radiação de UV-C de 6 W.m^{-2} , foi de 0% (Figura 13). Em contraste, a sobrevivência da estirpe selvagem PAL5 que foi de 100% em todas as dosagens avaliadas (até 9 W.m^{-2}) (Figura 13), sugerindo que o gene homólogo de *uvrC* está, de fato, envolvido na resposta à irradiação com luz UV-C. Os homólogos dos genes *uvrA* e *uvrB* também puderam ser identificados no genoma da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*.

Muitas bactérias têm, além do sistema UvrABC, um outro mecanismo de reparo de DNA chamado de foto-reativação. Este sistema é independente, e atua em paralelo com o sistema UvrABC. As proteínas responsáveis por este tipo de reparo são as fotoliasas, que utilizam energia lumínica (fotons) para seu funcionamento. Portanto, o reparo de DNA por meio de fotoliase ocorre apenas na presença de luz visível. As bactérias dos experimentos relatados acima foram incubadas no escuro, após a irradiação com UV-C, impossibilitando a ação de possível(is) fotoliase(s). Desta forma, foi realizado um experimento fisiológico com o mutante B12 para identificar a ação de uma possível fotoliase em *G. diazotrophicus* PAL5.

Quando as células da estirpe mutante B12 foram expostas à luz durante 2 horas após a irradiação com UV-C, a sobrevivência aumentou consideravelmente se comparada com células incubadas no escuro diretamente após a irradiação. Enquanto a sobrevivência do mutante B12 incubado no escuro foi 0% após irradiação, a presença de luz diretamente após a irradiação com 9 W.m^{-2} levou a uma sobrevivência de aproximadamente 5% (Figura 13).

Portanto, estes dados sugerem a ação de uma fotoliase no reparo de DNA em *G. diazotrophicus*. Para verificar se seria possível identificar um gene codificando uma possível fotoliase no genoma de PAL5 uma análise de bioinformática foi realizada. Esta análise possibilitou a identificação de um único homólogo que é um gene putativo (ORF GD0753) com um produto altamente similar com a fotoliase PhrA (Q55081) da bactéria *Synechocystis* sp. PCC6803 (valor $E = 2 \times 10^{-66}$; 34% de identidade de sequência de aa's).

4.1.6.2. Caracterização do mutante C12 com a inserção do elemento EZ::Tn5 em um gene putativo *flgA*

O segundo mutante submetido a estudos fisiológicos foi o mutante C12, que tem uma inserção do elemento EZ::Tn5 em um gene putativo com homologia ao gene *flgA*, que codifica a proteína FlgA, com uma função na formação do flagelo em *Salmonella* (NAMBU & KUTSUKAKE, 2000). Sabe-se que esta proteína age no espaço periplasmático como uma chaperona que assiste à formação de uma parte estrutural do flagelo, chamado de “anel P”.

Em *Salmonella*, mutantes no gene *flgA* não conseguem formar um flagelo completo e, portanto, têm um fenótipo não móvel (NAMBU & KUTSUKAKE, 2000). Como o seu homólogo de *Salmonella*, o produto FlgA de PAL5 apresenta um sinal peptídico putativo (MTFHVASVCAATLRSA) (Figura 14), que foi identificado usando a análise com a ferramenta SMART. A presença do peptídeo sinal sugere que esta proteína possa ter um papel similar em *G. diazotrophicus*. A *G. diazotrophicus* tem flagelos (GILLIS *et al.*, 1989), e por isso, foi feita a predição de que o mutante tivesse um defeito em comportamentos dependentes de flagelo, como a motilidade.

Foram realizados dois tipos de ensaio de motilidade, um em placa, e um outro com o sistema de “tubo de vidro em meio semi-sólido” (veja materiais e métodos, ítem 3.7.1). Quando as bactérias foram colocadas em capilares de vidro, colocados verticalmente em meio de cultura LGI-P semi-sólido, a estirpe PAL5 foi capaz de formar uma película na superfície do meio de cultura fora do capilar após a incubação por 5 dias (Figura 15). O mutante C12 não foi capaz de formar a película; porém, apresentou crescimento dentro dos capilares, mostrando que o crescimento não foi prejudicado (Figura 15 a). Foi observado que, em placas de Petri com agar de motilidade (0,25% agar), a estirpe selvagem PAL5 apresentou motilidade, sendo que o diâmetro da colônia da bactéria aumentou consideravelmente mais rápido. Esta expansão foi maior do que poderia ser explicado apenas pelo crescimento (Figura 15 b, d). Vale mencionar que as colônias expandidas de PAL5 formadas por meio de motilidade, apresentam uma consistência de um filme fino, que quebra em fragmentos quando uma força mecânica é aplicada, indicando a existência de um grau de organização dentro da colônia.

```

MTFHVASVCAATLRSATVITSNVRLSDLFADLEPGEDRVI GPAPAPGASIHVGGQLIA
IADQFGVDWIDQSPSALATITRAGRLLDKEFFVEFVRRSLSDGGTDPLSVDLVDFHPLMV
APDDPKPVTMSDVSWDQRSGRFSATIYRTHPTGDVTQDSFMLTGTVHAAQRVLV FARALS
ADTVLSSSDVRVDDAYVGRLSDGVMTDAGGIEGMLMHNVVAGQPVLDRDLHRSVVMHKG
NPILIAFTVPGIHLAATGRALEDGGDQYVHALNVGSGMIVTGRVTSASEIQVDSRSTAV
PSNSNALRLLTASARPNTAESSFR

```

Figura 14: Sequência de poplipeptídeos do homólogo FlgA da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*. O peptídeo sinal encontrado com análise SMART está em vermelho.

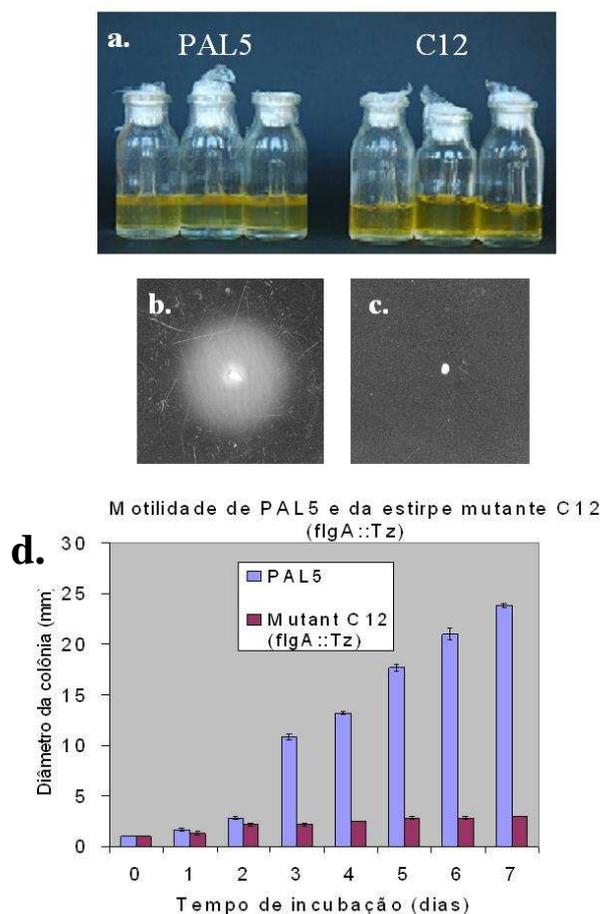


Figura 15: O mutante C12 (*flgA::EZ::Tn5*) tem um fenótipo não móvel. O mutante C12 e a estirpe PAL5 selvagem foram submetidos a testes de estabilidade. **a.)** No ensaio de “tubo de vidro em meio semi-sólido” a PAL5 inoculada dentro do capilar conseguiu colonizar e formar uma película no meio de cultura fora do capilar, enquanto o mutante C12 perdeu esta capacidade. Em placas com agar de motilidade, a colônia de PAL5 selvagem se moveu lateralmente por meio de motilidade dependente de flagelo (**b.**), enquanto que o mutante C12 não apresentou nenhuma motilidade (**c.**). **d.)** A expansão de colônias foi diariamente avaliada durante 7 dias. Os erros padrão das médias de 3 repetições está representado por barras.

Quando PAL5 foi comparada com o mutante C12 (*flgA::EZ::Tn5*), o último não demonstrou nenhuma expansão lateral (Figura 15 c, d). Estes dados indicaram fortemente que, de fato, o mutante C12 teve um defeito flagelar. Era esperado que o mutante apresentasse um defeito estrutural do flagelo, uma vez que a proteína FlgA é uma proteína envolvida na fase inicial da síntese do flagelo.

A fim de avaliar a presença ou ausência de flagelos normais no mutante C12, uma estratégia de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foi estabelecida. MET com células obtidas de placas de motilidade mostrou que a estirpe selvagem PAL5 apresentava vários flagelos peritríquicos (Figura 16 a). Ao contrário, não foram observados flagelos na superfície das células do mutante C12, indicando que, de fato, o gene homólogo de *flgA* de PAL5 tem um papel importante na formação do flagelo (Figura 16 b).

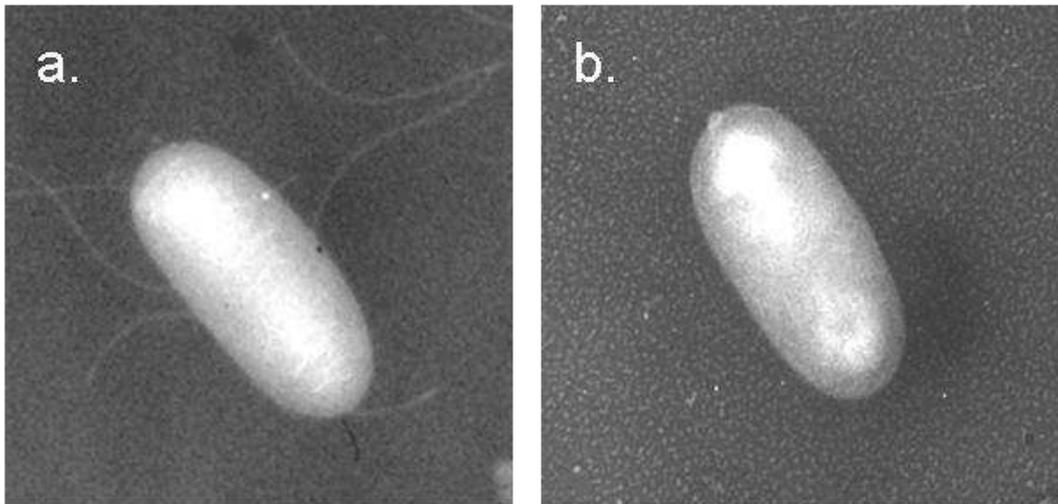
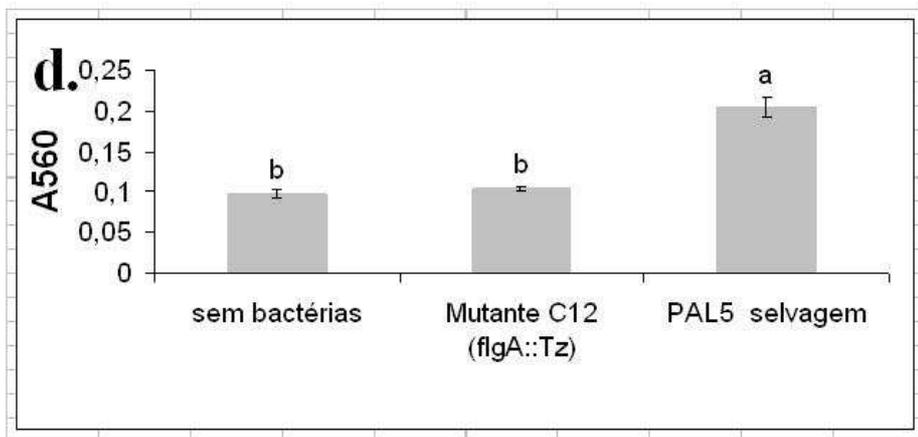
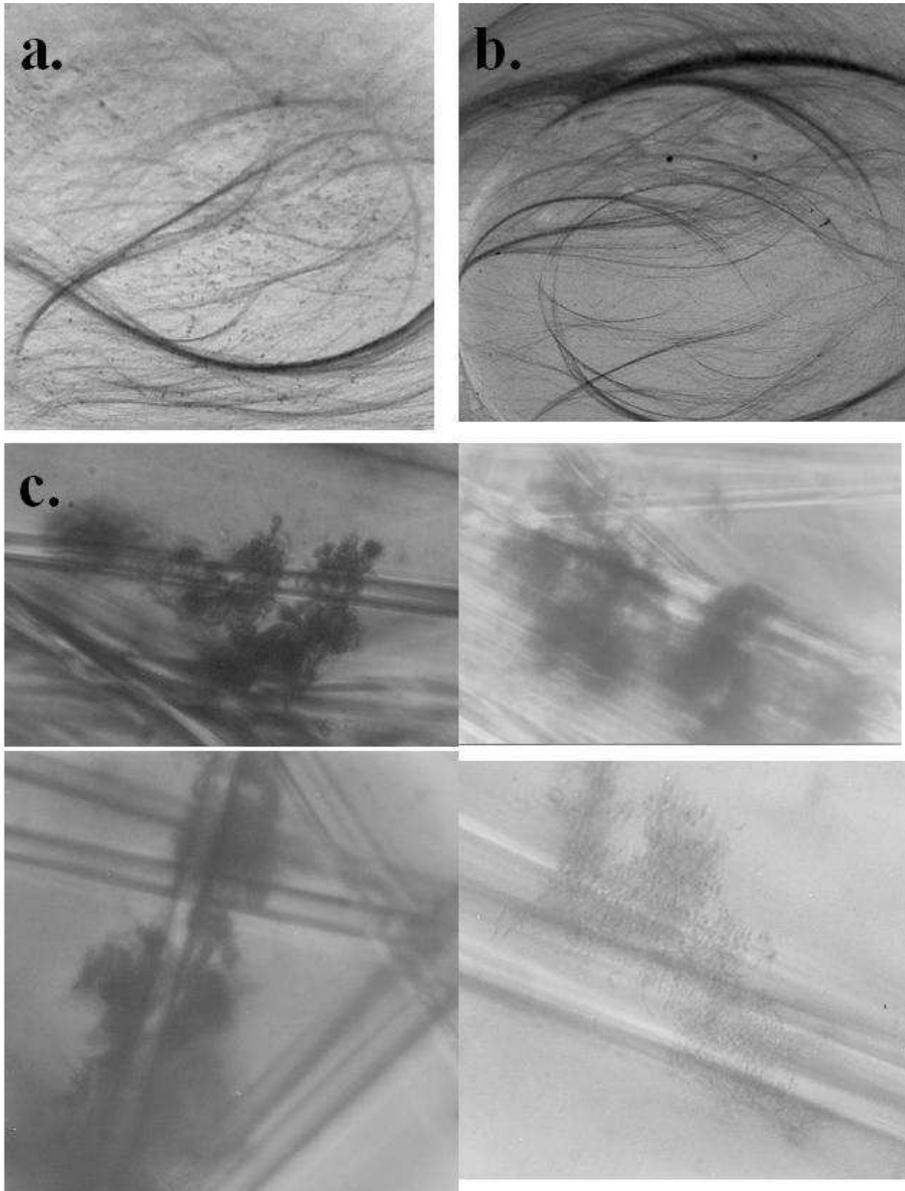


Figura 16: O mutante C12 (*flgA::EZ::Tn5*) não apresenta flagelo na sua superfície. Bactérias foram retiradas de placas de motilidade e depositadas em grades para microscopia eletrônica de transmissão (MET) usando a metodologia de VIDEIRA *et al.*(2003). **a.** e **b.** mostram células típicas observadas para a estirpe selvagem PAL5 e o mutante C12, respectivamente.

Flagelos têm um papel na formação de biofilmes (PRATT & KOLTER, 1998; O'TOOLE & KOLTER, 1998). Portanto, foram realizados experimentos com o objetivo de investigar se a estirpe selvagem PAL5 tinha a capacidade de formar biofilmes e de comparar esta capacidade com a do mutante C12. Quando PAL5 foi cultivado em frascos Erlenmeyer com meio LGI líquido, foi observado um anel de bactérias aderidas ao vidro na interface entre o líquido e o ar, após 24 horas de crescimento. Este anel também foi observado para o mutante C12 (dados não mostrados). Várias tentativas foram realizadas para viabilizar a formação de biofilmes em superfícies de placas de 96 poços de polistireno e de polipropileno; porém, sem sucesso.

O uso da lã de vidro como substrato para formação de biofilmes foi relatado (OOSTHUIZEN *et al.*, 2001). Aqui, ensaios de formação de biofilme em meio de cultura LGI-gluc líquido mostrou a formação de agregados de células de PAL5 aderidos à lã de vidro, após 48 h de crescimento (Figura 17 a). Estes agregados não foram observados com o mutante C12 crescido nas mesmas condições (Figura 17 b).

Para quantificar a capacidade de formação de biofilme de PAL5 em comparação com o mutante C12, células aderidas à lã de vidro foram coloridas com cristal violeta. Os biofilmes coloridos da estirpe PAL5 foram investigados usando um microscópio ótico e fotografados (Figura 17 c). O corante cristal violeta foi extraído dos biofilmes formados na lã de vidro com etanol e quantificado por espectrofotometria. A estirpe PAL5 mostrou a capacidade para formar biofilme e a diferença foi estatisticamente significativa em relação a estirpe mutante C12 (teste de Tukey, $P < 0,05$). O controle negativo não inoculado foi igual ao mutante C12, sugerindo que o mutante perdeu a capacidade de formar biofilme em lã de vidro (Figura 17 d).



Continua...

Figura 17: O mutante C12 (*flgA::EZ::Tn5*) apresentou um defeito na capacidade de formar biofilmes em lã de vidro. Células da estirpe selvagem PAL5 e do mutante C12 foram cultivadas em frascos Erlenmeyer com meio de cultura líquido, na presença de lã de vidro. Após 3 dias de crescimento, a formação de aglomerados de células junto à lã de vidro foi claramente visível para PAL5 selvagem (**a**), mas não para o mutante C12 (**b**). Biofilmes em lã de vidro foram coloridos com cristal violeta (1%) e estudados por microscopia ótica: 4 fotos de biofilmes da estirpe PAL5 estão representadas (**c**), enquanto biofilmes para o mutante C12 não foram observados (não demonstrado). Para quantificar a formação de biofilme, o corante cristal violeta foi extraído de biofilmes com etanol absoluto e a absorbância foi determinada a 560 nm (**d**). Foram avaliados a estirpe selvagem PAL5, o mutante C12 e um controle não inoculado. Os resultados mostram a média de 4 repetições dos tratamentos e o erro padrão da média. As letras a e b no gráfico representam a diferença estatística determinada pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

4.1.7. Estabilidade genética do mutante C12 *in vivo*

Um experimento de inoculação de plantas propagadas e enraizadas *in vitro* foi realizado com o intuito de avaliar a capacidade de alguns mutantes de infectar, e de se manter dentro de plantas de cana-de-açúcar, em comparação com a estirpe selvagem PAL5. Plantas de cana-de-açúcar (genótipo SP70-1143) foram inoculadas com o mutante C12 (*flgA::EZ::Tn5*) e mantidas em condições de aclimatização na casa de vegetação de biossegurança durante seis semanas, conforme descrito em materiais e métodos. Após este período, foi realizada a coleta do experimento para o reisolamento de *G. diazotrophicus* de tecido de colmo. Após o plaqueamento do extrato de colmo em semi-seletivas (LGI-P, sem antibiótico seletivo), uma variedade de colônias bacterianas e alguns fungos puderam ser observados. Avaliação visual das placas possibilitou a identificação de 19 colônias como sendo da espécie *G. diazotrophicus*. A identidade foi confirmada por meio da técnica de PCR de colônia com primers AD e 1440, específicos para DNA ribossomal 23S de *G. diazotrophicus* (KIRCHHOF *et al.*, 1998) (dados não mostrados). Estas 19 colônias também cresceram bem em placas com meio de cultura Dygs sólido com canamicina, indicando a presença do gene de resistência ao antibiótico, codificado no elemento *EZ::Tn5*. Quando estas colônias foram transferidas para uma placa com meio de cultura LGI-P e comparadas com colônias de PAL5 na mesma placa, todas eram idênticas fenotipicamente (dados não mostrados).

Com o intuito de mostrar, a nível molecular, a presença do elemento *EZ::Tn5* no sítio original, foi realizado o PCR com 5 das 19 colônias como molde e com primers flanqueando o gene *flgA*. Foram observados produtos de amplificação tanto na estirpe selvagem PAL5 como no mutante C12 usados como controles positivos; porém, a banda observada para o mutante C12 foi maior, devido à inserção do elemento *EZ::Tn5* (Figura 18 a). O PCR realizado com 5 colônias reisoladas das plantas produziu bandas do mesmo tamanho da banda observada para o PCR com DNA extraído da colônia do mutante C12 usado no experimento de inoculação. Portanto, todos os mutantes de *G. diazotrophicus* reisolados e testados mantiveram a inserção do elemento *EZ::Tn5* no sítio original de inserção.

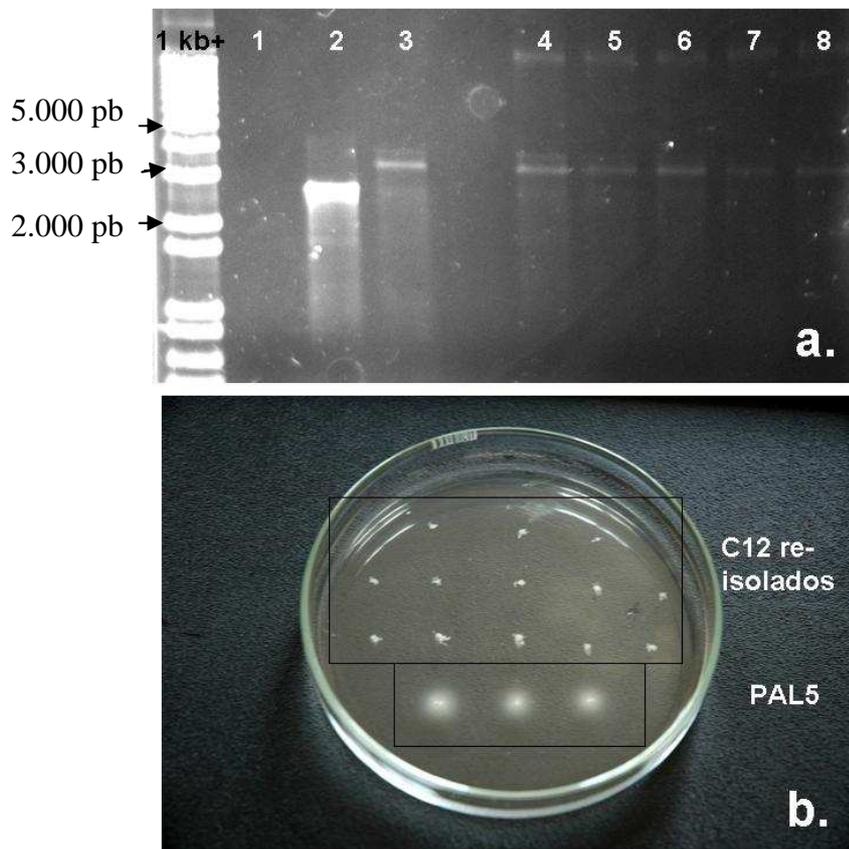


Figura 18: Análise molecular e fenotípica do mutante C12 reisolado de plantas de cana-de-açúcar. Plantas de cana-de-açúcar inoculadas *in vitro* com o mutante C12 foram mantidas durante 6 semanas em casa de vegetação e após este período, *G. diazotrophicus* foi reisolada. **a.)** 5 dos 19 isolados de *G. diazotrophicus* obtidos das plantas (linhas 4-8) foram submetidos a PCR de colônia com primers flgA-left e flgA-right, flanqueando o sítio de inserção do elemento EZ::Tn5. Linha 1: controle negativo (sem DNA ou material de colônia); linha 2: DNA de PAL5 selvagem; linha 3: DNA do mutante C12. **b.)** 13 dos 19 isolados foram inoculados com ponteira de plástico em placas com agar de motilidade. Como controle positivo, 3 inoculações com a estirpe PAL5 selvagem foram incluídas. A avaliação ocorreu após 2 dias de incubação, a 30°C.

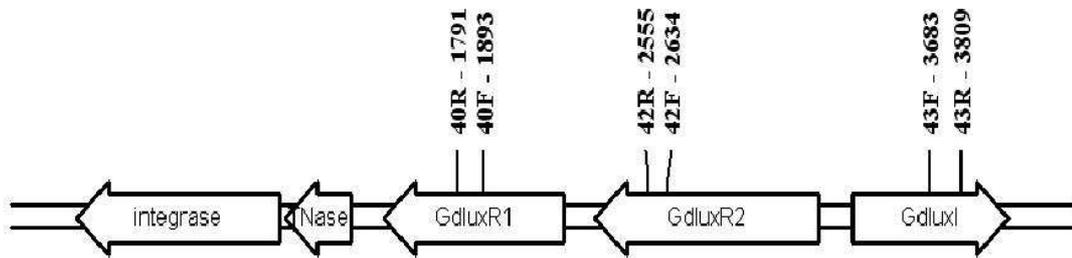
Também foi avaliado se os mutantes reisolados das plantas mantiveram o fenótipo não móvel, típico do mutante C12. Para isso, 13 dos 19 mutantes reisolados foram inoculados em placa com agar de motilidade. Conforme esperado, todos estes mutantes tiveram um fenótipo não móvel após 2 dias de incubação (Figura 18 b). A estirpe PAL5 selvagem, usada como controle positivo, mostrou o fenótipo móvel conforme esperado (Figura 18 b).

4.2. Mutagênese de um possível sistema de *quorum sensing* na estirpe PAL5 de *G.diazotrophicus*

4.2.1. Identificação de genes de *quorum sensing* no genoma de *G. diazotrophicus* PAL5

Para uma variedade de bactérias que colonizam plantas, o fenômeno de *quorum sensing* está envolvido na interação com a planta hospedeira. Por isso, foi avaliada a possível presença de genes envolvidos em *quorum sensing* no genoma de PAL5, usando técnicas de bioinformática. Análise BLASTP (comparação de uma sequência *query* (aminoácidos) com um banco de dados de sequências de aminoácidos), usando membros conhecidos da família protéica LuxI que tem um papel conhecido em *quorum sensing*, levou a identificação de um único homólogo no genoma de PAL5, que foi nomeado de *GdluxI* (Figura 19). O produto gênico de *GdluxI* tem 209 aminoácidos, contém um domínio conservado LasI (síntese de autoindutor) (Figura 19 b) e é similar à proteína RaiI (número de acesso O54451) (211 aminoácidos) de *Rhizobium etli*. Análise BLASTP mostrou um valor $E = 2 \times e^{-20}$, 35% de identidade de aminoácidos (63 resíduos idênticos/176 resíduos alinhados) e 47% de similaridade (83 resíduos similares/176 resíduos alinhados). A análise da região gênica que flanqueia o gene putativo *GdluxI* mostrou a presença de 2 genes homólogos do tipo *luxR*, que codificam reguladores transcricionais, também envolvidos em *quorum sensing* (Figura 19).

a.



Região genes lux 4258 bp

b.

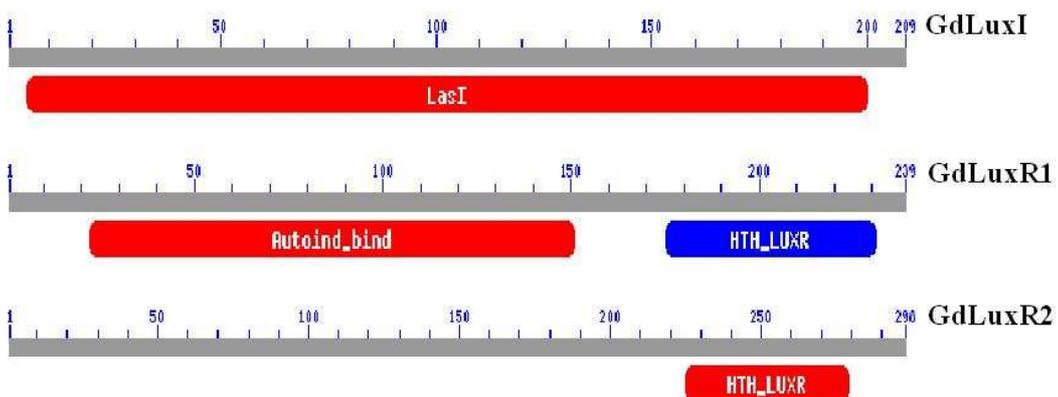


Figura 19: Representação gráfica de possíveis genes de *quorum sensing* no genoma da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*. **a.)** Representação gráfica da organização dos possíveis genes de *quorum sensing*, designados como *GdluxI*, *GdluxR1* e *GdluxR2*. Sítios de anelamento de primers usados neste estudo estão indicados (40F/R, 42F/R, 43F/R). **b.)** Representação dos domínios proteicos conservados encontrados nas sequências de aminoácidos deduzidas para os genes *GdluxI*, *GdluxR1* e *GdluxR2*. Similaridades foram determinadas usando a ferramenta BLASTP no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Estes homólogos foram nomeados de *GdluxR1* e *GdluxR2*. *GdluxR1* codifica um produto de 298 aminoácidos e apresenta os 2 domínios típicos para reguladores transcricionais do tipo LuxR, apresentando na parte N-terminal o domínio de ligação de autoindutor, que é responsável pela ligação de moléculas de substâncias autoindutoras produzidas pelas proteínas LuxI, e, na parte C-terminal, o domínio HTH-LUXR que permite a interação da proteína com promotores de genes alvos. O produto gênico de *GdluxR1* é similar com a proteína BisR (número de acesso AAO21111) (246 aminoácidos) de *R. leguminosarum*. A análise BLASTP mostrou um valor $E = 1 \times 10^{-19}$, 33% de identidade de aminoácidos (66 resíduos idênticos/198 resíduos alinhados) e 50% de similaridade (99 resíduos similares/198 resíduos alinhados).

4.2.2. Produção de moléculas autoindutoras não foi detectada em bioensaios

A presença dos genes *GdluxR1*, *GdluxR2* e *GdluxI* no genoma da estirpe PAL5 levou ao questionamento se estes genes estariam envolvidos em *quorum sensing*. O *quorum sensing* do tipo LuxI/LuxR depende de moléculas sinalizadoras, chamadas de autoindutoras (HLAs), que, em muitos casos, podem ser detectados através do uso de organismos repórteres como a estirpe NT1 de *A. tumefaciens* (PIPER *et al.*, 1993). Com o intuito de avaliar a produção destas moléculas pela estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* foram realizados bioensaios usando-se a estirpe NT1 de *A. tumefaciens* como organismo repórter. Porém, pedaços de agar de culturas da estirpe PAL5 crescida em meio de cultura Dygs e LGI-P sólido e colocados em placas contendo o organismo repórter não induziram a expressão do gene repórter *lacZ* na estirpe repórter NT1. Um isolado de *Pseudomonas*, que serviu como um controle positivo induziu a expressão de *lacZ*, conforme esperado (dados não mostrados).

4.2.3. Os genes putativos *GdluxI*, *GdluxR1* e *GdluxR2* são expressos durante o crescimento

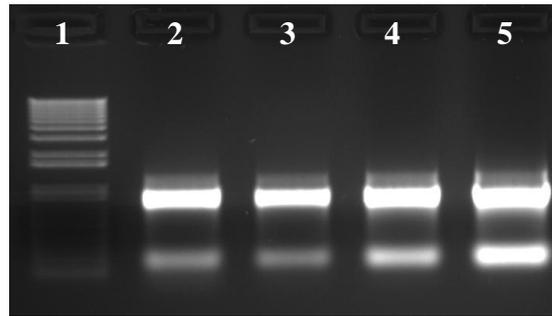
Com o objetivo de verificar se os genes putativos *GdluxI*, *GdluxR1* e *GdluxR2* são expressos, foram realizados experimentos de PCR de transcrição reversa (RT-PCR). O RNA total foi isolado de células da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*, em 4 diferentes fases de crescimento em meio de cultura líquido, e PCR-RT foi realizado com RNA de bactérias de 3 fases sendo: a fase lag inicial ($D.O._{(600)} = 0,042$), a fase logarítmica inicial ($D.O._{(600)} = 0,075$) e a fase logarítmica ($D.O._{(600)} = 0,29$). O cDNA foi gerado com os primers 43R, 40R e 42R, que correspondem aos genes *GdluxI*, *GdluxR1* e *GdluxR2*, respectivamente (Figura 19 a). O

cDNA obtido foi submetido a PCR com os pares de primers 43F/R, 40F/R e 42F/R (Figura 19 a), com o objetivo de verificar a expressão dos genes *GdluxI*, *GdluxR1* e *GdluxR2*.

A Figura 20 mostra os geis de agarose com o RNA extraído e os produtos de PCR-RT obtidos. Os resultados mostraram que o RNA foi de boa qualidade, pela presença de bandas nítidas de RNA ribossomal (Figura 20 a). A amplificação por PCR ocorreu para todos os genes, como pode ser confirmado pela presença de bandas para todos os pares de primers (Figura 20 b). Adicionalmente, a amplificação ocorreu em todas as fases de crescimento avaliadas. As reações de PCR realizadas com o par de primers 40F/R e o RNA da extração sem a etapa da transcrição reversa não mostraram produtos de PCR, confirmando assim que não havia DNA genômico na preparação do RNA que pudesse servir como molde para a amplificação e; portanto, confirmando que os produtos observados foram amplificados a partir de cDNA. Com base nos resultados pode-se concluir que os genes putativos *GdluxI*, *GdluxR1* e *GdluxR2* são expressos e sugerem que os mesmos sejam genes funcionais.

Sistemas de *quorum sensing* do tipo LuxI/LuxR é dependente da produção de moléculas autoindutoras, que são sinalizadoras centrais deste tipo de *quorum sensing*. Os genes responsáveis pela síntese destas moléculas são os genes do tipo *luxI*. A produção destas moléculas não pôde ser demonstrada no presente estudo, conforme apresentado anteriormente. Vale mencionar que é possível que a especificidade do organismo repórter NT1 de *A. tumefaciens* não tenha possibilitado a detecção de moléculas da família dos HLAs produzidas por *G. diazotrophicus*. Portanto, não é possível afirmar com certeza que este tipo de molécula não é sintetizado.

a)



b)

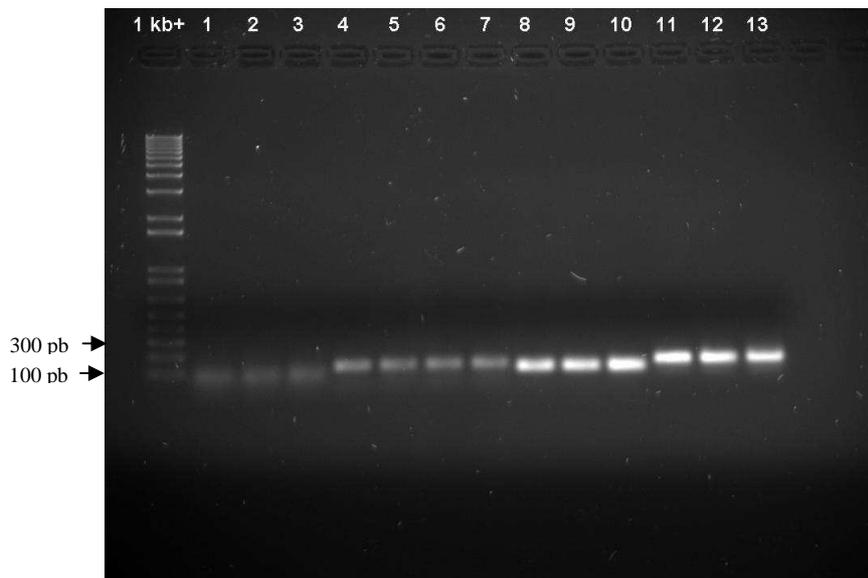


Figura 20: PCR de transcrição reversa mostra que os genes *GdluxI*, *GdluxR1* e *GdluxR2* são transcritos. a) Gel de agarose mostrando RNA total, isolado da estirpe PAL5 cultivado até $D.O._{(600)} = 0,042$ (linha 2), $D.O._{(600)} = 0,075$ (linha 3), $D.O._{(600)} = 0,129$ (linha 4), $D.O._{(600)} = 0,29$ (linha 5). Linha 1: *1 Kb plus DNA ladder*. b) RNA, isolado de PAL5 em 3 diferentes fases (fase lag inicial ($D.O._{(600)} = 0,042$), fase logarítmica inicial ($D.O._{(600)} = 0,075$) e fase logarítmica ($D.O._{(600)} = 0,29$)) foi submetido a transcrição reversa com os primers 40R (*GdluxR1*), 42R (*GdluxR2*) e 43R (*GdluxI*) seguida por PCR com pares de primers 40F/R (*GdluxR1*) (linhas 5-7), 42F/R (*GdluxR2*) (linhas 8-10) e 43F/R (*GdluxI*) (linhas 11-13). Como controle positivo foi realizada uma reação de PCR com DNA de PAL5 com primers 40F/R (linha 4). Como controle negativo, reações de PCR foram realizadas com primers 40F/R, mas com RNA das 3 fases de crescimento como molde (sem a etapa de síntese de cDNA) (linhas 1, 2 e 3).

4.2.4. Mutagênese insercional sítio-dirigida de *GdluxI*

Com o intuito de determinar uma possível função dos genes de *quorum sensing* encontrados, independente de bioensaios, foi determinada uma estratégia de mutagênese do gene putativo *GdluxI* na estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*. Definiu-se o uso do sistema comercial *EZ::Tn5TM <kan-2> transposon insertion kit* (Epicentre), que possibilita a geração de inserções de um elemento de transposição em DNA alvo *in vitro*. Conforme descrito em materiais e métodos (ítem 3.4.4.), foi identificado o plasmídeo pB1, que contém o gene putativo *GdluxI* (Figura 2). O plasmídeo pB1 foi mutagenisado usando o *EZ::Tn5TM <kan-2> transposon insertion kit* (Figura 2). O plasmídeo pB1 mutagenisado foi transferido para *E. coli* DH10B. Foram identificados 41 transformantes resistentes ao antibiótico canamicina, indicando a presença do marcador de seleção do elemento de transposição. Uma etapa de seleção adicional com ampicilina mostrou perda de resistência a este antibiótico em 9 transformantes, indicando que a inserção do elemento de transposição provavelmente ocorreu no gene marcador de resistência ao antibiótico ampicilina, codificado no plasmídeo pB1. Os plasmídeos mutantes derivados de pB1 dos demais 32 transformantes foram submetidos à análise de restrição com a enzima *EcoRV*. Em 7 plasmídeos, a inserção do elemento de transposição ocorreu na região de *GdluxI* como foi deduzido do padrão de restrição com enzima *EcoRV* (Figura 2 e 21 a). O sequenciamento destes plasmídeos levou à identificação de 1 plasmídeo, derivado de pB1 onde a inserção ocorreu dentro do gene putativo *GdluxI* (Figura 21 b). Concluiu-se que, neste plasmídeo, a inserção do elemento de transposição ocorreu na terminação 5' do gene. Este plasmídeo foi nomeado de pB1TN17 e usado para a mutagênese da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*.

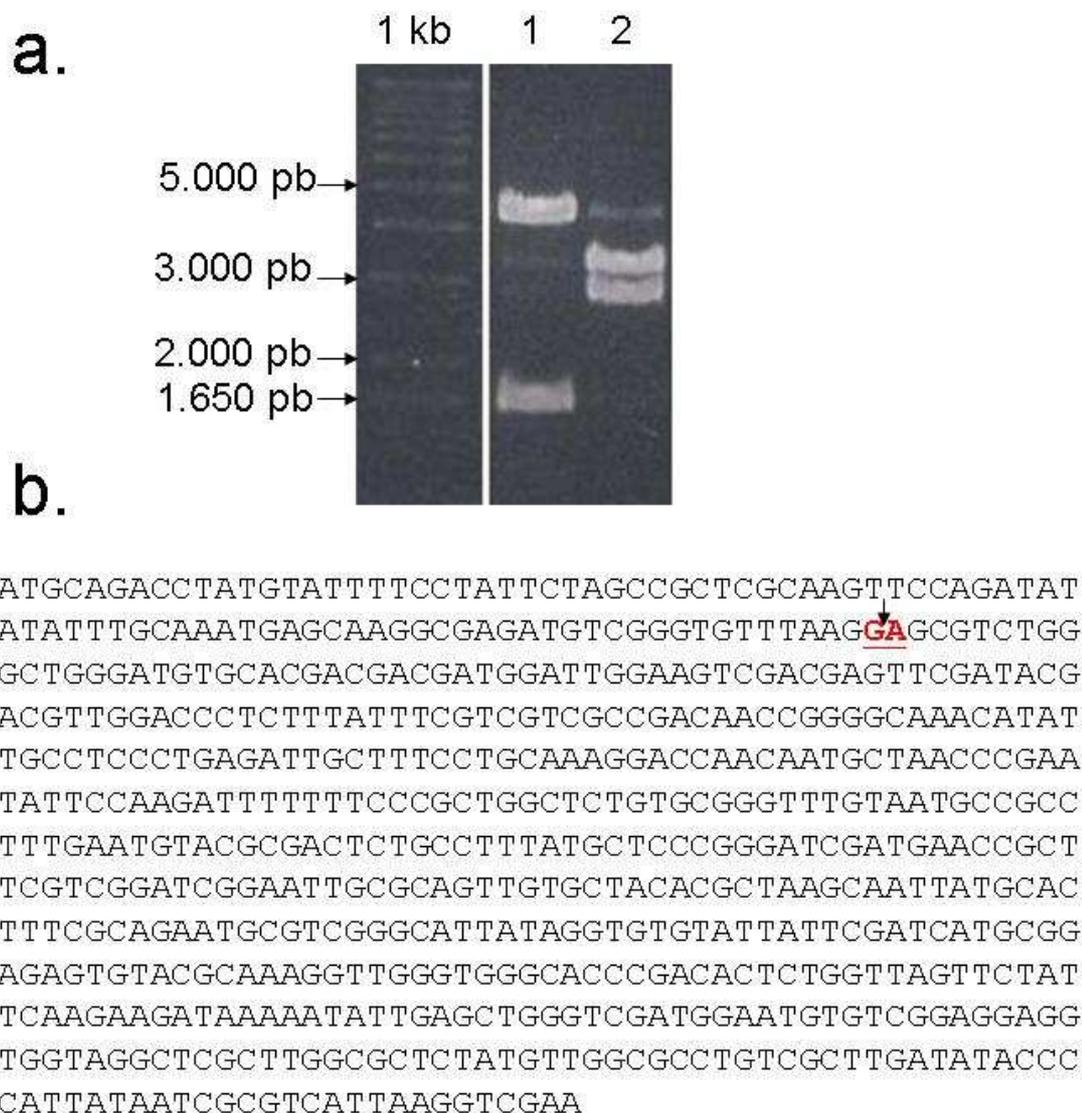


Figura 21: Seleção do plasmídeo pB1TN17 com uma inserção do elemento EZ::Tn5 dentro do gene *GdluxI*. a.) Padrão de restrição com enzima *EcoRV* desejado (linha 2) e não desejado (linha 1). b.) Sequenciamento dos 7 plasmídeos com o padrão de restrição desejado possibilitou a identificação de um plasmídeo com a inserção do elemento EZ::Tn5 dentro da ORF de *GdluxI*. O sítio de inserção ocorreu entre a bases indicadas em vermelho.

A *G. diazotrophicus* não consegue manter plasmídeos derivados de pUC18 como unidade de replicação autônoma, porque estes plasmídeos possuem uma origem de replicação (*rep* do replicon pMB1) que não é reconhecida por esta bactéria. Por isso, o DNA fornecido neste plasmídeo só pode ser mantido em *G. diazotrophicus* se o mesmo se integrar em uma unidade de replicação (o cromossomo, por exemplo) do hospedeiro. Por causa desta característica, derivados do plasmídeo pUC18 como, por exemplo, o plasmídeo pB1TN17, podem ser usados como plasmídeo suicida para *G. diazotrophicus*.

Com o objetivo de gerar mutantes sítio-dirigidos no gene putativo *GdluxI*, a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* foi transformada com o plasmídeo mutante pB1TN17. Após a incubação, foram observadas 32 colônias de *G. diazotrophicus* na presença do antibiótico canamicina, indicando que ocorreram a recombinação e a consequente integração do elemento EZ::Tn5 no genoma de PAL5 (a resistência ao antibiótico canamicina está codificada no elemento EZ::Tn5, Figura 22).

A integração por meio de recombinação homóloga do plasmídeo pB1TN17 no genoma pode ocorrer por meio de recombinação simples ou, do inglês, *single crossing-over*. Neste caso, o plasmídeo inteiro é integrado no genoma, gerando uma cópia mutante e uma cópia selvagem do gene *GdluxI*. Portanto, a ocorrência de recombinação simples não é desejável já que pode deixar uma cópia intacta do gene. No caso de recombinação dupla ou, do inglês, *double crossing-over*, o gene selvagem é substituído pela versão mutante (*GdluxI::TN*), sendo esta a situação desejada (Figura 22). A recombinação dupla é caracterizada por não permitir a integração do plasmídeo vetor no genoma. Com o objetivo de verificar se ocorreu a recombinação simples ou dupla, os 32 transformantes foram selecionados em meio de cultura contendo o antibiótico ampicilina (cujo marcador de resistência está codificado no plasmídeo vetor pUC18). Os resultados mostraram que 29 transformantes apresentaram resistência a ambos os antibióticos ampicilina e canamicina. Três transformantes apresentaram resistência ao antibiótico canamicina, mas mantiveram-se sensíveis a ampicilina, indicando que ocorreu recombinação dupla nestes três transformantes.

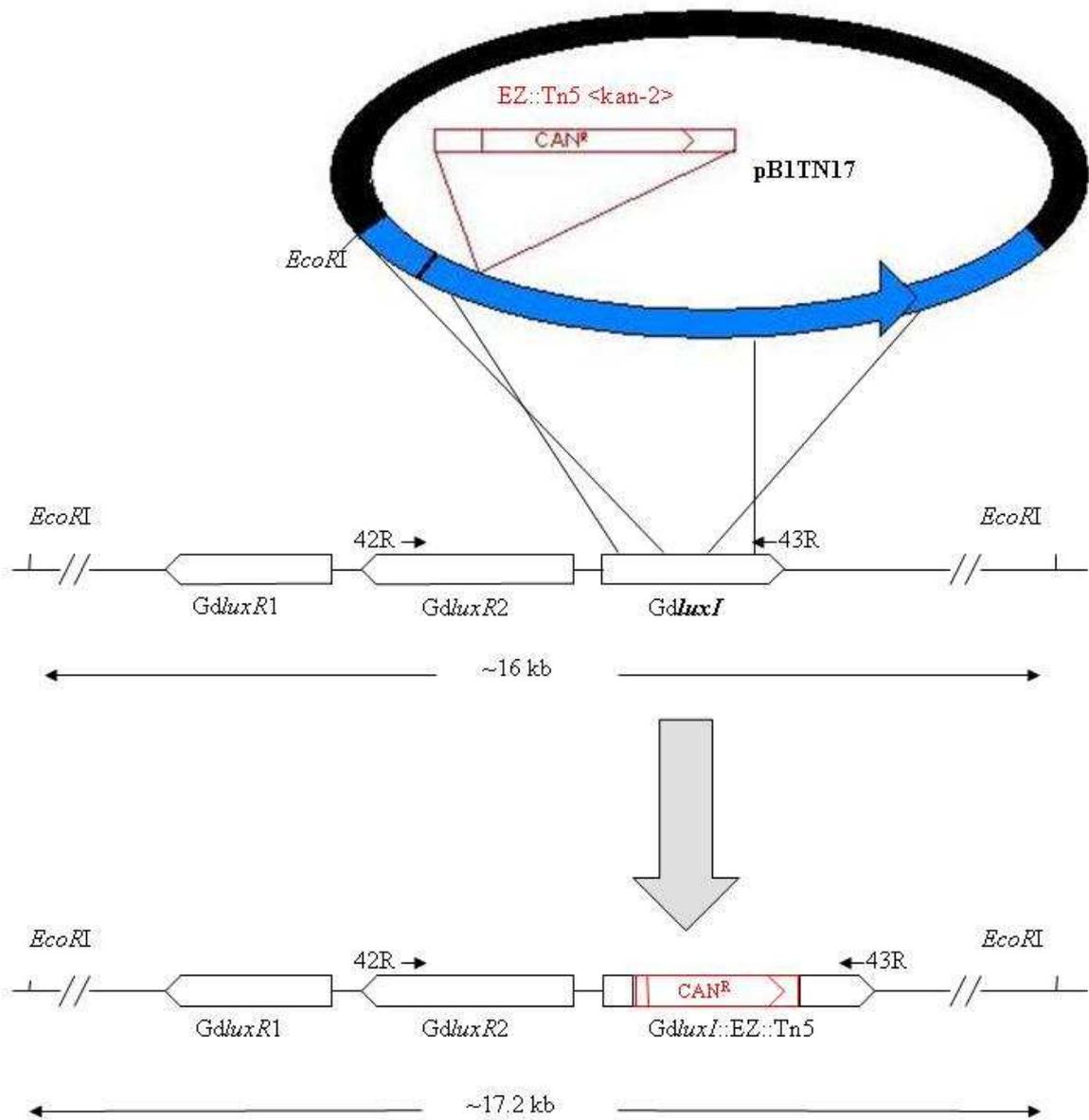


Figura 22: Representação gráfica da recombinação dupla desejada para a mutagênese de *GdluxI* usando o plasmídeo mutagênico pBITN17. A Figura mostra como a recombinação dupla entre o DNA genômico e o plasmídeo pBITN17 provoca a troca do locus original pelo locus mutante (*GdluxI::EZ::Tn5*). Os sítios da enzima de restrição *EcoRI*, usada no experimento de *Southern blot*, como também os sítios de anelamento dos primers 42R e 43R usados no experimentos de PCR estão indicados.

4.2.5. A análise *Southern blot* indica que ocorreu recombinação dupla para três mutantes

Para verificar, a nível molecular, o sucesso da troca do gene selvagem *GdluxI* pelo gene mutante *GdluxI::EZ::Tn5*, experimentos de *Southern blot* foram realizados. DNA total foi isolado de 6 mutantes, dos quais três (mut17-1, mut17-4 e mut17-5) apresentaram resistência apenas ao antibiótico canamicina, enquanto outros três escolhidos (17-2, 17-3 e 17-6) apresentaram resistência aos antibióticos canamicina e ampicilina. O DNA total foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e usado em experimentos de *Southern blot* com um fragmento do elemento de transposição como uma sonda (sonda PRTN, Figura 2).

A Figura 23 mostra a presença de uma banda para a estirpe selvagem PAL5, que representa o fragmento *EcoRI* de aproximadamente 16 Kb que contém o gene *GdluxI*. Nos mutantes mut17-1, mut17-4 e mut17-5, uma banda com peso molecular maior pode ser observada (Figura 23). O aumento do tamanho da banda pode ser explicado pela inserção do elemento de transposição dentro do fragmento *EcoRI* através da recombinação homóloga. O mecanismo de inserção foi o de recombinação dupla, uma vez que apenas uma única banda estava presente. A inserção por meio da recombinação simples causaria a integração total do plasmídeo pBITN17. Considerando que o plasmídeo pBITN17 apresenta um sítio de *EcoRI*, a inserção via este mecanismo promoveria a formação de duas bandas no *Southern blot*. De fato, este padrão pôde ser observado para os mutantes mut 17-2, mut17-3 e mut17-6; portanto, mostrando que a inserção ocorreu por meio de recombinação simples. Este dado está de acordo com o padrão de resistência aos antibióticos canamicina e ampicilina descrito anteriormente.

4.2.6. Confirmação do sucesso da mutagênese por meio de PCR

Experimentos de *Southern blot* requerem procedimentos complexos e demorados que, muitas vezes, exigem o uso de sondas marcadas radioativamente. Com o intuito de desenvolver um método mais seguro e mais rápido para a avaliação do sucesso da mutagênese, foi realizada a análise de PCR com primers flanqueando o gene *GdluxI*. A Figura 24 mostra um gel de agarose com produtos de PCR obtidos com primers 42R e 43R usando-se o DNA da estirpe PAL5 e dos mutantes mut17-1, mut17-2, mut17-3 e mut17-4.

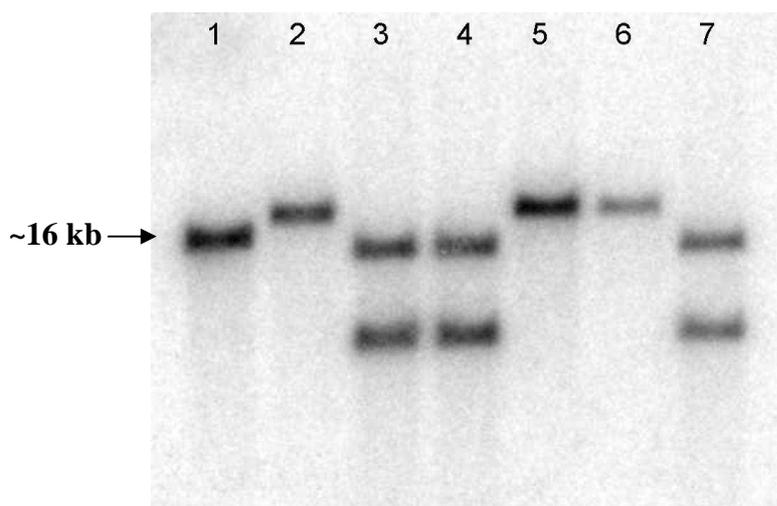


Figura 23: Southern blot de mutantes putativos de *GdluxI*. DNA total de mutantes mut17-1, mut17-4 e mut17-5 (resistência ao antibiótico canamicina) e dos mutantes mut17-2, mut17-3 e mut17-6 (resistência aos antibióticos canamicina e ampicilina) foi digerido com *EcoRI* e submetido à análise *Southern blot* com a sonda PRLUXI. Linha 1: PAL5 selvagem; linha 2-7: mut17-1, mut17-2, mut17-3, mut17-4, mut17-5 e mut17-6, respectivamente.

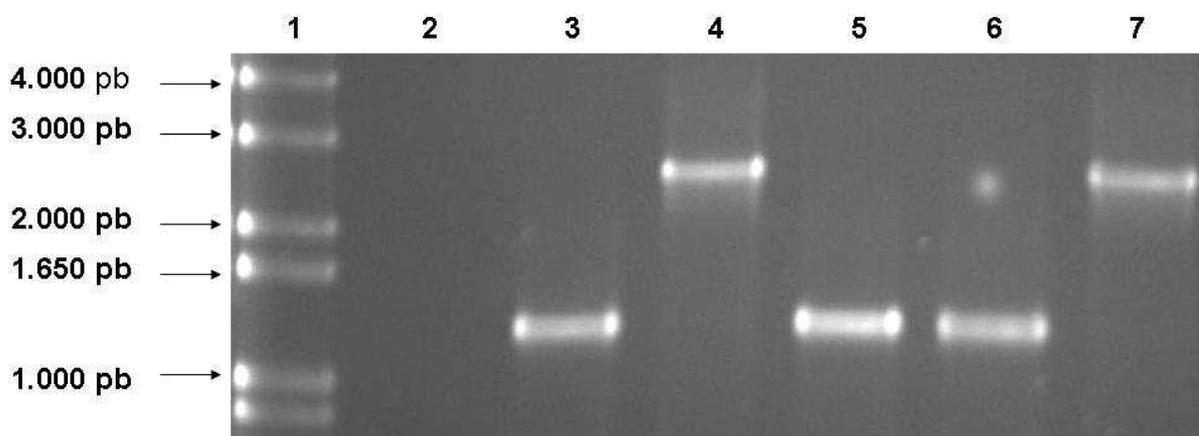


Figura 24: Confirmação do sucesso da mutagênese do gene *GdluxI* por PCR. DNA total dos mutantes mut17-1 (recombinação dupla), mut17-2 e mut17-3 (recombinação simples) e mut17-4 (recombinação dupla) (linhas 4-7, respectivamente) foi usado em reações de PCR com o par de primers 42R/43R (veja Figura 21). Como controle positivo, foi usado DNA da estirpe PAL5 selvagem (linha 3). O controle negativo foi uma reação de PCR sem DNA (linha 2). Linha 1: 1 Kb plus DNA ladder.

A estirpe selvagem PAL5, assim como os mutantes mut17-2 e mut17-3, apresentaram uma banda de aproximadamente 1250 pb, tamanho este esperado para o locus selvagem. Os mutantes mut17-1 e mut17-4, porém, apresentaram bandas de aproximadamente 2500 pb (Figura 24). O incremento no tamanho das bandas nestes mutantes pode ser explicado pela inserção do elemento de transposição no locus, confirmando o sucesso da mutagênese nos mutantes mut17-1 e mut17-4 e demonstrando a presença de uma cópia intacta do gene *GdluxI* nos mutantes mut17-2 e mut17-3.

4.2.7. A mutação do gene *GdluxI* não altera a morfologia das colônias de *G. diazotrophicus*.

A avaliação fenotípica, *in vitro*, dos mutantes no gene *GdluxI* e dos mutantes com uma cópia intacta deste gene mostrou que os mesmos formaram películas normais em meio LGI-P semi-sólido sem fonte de nitrogênio, indicando que a fixação de nitrogênio e a capacidade de formar película não foram afetadas pela mutação do gene *GdluxI*. Colônias dos mutantes mut17-2 e mut17-3 (que contém uma cópia intacta do gene *GdluxI*) e dos mutantes mut17-1 e mut17-4 (só com cópia mutante do gene), não puderam ser distinguidas, do ponto de vista morfológico, em meio de cultura sólido Dygs, LGI, LGI-P e Batata-P (Figura 25). Os mutantes também mantiveram-se móveis em placas com agar de motilidade (dados não mostrados).

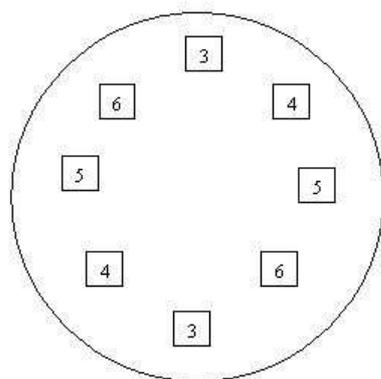
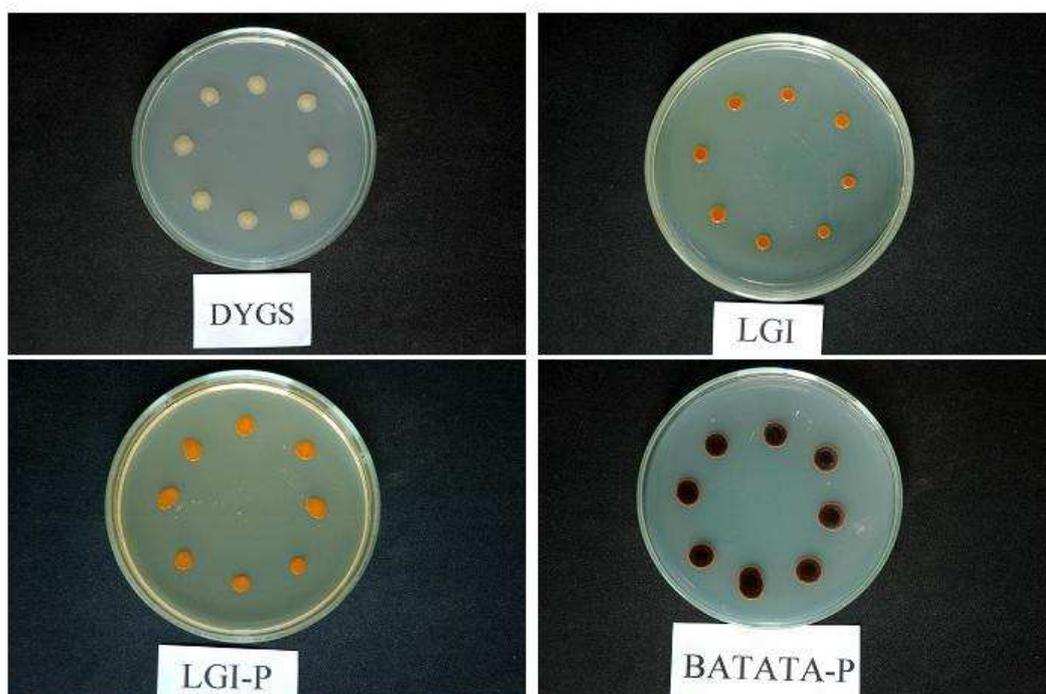


Figura 25: Morfologia de colônias de mutantes *GdluxI*. Dois mutantes, mut17-3 e mut17-6, gerados pelo mecanismo de recombinação simples (uma cópia intacta do gene *GdluxI* presente), e dois mutantes, mut17-4 e mut17-5, gerados pelo mecanismo de recombinação dupla (só *GdluxI* mutante presente), foram inoculados em diferentes meios de cultura (Dygs, LGI, LGI-P e Batata-P) e a morfologia das colônias foi avaliada. A organização nas placas está representada, onde 3, 4, 5 e 6 representam os mutantes mut17-3, mut17-4, mut17-5 e mut17-6, respectivamente.

4.2.8. Avaliação da capacidade de mutantes no gene *GdluxI* de colonizar e de promover o crescimento de plantas de cana-de-açúcar

Não foram observadas diferenças fenotípicas visíveis em experimentos *in vitro* entre os mutantes no gene *GdluxI* e mutantes contendo uma cópia intacta do gene. Para avaliar se a mutação do gene *GdluxI* teria alguma influência durante a interação de *G. diazotrophicus* com a planta, experimentos de inoculação foram realizados.

Foi instalado um experimento de inoculação de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade SP70-4311, com aproximadamente 10^5 células da estirpe PAL5 selvagem, o mutante mut17-6 (uma cópia do gene *GdluxI* intacta) e com os mutantes mut17-4 e mut17-5 (só uma cópia mutante de *GdluxI*). A análise para determinar a presença da bactéria nos tecidos vegetais, realizada cinco dias após a inoculação, permitiu o reisolamento das mesmas em todos estes tratamentos, até a diluição 10^{-7} . Como não foi realizada a contagem de bactérias até as diluições mais altas, é possível que a quantidade de *G. diazotrophicus* presente nas plantas não reflita a população correta. Mesmo assim, a quantidade de bactérias observadas permitiu estimar que o material vegetal avaliado continha, no mínimo, em torno de 10^7 bactérias por grama de material fresco. Por outro lado, não foi reisolada *G. diazotrophicus* de plantas micropropagadas (não inoculadas) usadas como controle. Aparentemente, os mutantes mut17-4 e mut17-5 com o gene *GdluxI* desativado, não tiveram nenhuma alteração na capacidade de colonizar as plantas de cana-de-açúcar.

Com o intuito de avaliar a influência das inoculações dos diferentes mutantes sobre o desenvolvimento vegetal, plantas adicionais do experimento de contagem foram transplantadas para bandejas de aclimatação em casa de vegetação e avaliadas durante 6 semanas. Dois experimentos de reisolamento foram realizados com as plantas inoculadas com a estirpe PAL5 selvagem, mut17-6 (cópia intacta de *GdluxI*), mut17-4 e mut17-5 (só cópia mutante de *GdluxI*). No primeiro experimento, extrações foram realizadas a partir de 0,1 g da base do colmo, enquanto o segundo experimento foi realizado com 1 g de raiz. A contagem foi realizada em placas com meio de cultura LGI-P com fonte de nitrogênio. No primeiro experimento de contagem não foi detectada a presença de *G. diazotrophicus*. No segundo experimento, baseado em 1 g de raiz mais colmo, foram encontradas colônias esporádicas, e a quantidade de bactérias foi independente da estirpe inoculada.

Um problema nos experimentos de contagem de *G. diazotrophicus* nas plantas da casa de vegetação foi o aparecimento de múltiplas espécies de microorganismos contaminantes, que, às vezes, foram fenotipicamente parecidos com *G. diazotrophicus* na sua aparência

quando crescidas em placas de meio LGI-P. Também foi observado um alto índice de infecção com fungos, mesmo com a adição de cicloheximida no meio de cultura, o que dificultou a avaliação. As plantas restantes foram transplantadas para potes com 5 kg de areia-vermiculita para as avaliações futuras do efeito da inoculação no crescimento destas plantas.

Durante o experimento em casa de vegetação ocorreu uma infestação das plantas com pulgões. Foi observada a presença de bactérias com características de *G. diazotrophicus* associadas a estes pulgões. Maiores detalhes podem ser encontrados em ANEXO I.

5. DISCUSSÃO

A determinação da sequência completa do genoma da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* terminada recentemente, possibilitou um maior entendimento sobre os mecanismos genéticos e bioquímicos que a *G. diazotrophicus* usa para promover uma interação benéfica com plantas hospedeiras. Usando ferramentas de bioinformática tornou-se possível prever funções de novos genes e até de comparar as estruturas de genomas inteiros com o objetivo de desvendar funções codificadas, ou de esclarecer o contexto evolucionário do organismo estudado.

Mesmo assim, os métodos da genética clássica continuam tendo uma grande importância nos estudos pós-genômicos modernos. Isto porque hipóteses formuladas a partir de estudos de bioinformática frequentemente necessitam de validação em laboratório, e, estes estudos muitas vezes incluem a modificação do organismo ao nível do seu material genético. Para que estas modificações sejam possíveis, metodologias de transformação genética são imprescindíveis.

Embora a transformação genética de *G. diazotrophicus* tenha sido relatada na literatura internacional, um método eficiente de transformação não estava disponível no Brasil. No presente trabalho, foi desenvolvida uma metodologia de transformação da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* por meio da técnica de eletroporação. O método de eletroporação foi utilizado para a geração de mutantes aleatórios e sítio-dirigidos. Vários mutantes foram submetidos a testes fisiológicos *in vitro* e a testes de inoculação de plantas de cana-de-açúcar com o objetivo de validar o papel destes mutantes.

5.1. Transformação e mutagênese de *G. diazotrophicus*

A transformação genética de bactérias pode ser realizada de diferentes formas. Uma forma, tradicionalmente muito utilizada, é a conjugação, um mecanismo natural de transferência de material genético entre duas células bacterianas por contato direto (LEDERBERG & TATUM, 1946). Uma desvantagem desta metodologia é que ela é realizada pela mistura do organismo doador e o organismo recipiente, e, posteriormente deve ser realizada uma etapa de seleção para o organismo recipiente. Adicionalmente, testes de

transformação de *G. diazotrophicus* por meio de conjugação têm sido pouco eficientes no laboratório de genética e bioquímica da Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ, Brasil). Entre outros métodos mais rápidos hoje disponíveis, foi definida uma estratégia de transformação da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* por meio da técnica de eletroporação. Para testar a eficiência de um método de transformação, plasmídeos compatíveis com o organismo alvo são geralmente usados. SEVILLA & KENNEDY (2000) comunicaram a transformação da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* com vários plasmídeos derivados do plasmídeo pKT230 (BAGDASARIAN *et al.*, 1981). Por este motivo, a eletroporação foi testada com este plasmídeo e os dados apresentados mostraram que esta estratégia foi eficiente para a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*.

Tentativas de mutagenizar a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* pela eletroporação com mini-transposons que foram descritos por SIMON *et al.* (1989) não tiveram sucesso, embora microcolônias tenham sido observadas após a transformação. O mesmo foi observado por GUILHABERT *et al.* (2001) quando tentaram usar os mesmos mini-transposons para transformar a bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa*. Uma possível explicação poderia estar no mecanismo de funcionamento dos mini-transposons, que requer a expressão da transposase codificada no próprio vetor. O surgimento de micro-colônias na presença do antibiótico seletivo para o transposon, significa que o mini-transposon foi transferido para o organismo alvo. Porém, o fato da perda da capacidade destas micro-colônias crescerem indica que o próximo passo, isto é, a transposição, não ocorreu e que o organismo perdeu o vetor com o mini-transposon responsável pela resistência ao antibiótico seletivo. Vale lembrar que esta explicação é de caráter hipotético.

Para evitar possíveis problemas de expressão e funcionamento da transposase, um novo tipo de elemento de transposição, o *EZ::Tn5TM <kan-2>Tnp TransposomeTM* (Epicentre), foi usado. Este elemento de transposição, derivado de Tn5, já vem complexado com a proteína transposase, evitando a etapa da expressão da mesma. A eletroporação da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* com o *EZ::Tn5TM <kan-2>Tnp TransposomeTM* foi realizada com sucesso, rendendo uma eficiência de até 1×10^6 cfu/ μ g de transposome. As eficiências de transformação observadas foram altas quando comparadas com a bactéria *X. fastidiosa*, onde eficiências entre $1,2 \times 10^3$ cfu/ μ g e $7,5 \times 10^4$ cfu/ μ g transposome foram observadas (GUILHABERT *et al.*, 2001; KOIDE *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2007). A eficiência aqui observada possibilitaria a geração de bancos de mutantes saturados em poucos experimentos de eletroporação como foi descrito para *P. aeruginosa* (JACOBS *et al.*, 2003).

5.2. O uso do PCRI para a determinação de sítios de inserção

A determinação do sítio de inserção do elemento de transposição requer o isolamento do DNA que flanqueia a inserção. No caso em que o fragmento inserido no genoma contenha uma origem de replicação bacteriana, a técnica de resgate de plasmídeo (plasmid rescue, em inglês) pode ser aplicada. Caso contrário, métodos baseados em PCR são geralmente usados como, por exemplo, PCR mediado por ligação (LMPCR ou ligation mediated PCR, em inglês) (PRUD'HOM *et al.*, 1998) ou PCR inverso (IPCR ou inverse PCR, em inglês) (RICH & WILLIS, 1990). Mais recentemente, também o sequenciamento direto têm sido mencionado na literatura como método para identificar sítios de inserção de transposon em microrganismos (QIMRON *et al.*, 2003). Neste caso, o sequenciamento é realizado usando-se o DNA genômico de bactéria como molde, com primers de sequenciamento que anelam na sequência conhecida do transposon e permitam a leitura do DNA que o flanqueia. A intensidade do sinal obtida na reação de sequenciamento aumenta linearmente com a quantidade de DNA molde, enquanto, no PCR comum ocorre uma relação exponencial. Por isso, a metodologia do sequenciamento direto requer uma grande quantidade de DNA molde (até 5 µg) (QIMRON *et al.*, 2003), uma vez que geralmente cada molécula (cada cromossomo) contém apenas um sítio de ligação para o primer. Um outro fator que dificulta o uso desta metodologia é que o uso do cromossomo inteiro como DNA molde aumenta a chance de hibridização inespecífica da sonda, podendo causar sinais de sequenciamento mal resolvidos. Várias tentativas de sequenciamento direto com DNA de mutantes de transposome de *G. diazotrophicus* foram realizadas sem sucesso, neste estudo. Os motivos expostos anteriormente poderiam fornecer uma explicação para este fato.

A ineficiência do sequenciamento direto levou à escolha de uma metodologia que dispensava a clonagem de DNA e foi feita uma adaptação do método de PCR inverso (PCRI), descrito por MARTIN & MOHN (1999). DNA genômico digerido com as enzimas de restrição de corte freqüente *Pst*I e *Pvu*II e, posteriormente, circularizado foi usado como molde para PCRI com três pares de primer, possibilitando a amplificação de ambas as bordas da inserção. Foi observado que a temperatura de anelamento neste processo é um fator importante, sendo que a elevação da mesma de 56°C para 58°C aumentou a quantidade de reações positivas (Figura 9). Provavelmente, temperaturas de anelamento mais baixas provocam a hibridização inespecífica resultando em reações ineficientes. Para os mutantes da série "B", foi possível obter produtos de PCR fortes e específicos em 16 dos 17 mutantes, equivalente a 94%, quando todos os pares de primer foram usados (Tabela 1). Em contraste,

nenhum produto foi obtido com os pares de primers para um mutante da série “B” (Tabela 1). Isto pode ocorrer quando, por motivos de coincidência, os sítios de restrição *Pst*I e *Pvu*II, estão com grandes intervalos. Os primers podem ficar tão distante, que a amplificação não ocorre na reação de PCR. Nestes casos, uma possível solução poderia ser o uso de PCR com outras enzimas de restrição. O PCR dos mutantes das séries “A” e “B” não foi realizado com todas as possíveis combinações de primer, e, por isso, estes mutantes não foram usados para a determinação da eficiência.

O sequenciamento dos produtos de PCR obtidos para os 16 mutantes da série “B”, possibilitou a determinação do sítio de inserção para 13 mutantes (Tabela 2). Portanto, o índice de sucesso do PCR, seguido de sequenciamento para os mutantes da série “B” foi de aproximadamente 75%. Para 3 dos 16 produtos de PCR, não foram obtidas sequências de qualidade. A presença de impurezas nas preparações de DNA, ou um conteúdo alto das bases nitrogenadas C e G no produto de PCR poderiam explicar os problemas obtidos no sequenciamento. Possivelmente, a clonagem destes produtos de PCR em vetores, antes do sequenciamento, poderia solucionar estes problemas com impurezas.

A metodologia de PCR demonstrada neste trabalho não fornece uma cobertura completa de todos os mutantes de transposome obtidos. Mesmo assim, o atual método é muito mais rápido que os métodos envolvendo etapas de clonagem, sendo possível obter produtos de PCR em 2 dias e sendo possível sequenciar estes produtos com os mesmos primers sem a necessidade de clonagem. O fato dos mutantes B12 e C12 apresentarem os fenótipos esperados (hipersensibilidade à luz UV-C e ausência de flagelos, respectivamente) (Figuras 13, 14, 15 e 16) para o sítio de inserção determinado por sequenciamento direto de produtos de PCR, confirma a confiabilidade deste método. Também, a qualidade de sequências obtidas a partir de produtos de PCR pode ser verificada pela presença da ponta do elemento *EZ::Tn5*.

5.3. Estudos sobre o modo de inserção dos mutantes

O transposon *Tn5*, do qual o *EZ::Tn5TM <kan-2>Tnp TransposomeTM* é um derivado, apresenta pouca preferência para sítios de inserção; porém, algumas características do DNA alvo podem influenciar a inserção. Foi descrita uma preferência de inserção de *Tn5* para a sequência A-GNTYWRANC-T (onde W é A ou T; R é A ou G; Y é C ou T e N é qualquer base) (GORYSHIN *et al.*, 1998). Também foi observado que *Tn5* têm uma preferência para DNA ativamente transcrito (McKINNON *et al.*, 1985). Idealmente, para a geração de

bibliotecas de mutantes com uma boa cobertura do genoma, a inserção do elemento de transposição deve ocorrer aleatoriamente, de forma que grande parte dos genes tenha uma chance igual de ser mutagenizado. Adicionalmente, é desejável a ocorrência de uma única inserção em cada mutante.

Experimentos de *Southern blot* mostraram que todos os mutantes resistentes ao antibiótico seletivo canamicina, apresentavam a sequência do elemento de transposição nos seus genomas. Também foi demonstrado que 26 entre os 27 mutantes analisados apresentavam inserções únicas enquanto um mutante tinha duas inserções. Pela variação entre tamanhos de bandas observadas nos diferentes mutantes, as inserções parecem ter ocorrido de forma aleatória.

O modo aleatório das inserções foi confirmado pela determinação dos sítios de inserção em 31 mutantes, já que todos apresentaram inserções em sítios distintos (Figura 10 e Tabela 3), distribuídas pelo genoma inteiro (Figura 11). Nenhuma das inserções ocorreu na sequência consenso descrita acima (A-GNTYWRANC-T). Mesmo assim, em 2 locais no genoma, ocorreram agrupamentos de inserções. Os mutantes B5 e B9 tiveram inserções no mesmo local que codifica o DNA ribossomal (rDNA) (Figura 10 e 11, Tabela 3). O DNA ribossomal tem um nível de expressão alto e constitutivo. Portanto, a ocorrência de 2 inserções nesta região gênica poderia ser explicada pela preferência de Tn5 por DNA ativamente expresso (McKINNON *et al.*, 1985). A mesma explicação não parece valer para as inserções nos mutantes B12, B17 e C7 que ocorreram em genes que codificam para uma proteína UvrC, uma proteína hipotética e uma inosina-5'-monofosfato desidrogenase (GuaB) respectivamente. Portanto, ainda permanece não esclarecido se estas inserções ocorreram preferencialmente para certos sítios, ou se o agrupamento ocorreu de forma aleatória.

Dos 31 mutantes, 28 apresentaram inserções dentro de genes (Tabela 3 e Figura 10). Juntos, estes dados indicam que a mutagênese da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* usando o *EZ::Tn5TM <kan-2>Tnp TransposomeTM* é válida para a geração de mutantes com inserções independentes em genes presentes no genoma da bactéria.

5.4. A estabilidade das inserções do elemento EZ::Tn5 *in vitro* e *in vivo* fornece uma ferramenta útil para estudos fisiológicos e ecológicos

Quando coleções de mutantes aleatórios de transposon são usadas em experimentos de *screening in vitro* ou *in vivo*, é importante verificar se os mutantes são geneticamente estáveis,

uma vez que transposons são elementos intrinsecamente alvos de mobilização. Um exemplo disto é a observação que inserções de um transposon derivado de Tn10 em mutantes de *Francisella tularensis* foram instáveis e alvos de transposição após a inserção no genoma do organismo (LAURIANO *et al.*, 2003).

No presente estudo, a análise de *Southern blot* com mutantes antes e após o cultivo prolongado *in vitro*, mostrou que a inserção do elemento EZ::Tn5 foi estável em todos os 7 mutantes testados. Portanto, aparentemente não há transposases ativas em *G. diazotrophicus* com a capacidade de causar a transposição do elemento EZ::Tn5. Vale lembrar que a estabilidade genética em experimentos *in vitro* não garante a estabilidade genética em circunstâncias naturais, como dentro da planta hospedeira. Para certos tipos de experimentos, a estabilidade sob este tipo de condição pode ter grande importância. Por exemplo, a realização de uma seleção de mutantes afetados na interação com a planta requereria a estabilidade genética sob estas condições.

Neste estudo foi demonstrado que todos os isolados de *G. diazotrophicus* obtidos de plantas inoculadas com o mutante de flagelo C12 e cultivadas sob condições não estéreis em uma casa de vegetação, durante seis semanas, mantiveram a mutação original. Outra indicação interessante que o experimento forneceu foi que, embora a planta tenha sido contaminada com uma variedade de outros microrganismos, nenhum isolado de *G. diazotrophicus* selvagem foi encontrado, mostrando que as plantas não foram contaminadas por *G. diazotrophicus* durante a permanência sob condições não estéreis. Este dado é importante para a validação de experimentos de inoculação de cana-de-açúcar com *G. diazotrophicus* sob condições não estéreis em geral. Também, a aparente estabilidade genética possibilitaria o uso do elemento EZ::Tn5 como um marcador molecular em estudos ecológicos, sendo possível monitorar um mutante pela presença do elemento. Assim, esta ferramenta possibilitaria distinguir entre bactérias inoculadas e aquelas que entraram no sistema como contaminante.

5.5. Hipersensibilidade do mutante B12 à luz UV-C

Além de demonstrar a robustez da metodologia de mutagênese de transposome seguida de determinação de sítio de inserção por PCRI, a análise dos mutantes B12 (*uvrC*::EZ::Tn5) e C12 (*flgA*::EZ::Tn5) forneceu alguns dados interessantes sobre o papel dos genes semelhantes de *uvrC* e *flgA* em *G. diazotrophicus*.

O gene *uvrC* de *E. coli* codifica a proteína UvrC que tem uma função no reparo de lesões provocadas no DNA por luz UV e agentes químicos. A proteína UvrC está envolvida em um dos mecanismos de reparo de DNA presente na célula, chamado de reparo por excisão de nucleotídeos (REN) (HOEIJMAKERS, 1993). O REN é um mecanismo, no qual um oligonucleotídeo contendo danificações como, por exemplo, dímeros de pirimidina, são removidos, possibilitando o reparo. O processo completo de REN em bactérias envolve apenas três proteínas, UvrA, B e C. Um complexo formado pelas proteínas UvrA e UvrB é responsável pelo reconhecimento do sítio danificado. A proteína UvrA dissocia do complexo e, nesta fase, a proteína UvrC é recrutada para a proteína UvrB. A proteína UvrC funciona como uma endonuclease e introduz um corte dos lados 3' e 5' da fita danificada, liberando um oligonucleotídeo de 12-13 resíduos. Em seguida, o *gap* formado é preenchido pela enzima DNA polimerase I, reconstituindo o sítio original (SAVERY, 2007).

Conforme esperado, o mutante B12 (*uvrC::EZ::Tn5*) apresentou um fenótipo hipersensível à luz UV-C, o que aponta para uma função importante do sistema UvrABC em *G. diazotrophicus* em resposta aos agentes mutagênicos como a irradiação UV (Figura 13). No mesmo experimento, foram encontrados fortes indícios da ação de uma fotoliase. A aplicação de luz visível em células mutantes (mutante B12) após a aplicação de luz UV-C, resultou em um fenótipo bem menos sensível. Fotoliasas são encontradas em microrganismos, plantas, e animais, mas não em seres humanos, e utilizam a energia da luz para converter diretamente dímeros de pirimidinas em monômeros, explicando o efeito da luz visível sobre a sensibilidade à luz UV-C (SINHA & HÄDER, 2002). A presença de um gene, cujo provável produto é similar com a fotoliase PhrA (número de acesso Q55081) pode, portanto, explicar esta observação.

5.6. Motilidade dependente de flagelo e formação de biofilmes

O mutante C12 (*flgA::EZ::Tn5*) apresentou um defeito de motilidade em meio semi-sólido e em placas de motilidade (Figura 15) e a microscopia eletrônica demonstrou a ausência de flagelos (Figura 16). A motilidade mediada por flagelos pode ser do tipo, em inglês, *swimming* ou *swarming*, sendo que o *swimming* é um comportamento solitário que acontece em líquidos e em meio de cultura com baixa concentração de agar, enquanto o *swarming* é um tipo de motilidade social, envolvendo sinalização química e QS entre células

da população, e que ocorre em meios de cultura sólidos (acima de 0,4%) (SHARMA & ANAND, 2002).

A motilidade observada no presente estudo parece ser, à primeira vista, do tipo *swimming*, apresentando bordas lisas, sendo que colônias do tipo *swarming* costumam ter uma borda altamente irregular. Porém, há exemplos de bactérias que apresentam *swarming*, dando origem a colônias com bordas lisas, como é o caso da *E. coli* e da *Salmonella typhimurium* (HARSHEY & MATSUYAMA, 1994). Também, colônias de *G. diazotrophicus* formadas em agar de motilidade apresentam características que indicam uma organização populacional e têm características de um filme fino, que quebra quando é forçada com ajuda de uma alça ou ponteira de plástico. Adicionalmente, na literatura há vários exemplos de trabalhos que relatam a motilidade do tipo *swarming*, onde o tipo de meio de cultura usado (abaixo de 0,3%) e a aparência das colônias móteis indicaria motilidade do tipo *swimming* (veja, por exemplo, MILLER *et al.*, 2007 e RAJAGOPALA *et al.*, 2007). Portanto, parece não haver um consenso absoluto determinando as características exatas de cada tipo de motilidade flagelar. Os estudos sobre a natureza da motilidade observada para *G. diazotrophicus* merecem ser mais aprofundados futuramente.

A motilidade mediada por flagelo em bactérias possibilita a quimiotaxia, uma característica que possibilita que a bactéria realize um movimento em direção de uma concentração de uma substância benéfica, ou se afaste de substâncias tóxicas (WADHAMS *et al.*, 2004). Acredita-se que a quimiotaxia tem um papel importante em ambientes com grandes variações em concentração de nutrientes, como é o caso da rizosfera (MILLER *et al.*, 2007). Uma questão interessante é, portanto, se a quimiotaxia teria um papel na colonização da raiz da cana-de-açúcar por *G. diazotrophicus*, sendo que os exudados de raiz da planta poderiam atrair esta bactéria, como tem sido mostrado para várias outras bactérias (MILLER *et al.*, 2007).

O flagelo também tem outras funções, independentes de quimiotaxia, mas com possível importância para a interação com a planta hospedeira. Bactérias interagem fisicamente com superfícies para formarem comunidades multicelulares complexas, chamadas de biofilmes, que podem conter múltiplas espécies (DANHORN & FUQUA, 2007). PRATT & KOLTER (1998) estudaram mutantes de flagelo de *E. coli* e propuseram um papel do flagelo, tanto na interação física inicial com a superfície, como também na expansão sobre a superfície durante a colonização. Estes autores mostraram que a quimiotaxia não está envolvida nestes processos em *E. coli*.

Os dados apresentados no atual estudo, sugerem um papel do flagelo na formação de biofilmes em lâ de vidro como substrato por *G. diazotrophicus* (Figura 17). Possivelmente, a capacidade da *G. diazotrophicus* de formar biofilme possa ter um papel na colonização da superfície e do interior da cana-de-açúcar. Neste sentido, é interessante a observação que mutantes de flagelo de *S. meliloti* tanto tiveram defeitos na formação de biofilmes, quanto na capacidade de induzir nódulos na planta hospedeira alfalfa (FUJISHIGE *et al.*, 2006). No presente estudo, foi realizado um experimento de inoculação de cana-de-açúcar com o mutante C12. Uma contagem de bactérias associadas à planta, 5 dias após a inoculação, não indicou defeitos deste mutante na colonização, uma vez que quantidades similares de bactérias puderam ser isoladas para o mutante e para a estirpe selvagem PAL5. Porém, vale mencionar que há dúvidas com respeito à eficiência da esterilização da superfície das plantas (1 min com cloramina T (1%)) antes da extração de bactérias, o que pode ter provocado a grande quantidade de bactérias observadas para os dois os tratamentos, selvagem e mutantes. Portanto, é preciso um novo estudo de inoculação para verificar a eficiência do mutante C12 na colonização da planta. Uma conclusão que pode ser tirada é que o mutante C12 não perdeu completamente a capacidade de colonização, já que o mutante pôde ser reisolado de uma planta após 6 semanas de crescimento em casa de vegetação (item 4.1.7.).

5.7. A mutagênese sítio-dirigida usando o *EZ::Tn5TM <kan-2> transposon insertion kit*

Neste estudo, o sistema para transposição *in vitro*, o *EZ::Tn5TM <kan-2> transposon insertion kit*, foi usado para a mutagênese *in vitro* do possível gene de *quorum sensing* *GdluxI*, com o intuito de identificar um possível papel deste gene no crescimento da bactéria ou na interação com a cana-de-açúcar. Este kit foi escolhido por causa da ausência de sítios de restrição adequados no plasmídeo alvo, que possibilitariam uma mutagênese por clonagem. A estratégia de transposição *in vitro* escolhida se mostrou eficiente para a mutagênese sítio-dirigida, como foi verificado por análises de *Southern blot* e PCR (Figuras 23 e 24). Em princípio, esta metodologia poderá ser aplicada para a mutagênese sítio-dirigida de qualquer gene. O elemento de transposição do *EZ::Tn5TM <kan-2> transposon insertion kit*, é idêntico àquele do transposome, para o qual foi demonstrada a estabilidade genética *in vitro* e *in vivo*. Portanto, mutantes sítio-dirigidos gerados usando o *EZ::Tn5TM <kan-2> transposon insertion kit*, deverão ser igualmente estáveis.

5.8. *Quorum sensing* do tipo LuxRI em *G. diazotrophicus* ?

Bioensaios com o organismo repórter NT1 não possibilitaram a detecção de moléculas autoindutoras produzidas por *G. diazotrophicus*. Esta observação não significa necessariamente, que este tipo de molécula não é produzida, sendo que o reconhecimento de moléculas autoindutoras por proteínas do tipo LuxR é um processo com certa especificidade. Se a *G. diazotrophicus* estiver produzindo um autoindutor que não é reconhecido pelo organismo detector, o bioensaio dá um resultado negativo.

Estudos de expressão gênica por RT-PCR mostraram que os 3 genes *GdluxI*, *GdluxRI* e *GdluxR2* são expressos, indicando que são genes funcionais (Figura 20). Porém, neste estudo, nenhum fenótipo pôde ser observado, sendo a morfologia das colônias mutantes de *GdluxI* igual à da estirpe selvagem PAL5 (Figura 25). Também, a motilidade dos mutantes em placas de motilidade é aparentemente normal (não mostrado). Os mutantes foram capazes de formar películas em meio semi-sólido livre de nitrogênio, indicando que a FBN não foi afetada (não mostrado). Porém, não pode-se excluir a possibilidade da FBN ocorrer em uma taxa menor, como é o caso em mutantes de *R. etli* no gene de QS *CinI*, onde a FBN em nódulos de feijão foi 60-70% menor que para a estirpe selvagem (DANIELS *et al.*, 2002).

Possivelmente, diferenças nas respostas entre plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *G. diazotrophicus* selvagem ou com mutantes no gene *GdluxI* poderão ser observadas no experimento de inoculação que está em andamento.

Um problema nos estudos sobre o papel de QS em alguns organismos, é que nem sempre mutantes apresentam fenótipos claros, como é observado para *R. leguminosarum*, uma bactéria com 4 pares de genes do tipo *luxRI* (GONZÁLEZ & MARKETON, 2003). Um fator que dificulta a análise do sucesso da interação entre a *G. diazotrophicus* e a cana-de-açúcar, é a ausência da formação de uma estrutura clara que possibilite uma avaliação, como no caso da interação entre leguminosas e rizóbios, na qual nódulos são formados.

A importância geral da sinalização de QS do tipo LuxRI nas interações entre plantas e bactérias endofíticas continua sendo uma área de especulação. Por exemplo, o genoma de *Azoarcus* não apresenta genes de QS do tipo LuxRI (KRAUSE *et al.*, 2006). Os autores deste estudo sugerem que a ausência de genes de QS seria um indício de que a bactéria é “desarmada” no que diz respeito à virulência. Porém, este raciocínio é contradito pela presença de genes de QS no genoma de *G. diazotrophicus*, uma bactéria que tem um estilo de vida e características similares. Uma outra comparação que poderia ser feita é entre o genoma de *G. diazotrophicus* e o da bactéria *Gluconobacter oxydans*, uma bactéria próxima a *G.*

diazotrophicus do ponto de vista filogenético, mas que não fixa nitrogênio, nem é endofítica, e da qual a sequência genômica completa foi determinada (PRUST *et al.*, 2005). A proximidade entre *G. diazotrophicus* e *G. oxidans* é demonstrada pela observação que muitos dos genes de *G. diazotrophicus* tem seus homólogos mais próximos em *G. oxidans* (dados não mostrados), enquanto os genes *GdluxI* e *GdluxRI* de *G. diazotrophicus* têm seus homólogos em rizóbios (veja ítem 4.2.1.). No genoma de *G. oxydans*, genes de QS do tipo LuxRI não foram encontrados. Esta observação pode levar à especulação de que, possivelmente, os genes de QS tenham sido adquiridos por *G. diazotrophicus* de outras bactérias do mesmo nicho, pela transferência horizontal. Por sua vez, este evento seria uma indicação que a presença dos genes de QS teria uma relação com o estilo de vida endofítico de *G. diazotrophicus*. Portanto, a possível função e a importância da presença de genes de QS do tipo LuxRI no genoma de *G. diazotrophicus* continuam desconhecidas.

6. CONCLUSÕES

Os dados apresentados nesta tese mostram a utilidade de ferramentas de transposon baseados no elemento de transposição EZ::Tn5 em *G. diazotrophicus*. Mutantes aleatórios foram obtidos de forma eficiente e a metodologia adaptada de PCRI desenvolvida neste estudo, permitiu a determinação rápida de sítios de inserção. Usando o mesmo elemento de transposição como base, um mutante sítio-dirigido no gene *GdluxI*, possivelmente envolvido com monitoramento populacional ou *quorum sensing*, foi gerado, embora a função deste gene em *G. diazotrophicus* permaneça desconhecida. Estudos futuros para esclarecer o possível sistema de quorum sensing em *G. diazotrophicus* serão necessários.

Os experimentos de inoculação de plantas de cana-de-açúcar com diferentes mutantes ainda não foram concluídos para fornecer dados conclusivos sobre o efeito das mutações descritas sobre a interação planta-bactéria. O que estes experimentos já mostraram, é que, no mínimo um mutante aleatório, com uma inserção em um gene flagelar, manteve sua mutação no sítio original, durante 6 semanas no interior de uma planta hospedeira. Junto com a estabilidade genética observada em experimentos *in vitro*, estes dados indicam uma robustez do uso das ferramentas de transposon do tipo EZ::Tn5.

A verificação fenotípica de um mutante em um gene flagelar *flgA* e outro em um gene envolvido em reparo de DNA, *uvrC*, forneceu alguns dados novos sobre a fisiologia de *G. diazotrophicus*. Foram encontradas evidências para um papel do flagelo na motilidade e na formação de biofilme em *G. diazotrophicus* e a mutação no gene de reparo de DNA deixou a *G. diazotrophicus* hipersensível a irradiação com luz UV-C.

Portanto, este estudo trouxe novas metodologias de mutagênese para o uso em *G. diazotrophicus* que poderão ter um papel importante em estudos fisiológicos e ecológicos na fase pós-genômica desta bactéria.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
- ALVAREZ, B. & MARTINEZ-DRETS, G. (1995) Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Can J Microbiol* 41: 918-924.
- ARRIETA, J.G., SOTOLONGO, M., MENÉNDEZ, C., ALFONSO, D., TRUJILLO, L.E., SOTO, M., RAMÍREZ, R., HERNÁNDEZ, L. (2004) A type II protein secretory pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J Bacteriol* 186: 5031-5039.
- BAGDASARIAN, M., LURZ, R., RUCKERT, B., FRANKLIN, F.C.H., BAGDASARIAN, M.M., FREY, J., TIMMIS, K. (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSP1010 derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* 16: 237-247.
- BAINTON, N.J., STEAD, P., CHHABRA, S.R., BYCROFT, B.W., SALMOND, G.P., STEWART, G.S., WILLIAMS, P. (1992) N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone regulates carbapenem antibiotic production in *Erwinia carotovora*. *Biochem J* 288: 997-1004.
- BALDANI, V.L.D., ALVAREZ, M.A., BALDANI, J.I., DÖBEREINER, J. (1986) Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil* 90: 35-46.
- BASTIAN, F., COHERN, A., PICCOLI, P., LUNA, V., BARALDI, R., BOTTINI, R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A(1) and A(3) by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul* 24: 7-11.
- BEIJERINCK, M.W. (1925) Über ein *Spirillum* welches freien stikstoff binden kann? *Infektionskr Abt* 63: 353-359.
- BLOCKER, A., KOMORIYA, K., AIZAWA, S-I. (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci* 100: 3027-3030.

- BODDEY, R.M., URQUIAGA, S., ALVES, B.J.R., REIS, V. (2003) Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant Soil* 252: 139-149.
- BOHM, M., HUREK, T., REINHOLD-HUREK, B. (2007) Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. Strain BH72. *Mol Plant Micr Interact* 20: 526-533.
- BRETZ, J., LOSADA, L., LISBOA, K., HUTCHESON, S.W. (2002) Lon protease functions as a negative regulator of type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* 45: 397-409.
- BURROWS, L.L. (2005) Weapons of mass retraction. *Mol Microbiol* 57: 878-888.
- CAVALCANTE, J.J.V., VARGAS, C., NOGUEIRA, E.M., VINAGRE, F., SCHWARCZ, K., BALDANI, J.I., FERREIRA, P.J.G., HEMERLY, A.S. (2007) Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. *J Exp Bot* 58: 673-686.
- CAVALCANTE, V.A. & DÖBEREINER, J. (1988) A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108: 23-31.
- CROES, C. L., MOENS, S., VAN BASTELAERE, E., VANDERLEYDEN, J., MICHIELS, K.W. (1993) The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *J Gen Microbiol* 139: 2261-2269.
- DANIELS, R., DE VOS, D.E., DESAIR, J., RAEDSCHELDERS, G., LUYTEN, E., ROSEMEYER, V., VERRETH, C., SCHOETERS, E., VANDERLEYDEN, J., MICHIELS, J. (2002) The *cin quorum sensing* locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *J Biol Chem* 277: 462-468.
- DANHORN, T. & FUQUA, C. (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61: 401-422.
- DAVIES, D.G., PARSEK, M.R., PEARSON, J.P., IGLEWSKI, B.H., COSTERTON, J.W., GREENBERG, E.P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295-298.
- DEAN, D.R. & JACOBSEN, M.R. (1992) Biochemical genetics of nitrogenase. Em: Stacey G, Burris RH, Evans HJ (eds) Biological nitrogen fixation. Chapman e Hall, Nova York, pp 763-784.
- DÖBEREINER, J. (1988) Isolation and identification of root associated diazotrophs. *Plant Soil* 110: 207-212.

- DONG, Y.H., WANG, L.H., XU, J.L., ZHANG, H.B., ZHANG, X.F., ZHANG, L.H. (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411: 813-817.
- DÖRR, J., HUREK, T., REINHOLD-HUREK, B. (1998) Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Mol Microbiol* 30: 7-17.
- DIXON, R. & KAHN, D. (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* 2: 621-31.
- ENGBRECHT, J., NEALSON, K., SILVERMAN, M. (1983) Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 32: 773-81.
- ENGBRECHT, J. & SILVERMAN, M. (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81: 4154-4158.
- ENGBRECHT, J. & SILVERMAN, M. (1987) Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. *Nucleic Acids Res* 15:10455-10467.
- FLORES-ENCARNACION, M., CONTRERAS-ZENTELLA, M., SOTO-URZUA, L., AGUILAR, G.R., BACA, B.E., ESCAMILLA, J.E. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *J Bacteriol* 181: 6987-6995.
- FUENTES-RAMIREZ, L.E., JIMENEZ-SALGADO, T., ABARCA-OCAMPO, I.R., CABALLERO-MELLADO, J. (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars in Mexico. *Plant Soil* 154: 145-150.
- FUJISHIGE, N.A., KAPADIA, N.N., DE HOFF, P.L., HIRSCH, A.M. (2006) Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol* 56:195–206.
- GILLIS, K., KERSTERS, K., HOSTE, B., JANSSENS, D., KROPPESTEDT, R.M., STEPHAN, M.P., TEIXEIRA, K.R.S., DÖBEREINER, J., DE LEY, J. (1989) *Acetobacter diazotrophicus* sp. Nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int J Syst Bact*: 39: 361-364.
- GONZÁLEZ, B., MARTÍNEZ, S., CHÁVEZ, J.L., LEE, S., CASTRO, N.A., DOMÍNGUEZ, M.A., GÓMEZ, S., CONTRERAS, M.L., KENNEDY, C., ESCAMILLA, J.E. (2006) Respiratory system of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5: Evidence for a cyanide-sensitive cytochrome *bb* and cyanide-resistant cytochrome *ba* quinol oxidases. *Bioch et Bioph Acta* 1757: 1614-1622.

- GONZÁLEZ, J.E. & MARKETON, M.M. (2003) *Quorum sensing* in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 574–592.
- GORYSHIN, I.Y., JENDRISAK, J., HOFFMAN, L.M., REZNIKOFF, W.S. (2000) Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. *Nature Biotechnol* 18: 97-100.
- GORYSHIN, I.Y., MILLER, J.A., KIL, Y.V., LANZOV, V.A., REZNIKOFF, W.S. (1998) Tn5/IS50 target recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10716–10721.
- GUILHABERT, M.R., HOFFMAN, L.M., MILLS, D.A., KIRKPATRICK, B.C. (2001) Transposon mutagenesis of *Xylella fastidiosa* by electroporation of Tn5 synaptic complexes. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 701-706.
- HAMER, L., DEZWAAN, T.M., MONTENEGRO-CHAMORRO, M.V., FRANK, S.A., HAMER, J.E. (2001) Recent advances in large-scale transposon mutagenesis. *Curr Opin Chem Biol* 5: 67-73.
- HAYES, F. (2003) Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. *Annu Rev Genet* 37: 3-29.
- HARSHEY, R.M. & MATSUYAMA, T. (1994) Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc Nac Acad Sci* 91: 8631-8635.
- HERNANDEZ, L., ARRIETA, J., MENENDEZ, C., VAZQUEZ, R., COEGO, A., SUAREZ, V., SELMAN, G., PETIT-GLATRON M.-F., CHAMBERT, R. (1995) Isolation and enzymatic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochem J* 309: 113-118.
- HERNANDEZ, L., SOTOLONGO, M., ROSABAL, Y., MENENDEZ, C., RAMIREZ, R., BACALLERO-MELLADO, J., ARRIETA, J. (2000) Structural levansucrase gene (*lsdA*) constitutes a functional locus conserved in the species *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch Microbiol* 174: 120-124.
- HAYES, F. (2003) Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. *Annu Rev Genet* 37: 3–29.
- HE, S.Y., NOMURA, K., WHITTAM, T.S. (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta* 1694: 181-206.
- HOEIJMAKERS, J.H.J. (1993) Nucleotide excision repair I: from *E. coli* to yeast. *Trends Genet* 9: 173-177.

- HUREK, T. & REINHOLD-HUREK, B. (2003) *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J Biotechnol* 19: 169-178.
- JACOBS, M.A., ALWOOD, A., THAIPISUTTIKUL, I., SPENCER, D., HAUGEN, E., ERNST, S., WILL, O., KAUL, R., RAYMOND, C., LEVY, R., CHUN-RONG, L., GUENTHNER, D., BOVEE, D., OLSON, M.V., MANOIL, C. (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* 100: 14339–14344.
- JAMES, E.K., OLIVARES, F.L., OLIVEIRA, A.L.M., REIS JR, F.B., SILVA, L.G., REIS, V.M. (2001) Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J Exp Bot* 52: 747-760.
- JAMES, E.K., REIS, V.M., OLIVARES, F.L., BALDANI, J.I., DÖBEREINER, J. (1994) Infection of sugarcane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J Exp Bot* 45: 757-766.
- JIMENEZ-SALGADO, T., FUENTES-RAMÍREZ, L.E., TAPIA-HERNÁNDEZ, A., MASCARUA-ESPARZA, MARTINEZ-ROMERO, E., CABALLERO-MELLADO, J. (1997) *Coffea arabica* L., a new host plant for *Gluconacetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing *Gluconacetobacteria*. *Appl Environ Microbiol* 63: 3676-3683.
- KIRCHHOF, G., BALDANI, J.I., REIS, V.M. & HARTMANN, A. (1998) Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues. *Can J Microbiol* 44: 12–19.
- KOIDE, T., NETO, J.F.S., GOMES, S.L., MARQUES, M.V. (2004) Insertional transposon mutagenesis in the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain with transposome. *Curr Microbiol* 48: 247–250.
- KRAUSE, A., RAMAKUMAR, A., BARTELS, D., BATTISTONI, F., BEKEL, T., BOCH, J., BÖHM, M., FRIEDRICH, F., HUREK, T., KRAUSE, L., LINKE, B., MCHARDY, A.C., SARKAR, A., SCHNEIKER, S., SYED, A.A., THAUER, R., VORHÖLTER, F.-J., WEIDNER, S., PÜHLER, A, REINHOLD-HUREK, B., KAISER, O., GOESMANN, A. (2006) Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nat Biotechnol* 24: 1385-1391.
- LAI, E-M. & KADO, C.I. (2000) The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends Microbiol* 8: 361-369.

- LAURIANO, C.M., BARKER, J.R., NANO, F.E., ARULANANDAM, B.P., KLOSE, K.E. (2003) Allelic exchange in *Francisella tularensis* using PCR products. *FEMS Micorbiol Lett* 229:195-202.
- LEDERBERG, J. & TATUM, E.L. (1946) Gene recombination in *E. coli*. *Nature* 158: 558.
- LEE, S., FLORES-ENCARNACIÓN, M., CONTRERAS-ZENTELLA, M., GARCIA-FLORES, L., ESCAMILLA, J.E., KENNEDY, C. (2004) Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *J Bacteriol* 186: 5384-5391.
- LEE, S., RETH, A., MELETZUS, D., SEVILLA, M., KENNEDY, C. (2000) Characterization of a major cluster of *nif*, *fix* and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. *J Bacteriol* 182: 7088-7091.
- LETUNIC, I., COPLEY, R.R., SCHMIDT, S., CICCARELLI, F.D., DOERKS, T., SCHULTZ, J., PONTING, C.P., BORK, P. (2004) SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res* 32: D142–D144.
- LIMA, E., BODDEY, R.M., DÖBEREINER, J. (1987) Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N aided balance. *Soil Biol. Biochem* 19: 165-170.
- LI, Y., HAO, G., GALVANI, C.D., MENG, Y., FUENTE, L., HOCH, H.C., BURR, T.J. (2007) Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. *Microbiology* 153: 719–726.
- MARIE, C., BROUGHTON, W.J., DEAKIN, W.J. (2001) *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr Opin Plant Biol* 4: 336-342.
- MARKETON, M.M., GRONQUIST, M.R., EBERHARD, A., GONZÁLEZ, J.E. (2002) Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* *sinR/sinI* locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones. *J Bacteriol* 184: 5686-5695.
- MARRIS, E. (2006) Drink the best, drive the rest. *Nature* 444: 670-672.
- MARTIN, V.J. & MOHN, W.W. (1999) An alternative inverse PCR (IPCR) method to amplify DNA sequences flanking Tn5 transposon insertions. *J Microbiol Meth* 35, 163-166.
- McCLINTOCK, B. (1948) *Carnegie Institute of Washington Yearbook* 47: 155-169.
- McKINNON, R.D., WAYE, J.S., BAUTISTA, D.S., GRAHAM, F.L. (1985) Nonrandom insertion of Tn5 into cloned human adenovirus DNA. *Gene* 40:31-38.

- MENG, Y., LI, Y., GALVANI, C.D., HAO, G., TURNER, J.N., BURR, T.J., HOCH, H.C. (2005) Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *J Bacteriol* 187: 5560-5567.
- MICHIELS, K.W., CROES, C.L., VANDERLEYDEN, J. (1991) Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J Gen Microbiol* 137: 2241-2246.
- MILLER, L.D., YOST, C.K., HYNES, M.F., ALEXANDRE, G. (2007) The major chemotaxis gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae is essential for competitive nodulation. *Mol Microbiol* 63: 348–362.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A. (1962) Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 47.
- NAMBU, T. & KUTSUKAKE, K. (2000) The *Salmonella* FlgA protein, a putative periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation. *Microbiology* 146: 1171-1178.
- NOGUEIRA, E.M., OLIVARES, F.L., JAPIASSU, J.C., VILAR, C., VINAGRE, F., BALDANI, J.I., HEMERLY, A.S. (2005) Characterization of glutamine synthetase genes in sugarcane genotypes with different rates of biological nitrogen fixation. *Plant Science* 169: 819–832.
- OLIVARES, F.L. & JAMES, E.K. (2000) Endophytic establishment of diazotrophic bacteria in sugar cane plants. In: Pedrosa, F.O., Hungria, M., Yates, M.G., Newton, W.E., eds. Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity. Dordrecht: Kluwer, 413-414.
- OLIVEIRA A.L.M., URQUIAGA, S., DÖBEREINER, J., BALDANI, J.I. (2002) The effect of inoculating N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil* 242: 205-215.
- OOSTHUIZEN, M.C., STEYN, B., LINDSAY, D., BRÜZEL, V.S., VON HOLY, A. (2001) Novel method for the proteomic investigation of a dairy-associated *Bacillus cereus* biofilm. *FEMS Microbiol Lett* 194: 47-51.
- O'TOOLE, G.A. & KOLTER, R. (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295–304.
- PAPANIKOU, E., KARAMANOY, S., ECONOMOU, A. (2007) Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nature* 5: 839-851.

- PASSADOR, L., COOK, J.M., GAMBELLO, M.J., RUST, L., IGLEWSKI, B.H. (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication *Science* 260: 1127–1130.
- PAULA, M.A., DÖBEREINER, J., SIQUEIRA, J.O. (1989) Nutrição e produção de batata-doce micropropagada e inoculada com fungo micorrízico VA e bactérias diazotróficas. Em: Reunião Brasileira Sobre Micorrizas, 3, 1989. *Anais Piracicaba*, USP/CENA, 1989: p. 26.
- PENMETSA, R.V. & COOK, D.R. (1997). A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science* 275: 527–530.
- PERLOVA, O., URETA, A., NORDLUND, S., MELETZUS, D. (2003) Identification of three genes encoding PII-like proteins in *Gluconacetobacter diazotrophicus*: studies of their role(s) in the control of nitrogen fixation. *J Bacteriol* 185: 5854-5861.
- PIPER, K.R., BECK VON BODMAN, S., FARRAND, S.K. (1993) Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* 362: 448-450.
- PRATT, L.A. & KOLTER, R. (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30: 285-293.
- PRUD'HOM, G., LAGIER, B., PELICIC, V., HANCE, A.J., GICQUEL, B. E GUILHOT, C. (1998) A reliable amplification technique for the characterization of genomic DNA sequences flanking insertion sequences. *FEMS Microbiol Lett* 158: 75-81.
- PRUST, C., HOFFMEISTER, M., LIESEGANG, H., WIEZER, A., FRICKE, W.F., EHRENREICH, A., GOTTSCHALK, G., DEPPENMEIER, U. (2005) Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nat Biotechnol* 23: 195-200.
- QIMRON, U., MADAR, N., ASCARELLI-GOELL, R., ELGRABLY-WEISS, M., ALTUVIA, S. E PORGADOR A. (2003) Reliable determination of transposon insertion site in prokaryotes by direct sequencing. *J Microbiol Meth* 54: 137-140.
- RAJAGOPALA, S.V., TITZ, B., GOLL1, J., PARRISH, J.R., WOHLBOLD, K., MCKEVITT, M.T., PALZKILL, T., MORI, H., FINLEY JR, R.L., UETZ, P. (2007) The protein network of bacterial motility. *Mol Syst Biol* 3: 128.
- RASMUSSEN, T.B., MANEFIELD, M., ANDERSEN, J.B., EBERL, L., ANTHONI, U., CHRISTOPHERSEN, C., STEINBERG, P., KJELLEBERG, S., GIVSKOV, M. (2000) How *Delisea pulchra* furanones affect *quorum sensing* and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology* 146: 3237-3244.

- REINHOLD-HUREK, B. & HUREK, T. (1998) Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol* 6: 139-144.
- REIS, V.M. & DÖBEREINER, J. (1998) Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Arch Microbiol* 171: 13-18.
- REIS, V.M., OLIVARES, F.L., OLIVEIRA, A.L.M., REIS JR, F.B., BALDANI, J.I., DÖBEREINER, J. (1999) Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. *Plant Soil* 296:205-211.
- REZNIKOFF, W.S., BHASIN, A., DAVIES, D.R., GORYSHIN, I.Y., MAHNKE, L.A., NAUMANN, T., RAYMENT, I., STEINIGER-WHITE, M., TWINING S.S. (1999) Tn5: A molecular window on transposition. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 729-34.
- RICH, J.J. & WILLIS, D.K. (1990) A single oligonucleotide can be used to rapidly isolate DNA sequences flanking a transposon Tn5 insertion by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 18: 6673-6676.
- ROCHA, F.R., PAPINI-TERZI, F.S., NISHIYAMA JR, M.Y., VÊNCIO, R.Z.N., VICENTINI, R., DUARTE, R.D.C., DE ROSA JR, V.E., VINAGRE, F., BARSALOBRES, C., MEDEIROS, A.H., RODRIGUES, F.A., ULIAN, E.C., ZINGARETTI, S.M., GALBIATTI, J.Á., ALMEIDA, R.S., FIGUEIRA, A.V.O., HEMERLY, A.S., SILVA-FILHO, M.C., MENOSSE, M., SOUZA, G.M. (2007) Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC Genomics* 8: 71.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N., DARDANELLI, M.S., RUÍZ-SAÍNIZ, J.E. (2007) Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett* 272: 127-136.
- RODRIGUES NETO, J., MALAVOLTA JR, V.A., VICTOR, O. (1986). Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Sum Phytol* 12: 16.
- ROSEMEYER, V., MICHIELS, J., VERRETH, C., VANDERLEYDEN, J. (1998) *luxI*- and *luxR*-homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *J Bacteriol* 180: 815-821.
- SAMBROOK, J., FRITSH, E.F., MANIATIS, T. (1989) Molecular Cloning – A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory press, New York, USA.
- SANDKVIST, M. (2001) Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* 40: 271-283.

- SAVERY, N.J. (2007) The molecular mechanism of transcription-coupled DNA repair. *Trends Microbiol* 15: 326-333.
- SEVILLA, M., BURRIS, R.H., GUNAPALA, N., KENNEDY, C. (2001) Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and mutant strains. *Mol Plant Micr Interact* 14: 358–366.
- SEVILLA, M. & KENNEDY, C. (2000) em: Ladha JK and Reddy PM, editors. 2000. The quest for nitrogen fixation in rice. Proceedings of the third working group meeting on assessing opportunities for nitrogen fixation in rice, 9-12 aug, 1999. Los Baños Laguna, Philippines. Makati City (Philippines): International Rice Research Institute. 354 p. Sharma, M. e Anand, S.K. (2002) Swarming: a coordinated bacterial activity. *Curr Science* 83: 707-715.
- SIKORSKI, M.M., BIESIADKA, J., KAPERSKA, A.E., KOPCINSKA, J., LOTOCKA, B., GOLINOWSKI, W., LEGOCKI, A.B. (1999) Expression of genes encoding PR10 class pathogenesis-related proteins is inhibited in yellow lupine root nodules. *Plant Science* 149: 125-137.
- SIMON, R., QUANDT, J., KLIPP, W. (1989) New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. *Gene* 80: 161-169.
- SINHA, R.P. & HÄDER, D.-P (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* 1: 225–236.
- SOTO, M.J., SANJUÁN, J., OLIVARES, J. (2006) Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology* 152: 3167-3174.
- SPAINK, H.P. (1996) Regulation of plant morphogenesis by lipo-chitin oligosaccharides. *Crit Rev Plant Sci* 15: 559-582.
- STEPHAN, M.P., OLIVEIRA, M., TEIXEIRA, K.R.S., MARTÍNEZ-DRETS, G., DÖBEREINER, J. (1991) Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol Lett* 7: 67-72.
- SUN, Q., WU, W., QIAN, W., HU, J., FANG, R., HE, C. (2003) High-quality mutant libraries of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* generated by an efficient transposon mutagenesis system. *FEMS Microbiol Lett* 226: 145-150.
- TAGA, M.E. & BASSLER, B.L. (2003) Chemical communication among bacteria. *Proc Nat Acad Sci* 25: 14549-14554.

- TAPIA-HERNÁNDEZ, A., BUSTILLOS-CRISTALES, M.R., JIMENEZ-SALGADO, T., CABALLERO-MELLADO, J., FUENTES-RAMÍREZ, L.E. (2000) Natural endophytic occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microb Ecol* 39: 49-55.
- TEIXEIRA, K.R.S., WÜLLING, M., MORGAN, T., GALLER, R., ZELLERMANN, E-M., BALDANI, J.I., KENNEDY, C., MELETZUS, D. (1999) Molecular analysis of the chromosomal region encoding the *nifA* and *nifB* genes of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol Lett*, 176: 301-309.
- TRUJILLO-LÓPEZ, A., CAMARGO-ZENDEJAS, O., SALGADO-GARCIGLIA, R., CANO-CAMACHO, H., BAIZABAL-AGUIRRE, V.M., OCHOA-ZARZOSA, A., LÓPEZ-MEZA, J.E., VALDEZ-ALARCÓN, J.J. (2006) Association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* with roots of common bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings is promoted in vitro by UV light. *Can J Bot* 84: 321-327.
- URQUIAGA, S., CRUZ, H.S., BODDEY, R.M. (1992) Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Sci Soc Am J* 56: 105–114.
- VANDE BROEK, A., LAMBRECHT, M., VANDERLEYDEN, J. (1998) Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*. *Microbiology* 144: 2599-2606.
- VANDE BROEK, A. & VANDERLEYDEN, J. (1995) Review: Genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *Crit Rev Plant Sci* 14: 445-466.
- VIDEIRA, S.S., CRUZ, G.B., BALDANI, V.L.D. (2003) Gota d'água: Método rápido para visualização de flagelos em bactérias. *Comunicado Técnico* 62. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, Brasil.
- VINAGRE, F., VARGAS, C., SCHWARCZ, K., CACALCANTE, J., NOGUEIRA, E.M., BALDANI, J.I., FERREIRA, P.C.G., HEMERLY, A.S. (2006) SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂-fixing endophytic bacteria association. *J Exp Bot* 57: 559-569.
- VON BULOW, J.G.B. & DÖBEREINER, J. (1975) Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proc Natl Acad Sci* 72: 2389-2393.
- WADHAMS, G.W. & ARMITAGE, J.P. (2004) Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature Reviews* 5: 1024-1036.
- WISNIEWSKI-DYE, F. & DOWNIE, J.A. (2002) Quorum-sensing in *Rhizobium*. *Antonie Leeuwenhoek* 81: 397–407.

- XAVIER, K.B. & BASSLER, B.L. (2003) LuxS *quorum sensing*: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* 6: 191-197.
- YAMADA, Y., HOSHINO, K., ISHIKAWA, T. (1997) The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to generic level. *Biosc Biotechnol Biochem* 61: 1244-1251.
- YAMADA, Y., HOSHINO, K., ISHIKAWA, T. (1998) Validation list nr. 64. *Int J Syst Bacteriol* 48: 327-328.

ANEXO I: Pulgões como insetos hospedeiros de *G. diazotrophicus*?

Durante experimentos em casa de vegetação, ocorreu uma infestação com pulgões em algumas plantas inoculadas com a estirpe mutante mut17-5 (*GdluxI::EZ::Tn5*). Estes pulgões foram coletados para avaliar a possível presença de *G. diazotrophicus* no interior destes insetos.

Cinco pulgões, obtidos de plantas inoculadas com o mutante mut17-5 (*GdluxI::EZ::Tn5*) foram colocados em microtubo tipo Eppendorf e desinfetados superficialmente com 1 ml de cloramina T (1%) durante 5 min, sob agitação manual leve para garantir o contato do produto com o animal. Os pulgões foram lavados duas vezes com água destilada estéril e homogeneizados em 1 ml de solução salina. Cem (100) µl deste homogeneizado e de uma diluição do mesmo de 10^{-2} , foram distribuídos em placas LGI-P contendo 50 mg/l de extrato de levedura. Após 5 dias de incubação, foi avaliada a aparência das colônias. Uma placa contendo 100 µl da diluição 10^{-2} do extrato dos pulgões, apresentou 80 colônias com aparência de *G. diazotrophicus*. A quantidade média de bactérias derivada de cada pulgão foi calculada como sendo de aproximadamente 16000 ($10 \times 10^2 \times 80 / 5 =$ [correção alíquota 100 µl] x [fator da diluição] x [quantidade de colônias] / [quantidade de pulgões]). Reações de PCR foram realizadas com material de colônias e os primers AD e 1440, específicos para o gene 23S rDNA de *G. diazotrophicus* (Kirchhof *et al.*, 1998). Para 5 colônias, escolhidas aleatoriamente, bandas do tamanho esperado para *G. diazotrophicus* foram observados, sugerindo que as colônias foram da espécie *G. diazotrophicus* (Figura 1 a).

Com o objetivo de verificar se as bactérias com características de *G. diazotrophicus* tinham sido retiradas da planta pelo pulgão, foi feito um experimento de PCR com o par de primers 42R/43R, que amplificam o locus do gene *GdluxI*. Neste experimento, 10 colônias provenientes dos pulgões foram analisadas. Todos os isolados apresentaram uma banda representando o locus *GdluxI* selvagem, como foi o caso quando DNA ou uma colônia de PAL5 selvagem foram testados (Figura 1 b). Uma banda maior, do tamanho esperado para o locus mutante *GdluxI::EZ::Tn5*, foi observada para o DNA do mutante mut17-5, que tinha sido inoculado na planta que foi colonizada pelos pulgões (Figura 1 b). Quando o material de colônia deste mutante foi usado em uma reação de PCR com os primers 42R/43R, nenhum produto foi observado (Figura 1 b) Uma possível explicação da ausência de uma banda nesta reação, seria uma menor eficiência de PCR a partir de material de colônia, quando comparado

com PCR com DNA. Não foi possível, então, avaliar se o pulgão carrega, de alguma forma, a *G. diazotrophicus* que está colonizando a planta que ele infecta. Mas os dados indicam que, aparentemente, o pulgão já carregava as bactérias da espécie *G. diazotrophicus*. A determinação da espécie à qual o pulgão pertence será realizada no laboratório de controle biológico da Embrapa Agrobiologia.

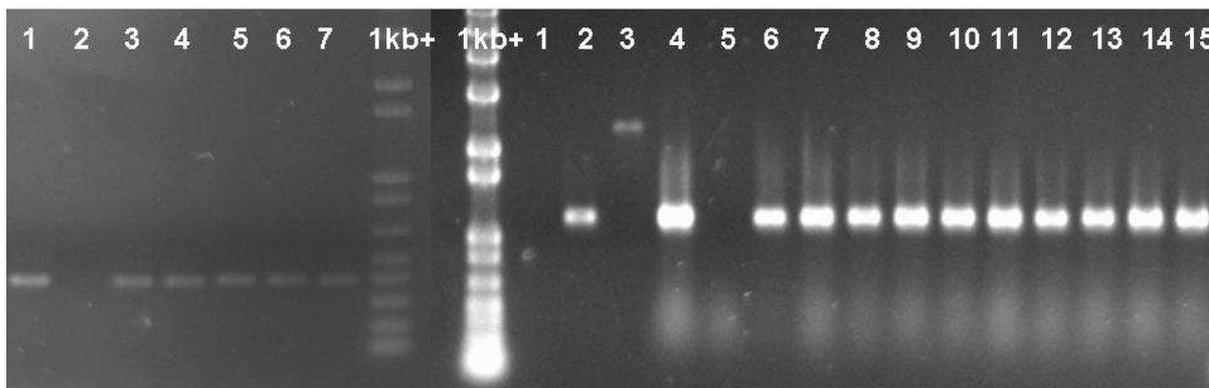


Figura 1: Análise de PCR de colônia de *G. diazotrophicus* isolada de pulgões. a.) Bactérias isoladas de pulgões em meio de cultura semi-seletivo LGI-P foram submetidas a PCR de colônia com primers AD/1440, específicos para *G. diazotrophicus*. Linha 1 e 2: controle positivo (colônia de PAL5) e negativo; linhas 3-7: colônias isoladas de pulgão. b.) PCR com primers 42R/43R, específicos para o locus de *GdluxI*. Linha 1: controle negativo; linha 2: controle positivo (DNA de PAL5); linha 3: controle positivo (DNA mut17-5); linha 4: controle positivo (colônia PAL5); linha 5: controle positivo (colônia mut17-5); linhas 6-15: colônias obtidas de pulgão. 1 Kb+: 1 Kb plus DNA ladder.

Um estudo mostrou a presença de *G. diazotrophicus* e de uma outra espécie de *Gluconacetobacter*, *G. sacchari*, além de outras acetobacteraceae no interior do inseto praga de cana-de-açúcar, a cochonilha (*Saccharococcus sacchari*, *mealy bug* em inglês) (Ashbolt e Inkerman, 1990). Em contraste com os dados aqui apresentados, estes autores não encontraram acetobacteraceae em pulgões, o que eles atribuíram a um pH mais alto no interior destes insetos, o que seria incompatível com a presença de *G. diazotrophicus*. Um estudo mais recente utilizou a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para estudar a importância quantitativa de *G. sacchari* no interior de *Saccharococcus sacchari*, e chegaram à conclusão que *G. sacchari* representa apenas uma menor proporção da população microbiota presente neste inseto (Franke *et al.*, 2000). Portanto, para avaliar a importância da presença de *G. diazotrophicus* nos pulgões, experimentos populacionais deverão ser realizados. Mesmo

assim, a quantidade estimada de bactérias presente nos pulgões, neste estudo, foi acima de 10000, o que parece ser um número bastante elevado, considerando que o peso de 1 pulgão é menor do que 1 mg.

Análise de PCR mostrou também que o gene *GdluxI* nos isolados de *G. diazotrophicus* foi selvagem (Figura 26), enquanto os insetos foram isolados de plantas inoculadas com o mutante mut17-5, com o gene *GdluxI* mutante. Portanto, estes dados indicam que a *G. diazotrophicus* encontrada no interior do pulgão não originou da planta inoculada, sugerindo que o pulgão já carregava *G. diazotrophicus* antes de infectar as plantas de cana-de-açúcar do experimento. Obviamente, esta conclusão é válida apenas no caso da estabilidade genética da mutação no gene *GdluxI* no mutante mut17-5 dentro da planta. Porém, os dados obtidos para o mutante C12 (Figura 17) indicam que as inserções do elemento EZ::Tn5 são geneticamente estáveis. Portanto, estes dados mostram que o elemento EZ::Tn5 pode ter um potencial para o uso como marcador molecular em estudos ecológicos.

Referências bibliográficas

Ashbolt, N.J. e Inkerman, P.A. (1990) Acetic acid bacterial biota of the pink sugar cane mealybug, *Saccharococcus sacchari*, and its environs. *Appl Environ Microbiol* 56: 707-712.

Franke, I.H., Fegan, M., Hayward, C., Leonard, G., Sly, L.I. (2000) Molecular detection of *Gluconacetobacter sacchari* associated with the pink sugarcane mealybug *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell) and the sugarcane leaf sheath microenvironment by FISH and PCR. *FEMS Microbiol Ecol* 31: 61-71.

Kirchhof, G., Baldani, J.I., Reis, V.M. e Hartmann, A. (1998) Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues. *Can J Microbiol* 44: 12-19.

ANEXO II: Comunicado Técnico

Comunicado técnico 84, publicado na Embrapa Agrobiologia em março de 2006 (ISSN 1517-8862)

Título: Transformação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5 pela técnica de eletroporação

Luc Felicianus Marie Rouws
Adriana Silva Hemerly
José Ivo Baldani

Introdução

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria aeróbica, Gram-negativa, com capacidade de fixar N₂, originalmente isolada do interior de raízes, colmos e folhas da cana-de-açúcar (Cavalcante & Döbereiner, 1988; Gillis et al., 1989). Esta bactéria também já foi encontrada em batata doce (*Ipomoea batatas*), capim colônia (*Pennisetum purpureum*, café (*Coffea arabica*) e abacaxi (*Ananas comosus*) (Baldani & Baldani, 2005) para uma revisão). A estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* promove o crescimento da cana-de-açúcar, em parte, através da fixação de nitrogênio, porém, outros mecanismos, possivelmente a produção de auxinas e giberelinas estão envolvidos também (Sevilla et al., 2001; Bastian et al., 1998). As características de promotora de crescimento fazem dela uma bactéria com potencial biotecnológico para a agricultura.

Atualmente, a seqüência completa do genoma da estirpe PAL5 está sendo determinada em um projeto da rede Riogene (www.riogene.lncc.br), no qual a Embrapa Agrobiologia é uma das instituições parceiras. As informações genéticas geradas por este seqüenciamento, darão um impulso no conhecimento e no entendimento sobre os processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos no efeito positivo da bactéria sobre o crescimento da cana-de-açúcar.

Na fase seguinte ao seqüenciamento, ou seja, a fase pós-genômica, os dados gerados serão usados como subsídio para estudos de laboratório com o objetivo final de otimizar os efeitos positivos nesta interação. Para os estudos de engenharia genética é importante possuir um método de transformação gênica que possibilite intervir, em nível molecular, na genética da bactéria. Estudos sobre os mecanismos de expressão e de regulação dos genes bacterianos envolvidos no processo de promoção do crescimento da cana-de-açúcar são exemplos da necessidade de transformação gênica.

O desenvolvimento de métodos para a realização de mutagênese sítio-dirigida ou aleatória, e marcação da bactéria com genes de resistência a antibióticos ou genes repórter, devem considerar as particularidades da espécie bacteriana utilizada. Uma técnica rápida e simples, que é amplamente usada para a transformação de bactérias, é a eletroporação. Para que as células possam ser transformadas por este processo elas devem ser eletrocompetentes, ou seja, com capacidade para receber fragmentos de DNA exógeno através de poros temporariamente formados na membrana celular, induzidos por um pulso elétrico de alta voltagem.

A eletrocompetência celular é conseguida pela coleta das células em fase de crescimento exponencial seguida por sucessivas lavagens que visam à remoção de íons e impurezas do meio extracelular. Para cada espécie de bactéria é necessário determinar as condições adequadas de lavagem e de eletroporação.

Este trabalho descreve o desenvolvimento de um protocolo de transformação para a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* com o plasmídeo de pKT230, pela técnica de eletroporação.

Condições de cultivo das bactérias

A estirpe DH10B de *Escherichia coli*, utilizada como hospedeiro para a clonagem e a multiplicação de plasmídeos, foi cultivada a 37°C em meio Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989). Para o cultivo de *G. diazotrophicus* estirpe PAL5, foram usados meio Dygs (2 g/l glicose, 1,5 g/l peptona, 2 g/l extrato de levedura, 0,5 g/l K₂HPO₄, 0,5 g/l MgSO₄.7H₂O, pH6) e meio C2 (10 g/l peptona, 15 g/l glicose, 5 g/l NaCl e 5 g/l extrato de levedura, pH6). Para os meios sólidos foi adicionado 15 g/l de agar. O uso do meio de cultura C2 e da solução de glicerol de 10% neste trabalho foi baseado em relatos anteriores sobre a eletroporação (Teixeira et al., 1999).

Preparação de células eletrocompetentes de *G. diazotrophicus* estirpe PAL5

As células eletrocompetentes foram preparadas da seguinte forma (Figura 1): um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura C2 foi inoculado com uma colônia da estirpe PAL5, obtida de uma cultura fresca em meio Dygs sólido. Esta pré-cultura foi incubada a 200 rpm a 30°C até atingir a fase logarítmica de crescimento (24 horas de crescimento). Dois mL desta pré-cultura foram transferidos para um frasco do tipo Erlenmeyer com volume de dois litros contendo 200 mL de meio de cultura C2 líquido. Esta cultura foi incubada sob as mesmas condições da pré-cultura, durante aproximadamente 20 horas, até atingir uma densidade ótica de 0,6 a 0,7 no comprimento de onda de 600 nm. O frasco contendo as células foi então resfriado sobre gelo por 30 minutos. A partir deste momento, todas as etapas foram realizadas sobre gelo, inclusive as soluções usadas as quais foram autoclavadas e resfriadas antes do uso. A cultura de 200 mL foi distribuída em 4 tubos do tipo Falcon com 50 mL cada, e centrifugada durante 10 minutos a 4.000 rpm, 4°C em rotor de ângulo fixo (centrifuga Eppendorf 5810R) para precipitar as células. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados em posição invertida sobre papel absorvente durante 5 segundos para possibilitar a drenagem completa do sobrenadante. Foi adicionado 50 mL de glicerol 10% a cada tubo. Os sedimentos bacterianos foram ressuspensos, evitando bruscos movimentos dos tubos. Esta etapa é demorada e leva cerca de uma hora. Após a completa ressuspensão, as células foram novamente centrifugadas (4.000 rpm, 4°C, 10 min) e o sobrenadante descartado. A lavagem com glicerol 10% foi repetida sob as mesmas condições descritas acima. A segunda etapa de ressuspensão das células é mais rápida que a primeira, já que parte das impurezas extracelulares foi removida durante a primeira lavagem, diminuindo a coesão nos sedimentos. As células foram novamente centrifugadas (4.000 rpm, 4°C, 10 min) e os sedimentos foram ressuspensos em 4 mL de glicerol 10%. Observe-se que a quantidade de glicerol nesta última etapa pode variar conforme a quantidade de células obtida. Após a completa ressuspensão, as células eletrocompetentes foram distribuídas em alíquotas de 100 µl em tubos do tipo Eppendorf, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -70 °C para uso futuro.

Preparação do plasmídeo de teste pKT230

O plasmídeo pKT230 (Bagdasarian et al., 1981), que contém um gene de resistência ao antibiótico canamicina é do grupo de incompatibilidade IncQ e é compatível com a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*. Por este motivo o plasmídeo pKT230 foi escolhido como DNA de teste para avaliar a eficiência do método de eletroporação.

O plasmídeo foi obtido da seguinte forma: o plasmídeo pMSKC4 (Sevilla e Kennedy, 2000), que é uma construção repórter baseado no plasmídeo pKT230, foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen) para remover o gene repórter *cobA*; após a digestão os fragmentos de DNA foram separados usando eletroforese de gel de agarose, e a banda correspondente ao plasmídeo pKT230 foi isolada. Este fragmento foi tratado com ligase T4 (Invitrogen) para restaurar o plasmídeo pKT230 na forma circular. O plasmídeo foi

transferido para a estirpe DH10B de *E. coli* pela eletroporação usando o equipamento “electro cell manipulator 600” (BTX Inc. EUA), para a sua multiplicação. A preparação do plasmídeo para a eletroporação da estirpe PAL5 foi realizada pela lise alcalina, conforme descrito em Sambrook et al. (1989).

A eletroporação da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*

Com o objetivo de determinar o funcionamento e a eficiência do método de eletroporação da estirpe PAL5, um experimento de eletroporação com o plasmídeo pKT230 foi realizado (Figura 2). Alíquotas de 100 µl de células de PAL5 eletrocompetentes foram descongeladas sobre gelo por aproximadamente 10 minutos. Em eletrocubetas com espaço de 2 mm (BIO-RAD) previamente geladas foi colocado até 1 µg de DNA do plasmídeo de teste pKT230, seguido de 100 µl de células eletrocompetentes. A cubeta foi incubada sobre gelo por 2 minutos, e colocada entre os eletrodos do equipamento “electro cell manipulator 600” (BTX Inc. EUA). Foi aplicado um pulso elétrico com os seguintes parâmetros: 186 Ω, high voltage, 2,5 kilovolts, constante de tempo ~0,8 msec. Imediatamente após o pulso, 2 mL de meio C2 (30°C) foram adicionados. A suspensão de células em meio C2 foi homogeneizada e transferida para um tubo do tipo Falcon de 15 mL e incubada em incubadora durante 2 horas a 30°C com rotação de 200 rpm para possibilitar a recuperação das células e a expressão dos genes introduzidos durante a transformação. Posteriormente, as células foram distribuídas em placas com meio Dygs contendo 200 µg/mL de canamicina. Estas placas foram incubadas a 30°C durante 3 dias, até que as colônias pudessem ser visualizadas (Figura 3).

O número observado de colônias de PAL5 e a quantidade de DNA usada, foram combinados para determinar a eficiência da transformação, que foi 1×10^3 a 3×10^3 de transformantes por µg de DNA. Não houve formação de colônias resistentes nos controles negativos (células eletroporadas na ausência de DNA), demonstrando que a resistência observada para PAL5 foi devido à presença desse plasmídeo (Figura 3).

Verificação da identidade dos transformantes pelo método de PCR

A confirmação da identidade dos transformantes de PAL5 obtidos por eletroporação foi realizada pela amplificação de uma seqüência espécie-específica presente no gene 23S DNAr desta bactéria. Os primers usados nas reações de PCR de colônias foram: primer AD (5'-TGC GGC AAA AGC CGG AT-3') e primer 1440 (5'-GTT GGC TTA GAA GCA GCC-3') (Kirchhof et al., 1998). As reações foram realizadas usando um kit de Taq polimerase (Invitrogen) em volume total de 50 µl contendo: 1 U Taq polimerase, 5 µl tampão (10x), 4 mM MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 50 pmol de primer AD e 50 pmol de primer 1440. Junto a esta mistura foi adicionado o material de uma colônia, tirado de uma placa, usando ponteiras de pipeta de plástico. No controle positivo foi utilizado material de uma colônia de PAL5 não transformado, e no controle negativo 1 µL de água foi adicionado. As misturas de PCR foram preparadas e levadas ao termociclador, onde foram submetidas ao seguinte programa: 3 minutos a 93°C, 30 ciclos de 45 segundos a 93°C, 45 segundos a 60°C e 60 segundos a 72°C, seguido por mais 10 minutos de extensão a 72°C.

A amplificação do fragmento espécie-específico do gene 23S DNAr por PCR a partir das colônias de PAL5 confirmou a capacidade de transformação da estirpe PAL5 pelo protocolo de eletroporação (Figura 4). Em alguns casos, colônias de bactérias contaminantes foram observadas. Algumas destas colônias também foram submetidas ao PCR sob as mesmas condições. Nestes casos não houve amplificação, confirmando a identidade dos transformantes como derivados de PAL5 e a confiabilidade da reação de PCR como ferramenta auxiliar de seleção. Vale mencionar que o aparecimento de bactérias contaminantes ocorreu em um nível baixo e não prejudicou a geração de transformantes. Em

subsequentes experimentos de eletroporação, o aparecimento destes contaminantes pôde ser eliminado.

Isolação do plasmídeo pKT230 dos transformantes de PAL5

Com o objetivo de confirmar a presença de pKT230 nos transformantes de PAL5, o isolamento de DNA plasmideal de um transformante foi realizado pelo método de lise alcaline (Sambrook et al., 1989). O DNA extraído do transformante e o plasmídeo pKT230 original foram tratados com a endonuclease *EcoRI* (Invitrogen) e separados e visualizados em gel de agarose.

O plasmídeo isolado do transformante de PAL5 foi do mesmo tamanho (11.8 kb) do plasmídeo pKT230 original, confirmando que pKT230 estava presente e pode ser multiplicado nesta bactéria (Figura 5).

Conclusão

O protocolo desenvolvido apresenta-se simples e rápido para a transformação gênica da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*, pela técnica de eletroporação. Este protocolo é imprescindível como ferramenta para a geração de mutantes e a engenharia genética desta bactéria.

Agradecimentos: Pronex 2003 CNPq/Faperj, CNPq

Referências

Bagdasarian, M., Lurz, R., Ruckert, B., Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M.M., Frey, J. & Timmis, K. (1981) Specific-purpose plasmid cloning vectors II. Broad host range, high copy number, RSP1010 derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene*, 16: 237-247.

Baldani, J.I. & Baldani, V.L. (2005) History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An Bras Acad Cienc*, 77: 549-79.

Bastian, F., Cohern, A., Piccoli P., Luna V., Baraldi, R. & Bottini, R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A(1) and A(3) by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul*, 24: 7-11.

Cavalcante, V.A. & Döbereiner J. (1988). A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108: 23-31.

Gillis, K., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R.M., Stephan, M.P., Teixeira, K.R.S., Döbereiner, J. and De Ley, J. (1989) *Acetobacter diazotrophicus* sp. Nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int J Syst Bact*, 39: 361-364.

Kirchhof, G., Baldani, J.I., Reis, V.M. & Hartmann, A. (1998) Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues. *Can J Microbiol*, 44: 12-19.

Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory press, New York, USA.

Sevilla, M., Burris, R.H., Gunapala, N. & Kennedy, C. (2001) Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and mutant strains. *Mol Plant Micr Interact*, 14: 358–366.

Sevilla, M. & Kennedy, C. (2000) em: Ladha JK and Reddy PM, editors. 2000. The quest for nitrogen fixation in rice. Proceedings of the third working group meeting on assessing opportunities for nitrogen fixation in rice, 9-12 aug, 1999. Los Baños Laguna, Philippines. Makati City (Philippines): International Rice Research Institute. 354 p.

Teixeira, K.R.S., Wülling, M., Morgan, T., Galler, R., Zeller mann, E-M., Baldani, J.I., Kennedy, C. & Meletzus, D. (1999) Molecular analysis of the chromosomal region encoding the *nifA* and *nifB* genes of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol Lett*, 176: 301-309

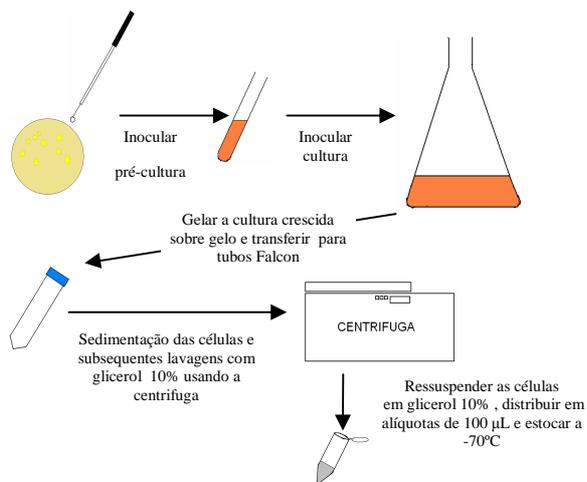


Figura 1: Representação esquemática da preparação de células electrocompetentes da estirpe PAL5

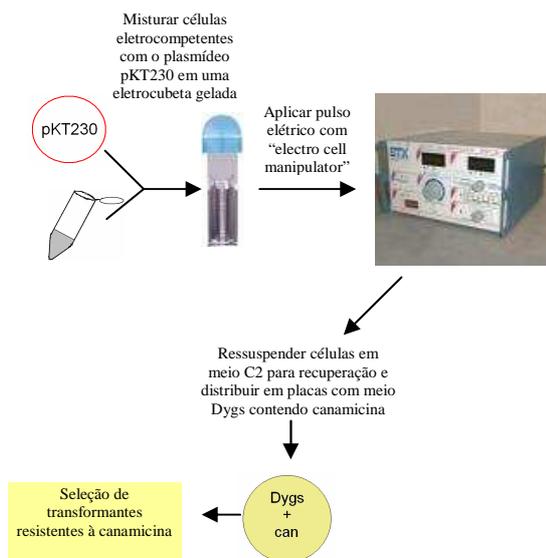


Figura 2: Representação esquemática do processo de eletroporação e seleção de transformantes

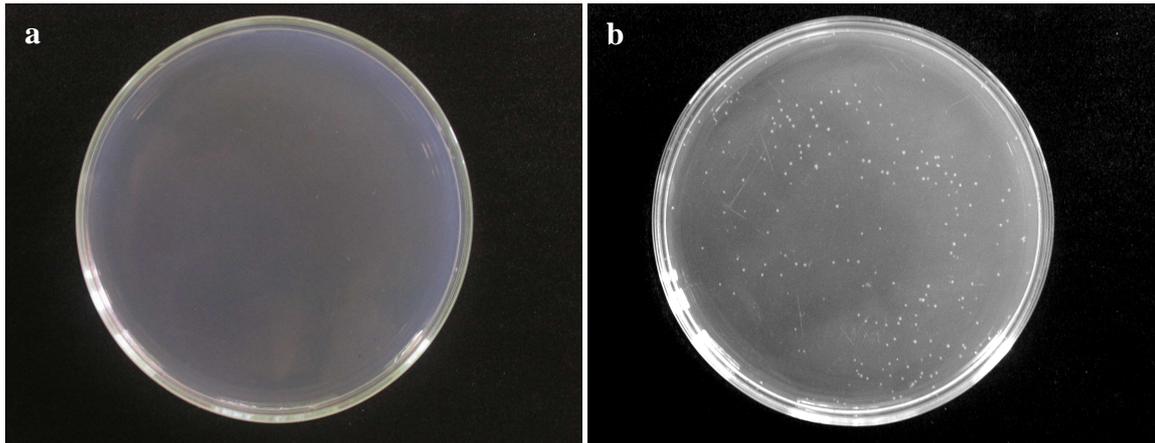


Figura 3: Recuperação da estirpe PAL5 após a eletroporação. Células foram eletroporadas na ausência (a) ou na presença (b) de 500 ng de DNA do plasmídeo pKT230. As células foram distribuídas em placas com meio Dygs contendo 200 µg/mL canamicina e a avaliação ocorreu após 3 dias de incubação a 30°C.

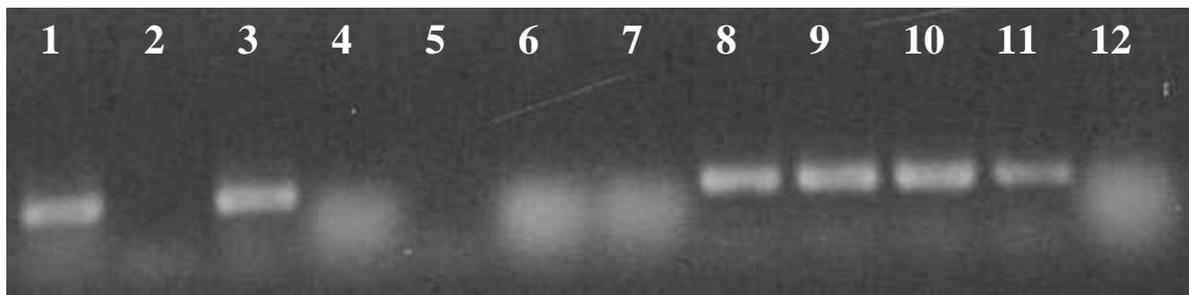


Figura 4: Reação de PCR a partir de colônias de transformantes da estirpe PAL5 e de colônias de bactérias contaminantes, usando os primers AD e 1440, específicos para o gene 23S DNAr de *G. diazotrophicus*. Colônias derivadas de PAL5 (linhas 8, 9, 10, 11) e colônias contaminantes (linhas 4, 5, 6, 7, 12). Linha 1: controle positivo (PCR com 40 ng de DNA de PAL5), Linha 2: controle negativo (PCR com água), Linha 3: controle positivo (PCR com colônia de PAL5 selvagem).

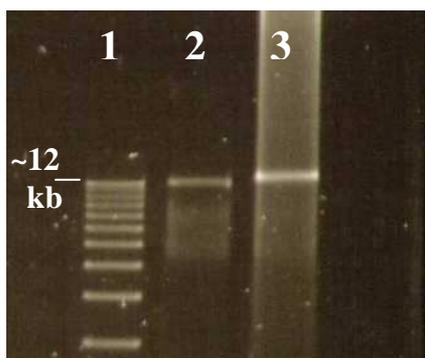


Figura 5: O plasmídeo pKT230 (Linha 2) e o plasmídeo extraído da estirpe PAL5 transformada (Linha 3), digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*. Linha 1: marcador molecular *1 Kb plus DNA ladder* (Gibco).

ANEXO III: Artigo publicado na revista “Archives of Microbiology”.

Archives of Microbiology, vol 189(4): páginas 397-405, Abril de 2008.

Publicação eletrônica: 5 de dezembro de 2007.

Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant

Luc F.M. Rouws^{1,2}, Jean L. Simões-Araújo¹, Adriana S. Hemerly^{2,3}, José I. Baldani¹

¹ CNPAB/EMBRAPA, BR465, Km7, 23890-000, Seropédica, RJ, Brazil

² Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³ Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rua Pacheco Leão 915, 22460-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

* ibaldani@cnpab.embrapa.br

Abstract *Gluconacetobacter diazotrophicus* is a nitrogen-fixing bacterium, which was originally isolated from the interior of sugarcane plants. The genome of strain PAL5 of *G. diazotrophicus* has been completely sequenced and a next step is the functional characterization of its genes. The aim of this study was to establish an efficient mutagenesis method, using the commercial Tn5 transposon EZ::Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ (Epicentre). Up to 1×10^6 mutants per μg of transposome were generated in a single electroporation experiment. Insertion-site flanking sequences were amplified by inverse PCR and sequenced for 31 mutants. For 10 of these mutants, both insertion flanks could be identified, confirming the 9 bp duplication that is typical for Tn5 transposition. Insertions occurred in a random fashion and were genetically stable for at least 50 generations. One mutant had an insertion in a homolog of the flagellar gene *flgA*, and was therefore predicted to be affected in flagella-dependent traits and used to validate the applied mutagenesis methodology. This mutant lacked flagella and was non-motile on soft agar. Interestingly, it was also strongly affected in the ability to form biofilm on glass wool.

Abbreviations

Tz Transposon-like DNA element from EZ::Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™
IPCR Inverse PCR

Key words Nitrogen-fixing bacteria, Endophytes, Transposome, Inverse PCR, Flagella, Motility, Biofilm

Introduction

Gluconacetobacter diazotrophicus is a Gram-negative diazotrophic bacterium that was originally isolated from apoplastic fluids of Brazilian sugarcane (Cavalcante and Döbereiner 1988; Gillis et al. 1989), which may obtain up to 60% of its nitrogen from biological nitrogen fixation (Lima et al. 1987; Boddey et al. 2003). *G. diazotrophicus* appears to be highly adapted to life inside the sugarcane plant since its optimal growth occurs at 10% sucrose and pH 5.5; conditions found inside this plant (Baldani and Baldani 2005). Additionally, *G. diazotrophicus* is assumed to play an important role in biological nitrogen fixation in association with the sugarcane plant (Sevilla et al. 2001).

The sugarcane plant has been shown to alter the transcriptional levels of its genes in response to inoculation with *G. diazotrophicus* PAL5 (Vinagre et al. 2006; Cavalcante et al. 2007; Rocha et al. 2007). Conversely, very little is known about the mechanisms that *G. diazotrophicus* uses to enable host-plant infection and the establishment of a beneficial interaction. In other bacterial species, motility, biofilm formation, production of signaling molecules and *quorum sensing* are involved in this kind of interaction (Danhorn and Fuqua 2007). Such mechanisms may be expected to act in the interaction between sugarcane and *G. diazotrophicus* as well.

Several aspects of the genetics of nitrogen fixation have been investigated in this micro-organism. A cluster of *nif* and *fix* genes from PAL5 has been identified (Lee et al. 2000) and the characterization of several aspects of the regulation of nitrogen fixation and nitrogen metabolism have been reported (Teixeira et al. 1999; Ureta et al. 2001; Perlova et al. 2002, 2003).

Inoculation experiments with a *nifD* non-N₂-fixing mutant showed that *G. diazotrophicus* promotes plant growth through nitrogen fixation, although other growth promoting factors are involved (Sevilla et al. 2001). The *in vitro* production of indole-acetic acid and gibberellins by this bacterium has been shown (Fuentes-Ramírez et al. 1993; Bastián et al. 1998) and may provide an explanation for the observed growth-promotion by the *nifD* mutant. However, the biosynthetic pathways of these substances in *G. diazotrophicus* remain unknown.

The determination of the complete PAL5 genome sequence should help to form a better understanding of mechanisms that enable a beneficial interaction with the host plant. Nevertheless, for many new genes, difficulties to assign exact functions make bench-studies indispensable. A powerful tool in these studies is transposon mutagenesis, which has been reported for *G. diazotrophicus* (Lee et al. 2004). However, the only mutation extensively described by these authors appeared not to be linked to the transposon insertion. Also, transformation by means of conjugation, reported in that study, requires laborious selection procedures to purify transformants from donor bacteria.

Goryshin et al (2000) described the Tn5 based transposome system. The transposable element of the transposome contains a kanamycin resistance gene, flanked at both sides by the 19 bp inverted repeat of the Tn5 transposon. This element is complexed *in vitro* with a hyperactive transposase protein, forming the functional transposome, which can be transferred to bacterial cells by electroporation. The transposome has been successfully used in a wide range of bacteria. Mutagenesis with the transposome system has also been successful for plant pathogenic bacteria from genera such as *Xylella* (Guilhabert et al. 2001; Koide et al. 2004, Li et al. 2007), *Xanthomonas* (Sun et al. 2003) and *Pseudomonas* (Bretz et al. 2002). However, to our knowledge, the use of the transposome system has not been reported for an endophytic plant growth promoting bacteria such as *G. diazotrophicus*.

Here, a procedure is described to generate large numbers of random and genetically stable insertional mutants of *G. diazotrophicus* strain PAL5 by electroporation with the Tn5 transposon EZ::Tn5TM <KAN-2>Tnp TransposomeTM (Epicentre). The exact insertion site of the transposon-like element (Tz) in 31 mutants was identified by inverse PCR (IPCR) followed by sequencing. One mutant, designated strain C12, with an insertion in a homolog of the flagellar *flgA* gene was used to validate the mutagenesis methodology.

Materials and methods

Cultivation conditions

G. diazotrophicus strain PAL5 (BR 11281) was obtained from the Embrapa Agrobiologia Culture Collection and was grown at 30°C in C2 medium (Teixeira et al. 1999) or in Dygs medium containing (g/l) (glucose, 2.0; glutamic acid, 1.5; peptone, 1.5; K₂HPO₄, 0.5; MgSO₄ .7H₂O, 0.5; yeast extract, 2.0; pH 6.0) (Rodrigues Neto et al. 1986). Media were supplemented with 200 µg/ml kanamycin when necessary. For solid media, 15 g/l of agar was added.

Electroporation of *G. diazotrophicus* PAL5 cells with transposome

In a chilled 0.2 cm-gap-electroporation cuvette, 1 µl of transposome composed of 0.1 pmol of the transposon-like element (Tz) (Fig. 1) and 1 U of EZ::Tn5TM transposase was mixed with 100 µl of electrocompetent cells, prepared as described previously (Teixeira et al. 1999). The cuvette was placed between the electrodes of an electro cell manipulator 600 manifold (BTX) and submitted to a pulse with the following settings: high voltage mode, 2.5 kV, 186 Ω and a time constant of 8 ms. Immediately after the pulse, 2 ml of liquid C2 medium was added and the cells were incubated for 2 hours at 30°C with shaking at 150 rpm to enable cell recovery and expression of the marker gene of the Tz element. The transformed cells were selected on Dygs plates amended with 200 µg/ml kanamycin. After 3 d incubation at 30°C the appearance of bacterial colonies was evaluated.

DNA manipulations, sequencing and sequence analyses

For total DNA extractions, cells from 1 ml of de um dia para o outro grown cultures in Dygs liquid media were spun down and DNA was isolated using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega).

For *Southern blot* analyses, approximately 1 µg of total DNA was completely digested with restriction enzyme *EcoRI*, separated on 0.7% agarose gel and transferred to Hybond-N membranes. Hybridization was essentially as described (Sambrook et al. 1989), using a *BamHI/XhoI* fragment of the Tz element (Fig.1), labeled with α³²P-dCTP.

In order to determine insertion sites, a methodology based on IPCR as described by Martin and Mohn (1999) was used. For IPCR to work, it was important to use frequent-cutting restriction enzymes, because smaller fragments are more easily amplified in subsequent PCR reactions. The restriction enzymes *PstI* and *PvuI*, that cut the Tz element once, but have frequent restriction sites in the PAL5 genome, were chosen to completely digest genomic DNA. Digested DNA was treated with T4 DNA ligase (Promega) to circularize the linear fragments, which were then used in PCR reactions. Apart from primers

FP-1 (ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC) and RP-1 (GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG), included in the EZ::Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ kit, two additional primers, PVU-LEFT (GAAAAACAGCATTCCAGGTATTAGA) and PVU-RIGHT (GAAAAACAGCATTCCAGGTATTAGA), were designed to enable the amplification of both Tz-flanking sequences (Fig 1). PCR on *Pst*I-digested and religated DNA was done with primer pair FP-1/RP-1, thus amplifying the “RP-1 flank” of the insertion. For *Pvu*I digested and religated DNA, the “RP-1 flank” as well as the “FP-1 flank” could be amplified using primer pairs RP-1/PVU-LEFT and FP-1/PVU-RIGHT, respectively. PCR products were purified using the Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega). These products were then sequenced using the DYEnamic ET terminator kit (GE Healthcare) with primer FP-1 or RP-1 on a MegaBace 1000 sequencing device (GE Healthcare).

The flanking sequences of insertion sites were analyzed by comparison to public translated DNA sequence databases using BLAST software (Antschul et al. 1997). The signal sequence in the *flgA* homolog in mutant strain C12 was identified with the SMART software (Schultz et al. 1998; Letunic et al. 2004).

Genetic stability assay

To check the stability of the Tz insertions in the PAL5 genome, *Southern blot* experiments were performed with *Eco*RI-digested DNA from 7 mutants (A8, A9, A10, B2, B3, B8, B12) before and after prolonged cultivation. All mutant strains were cultivated during 6 passages in liquid Dygs culture medium amended with kanamycin. Since bacteria were diluted 500x from a culture with OD₍₆₀₀₎=0.8 and then grown until reaching the same OD₍₆₀₀₎=0.8, approximately 9 generations ($2^9=512$) were estimated to occur during each passage. Therefore, the quantity of generations was estimated to be at least 50 during this experiment.

Motility assay

Motility agar was based on LGI-P medium (Reis et al. 1994) containing 5% glucose as a carbon source and 0.25% agar. Bacteria from Dygs plates were inoculated using pipet tips on the centre of 90 mm plates containing motility agar. The colony diameter was evaluated after 3 d of growth at 30°C.

Biofilm assay

For biofilm assays, single bacterial colonies from 3 day old cultures on Dygs plates were inoculated in 125 ml erlenmeyer flasks containing 50 ml liquid modified LGI medium (Cavalcante and Döbereiner 1988), pH5.5, containing 1 mM glutamic acid and 0.1 g of glass wool (Leco Co., USA). These cultures were grown for 72 h at 30°C and 150 rpm.

Quantification of the biofilm was done basically as described by O'Toole and Kolter (1998). Briefly, the growth medium was removed and the glass wool was stained with 1% crystal violet solution during 10 min. Flasks were washed 4 times with 100 ml of 0.7% NaCl solution during 15 min under agitation at 150 rpm. Crystal violet was extracted from the glass wool with 4 ml 95% ethanol and quantified by measuring the absorbance at 560 nm. Data from 4 independent repetitions were analyzed with Tukey's test at $p<0.05$.

Transmission electron microscopy

For electron microscopy, cells from 3 d old cultures on motility agar plates were suspended in water. This suspension was deposited on Formvar-coated 300 mesh Nickel grids and stained with uranyl acetate accordingly (Sandy S Videira, Embrapa Agrobiologia, not published). Samples were examined under a Zeiss EM900 transmission electron microscope.

Results and Discussion

Efficient generation of PAL5 mutants by electroporation of transposome complexes

Efforts to transform PAL5 cells by electroporation with suicide plasmids carrying the Tn5 derivative mini-transposons pSUP102Cm::Tn5-B20 and pSUP102Cm::Tn5-B21 (Simon et al. 1989) gave high numbers of micro-colonies after 3 d incubation on Dygs plates amended with selective antibiotics for the transposon (kanamycin and tetracyclin respectively) (data not shown). However, these micro-colonies stopped growing at this stage, and were unable to grow after transferring to fresh selective Dygs plates, a phenomenon which has been observed earlier with *X. fastidiosa* (Guilhabert et al. 2001). Functioning of mini-transposons requires the expression of the transposase gene located on the suicide plasmid. Possibly, the temporary presence of the transposon-carrying suicide plasmids may have allowed transient antibiotic resistance in these putative transformants, whereas transposition may not have occurred.

To avoid possible problems with transposase expression in PAL5, the transposome system was used. In an electroporation experiment, in which PAL5 cells were transformed with 20 ng of transposome (Fig. 1), approximately 10^4 normal kan^R colonies were obtained in a first experiment, which represents a transformation efficiency of 5×10^5 cfu/ μ g of transposome. In subsequent experiments, transformation efficiencies of up to 1×10^6 cfu/ μ g transposome were obtained. In control experiments, where cells were electroporated without transposome, no colonies were observed. The transformation efficiencies observed for PAL5 were high when compared to the plant associated bacterium *X. fastidiosa*, for which transformation efficiencies between 1.2×10^3 cfu/ μ g and 7.5×10^4 cfu/ μ g transposome have been reported (Guilhabert et al. 2001; Koide et al. 2004; Li et al. 2007). The observed transformation efficiencies for PAL5 are sufficient for the rapid generation of saturated mutant libraries, as has been reported for *P. aeruginosa* (Jacobs et al. 2003).

Tz insertions occur in a random fashion and are genetically stable

From two different electroporation experiments, 27 putative mutants – 10 mutants (A1–A10 series) from the first, and 17 mutants (B1–B17 series) from the second experiment – were selected for molecular analyses. Ideally, transposon mutants should contain single insertions of the transposon, randomly distributed throughout the genome. In order to verify if this was the case for these 27 mutants, *Southern blot* experiments with *EcoRI*-digested DNA were carried out. Single integrations occurred in 26 mutants as could be concluded from the presence of single bands (Fig. 2a). Only in a single mutant (A7), two integrations apparently took place according to the presence of 2 hybridizing bands. This result was confirmed when the *Southern blot* was repeated with restriction enzyme *EcoRV* (data not shown). The variation in size of the hybridizing bands among the different mutants indicated that the

insertions occurred randomly. Therefore, these *Southern blot* experiments indicated that mutagenesis with transposome generated predominantly single-insertion mutants in a random fashion.

In theory, transposases codified on the host genome might possibly cause transposition and therefore genetic instability of the Tz element. This has been observed in a *Francisella tularensis* mutant, where a Tn10 transposon was shown to move from the original insertion site to another (Lauriano et al. 2003). To check the stability of the insertions in the PAL5 genome, *Southern blot* experiments were performed with DNA from 7 mutants (A8, A9, A10, B2, B3, B8, B12) before and after prolonged cultivation. All mutant strains tested maintained hybridizing bands of the same size after 6 passages in liquid Dygs culture medium, or at least 50 generations (Fig. 2b). Therefore, it was concluded that Tz insertions were genetically stable in the PAL5 genome.

IPCR followed by sequencing allowed Tz insertion site determination

Identification of the exact site of transposon insertions could be achieved by several methods. Our objective was to establish a quick PCR-based method that would dispense cloning procedures. Therefore, a modified form of IPCR as described by Martin and Mohn (1999) was used with restriction enzymes and primers described under materials and methods and in Fig.1.

IPCR followed by sequencing enabled the determination of the exact Tz insertion site for 31 mutants, of which 19 were from the *Southern blot* experiment, and 12 mutants (C1–C12 series) were from a third electroporation experiment (Table 1). The insertion sites for the majority of the mutants from series A and C (except mutants A8, A9 and A10) were determined only by IPCR with the primer combination FP-1/RP-1 on *Pst*I-digested and circularized DNA. For the 17 mutants from the B-series, all primer combinations (FP-1/RP-1, FP-1/PVU-RIGHT, RP-1/PVU-LEFT) were exhaustively tested on *Pst*I and *Pvu*I-digested DNA as described under materials and methods. Therefore, the efficiency of the present IPCR method can be estimated using the success-rate of insertion site identification for the mutants of the B-series. The Tz insertion site was successfully determined for 13 of these (Table 1). No IPCR product could be obtained for one mutant. This may be caused by large spacing between restriction-sites near the insertion site, giving large DNA fragments that are difficult to amplify by PCR (Martin and Mohn 1999). For 3 mutants, sequencing of IPCR products was unsuccessful or gave low-quality sequences that were insufficient for insertion site identification. It may be hypothesized that high GC-content of target DNA complicated sequencing in these cases, because the genome of the phylogenetically related *Gluconobacter oxydans* has an overall GC-content of 60.8% (Prust et al. 2005). Taken together, it can be concluded that for the mutants of the B-series, the success-rate for insertion-site determination by the present IPCR method was 13 out of 17, or approximately 75%.

Proper Tn5 transposition generates a 9 bp direct repeat at the insertion site, caused by the transposition mechanism. Thus, after a proper transposition event, the 9 bps at the insertion site should be found at both sides of the Tz element. This 9 bp duplication was confirmed in all 10 mutants for which both insertion flanking sequences were determined (data not shown), thus demonstrating the occurrence of legitimate transposition.

Four mutants presented Tz insertions in intergenic regions. All the other insertions were in coding regions, which is consistent with the observation that Tn5 seems to have preference for actively transcribed DNA (McKinnon et al. 1985). In 2 mutants (B5 and B9), integrations occurred in ribosomal DNA regions, which might be interpreted as insertion site preference. However, bacteria usually have several copies of ribosomal DNA, and the

insertions in the mutant strains B5 and B9 occurred at distinct sites. Thus, the observation that 2 mutants have insertions in similar genomic regions does not necessarily imply target preference. The mutant A7 with the double Tz insertion had one insertion in a transposon-related gene. Four mutant strains had insertions in (conserved) hypothetical proteins. There were no identical insertion sites found amongst 31 mutants tested.

Phenotypic characterization of mutant strain C12 with an insertion in a putative flagellar gene

DNA sequencing analyses after IPCR allowed verifying that the mutant C12 contained a mutation in a *flgA* homologous gene, which is essential in flagella biosynthesis in *Salmonella* (Nambu and Kutsukake 2000). These authors showed that the *flgA* gene product is transported to the periplasm via the sec secretory pathway where it probably acts as a chaperone to assist the polymerization of the FlgI protein to form the P ring, which is part of the flagellar basal body. Like its *Salmonella* homolog, the predicted FlgA polypeptide from PAL5 has a putative signal-peptide (MTFHVASVCAATLRSA), as indicated by SMART analyses, suggesting that this protein may act in a similar way. *G. diazotrophicus* has peritrichous flagella (Gillis et al. 1989), and therefore we predicted that the mutant strain C12 would be deficient in flagella-dependent traits. To test this hypothesis, which would confirm the efficiency of the transposon mutagenesis system for *G. diazotrophicus*, some experiments were realized.

Wild-type PAL5 was found to display motility on the motility agar described under Materials and methods (Fig. 3a). Some mutants with Tz insertion not expected to influence motility, also showed similar motility (data not shown). In contrast, the mutant strain C12 completely lost motility (Fig. 3b).

Wild-type PAL5, and the mutant strain C12, were investigated by electron microscopy. While several peritrichous flagella were always observed on wild-type cells, none of the mutant cells of C12 had flagella (Fig. 3d). Therefore, it seemed likely that the *flgA*-homologous gene was involved in flagella synthesis in PAL5, and that the inactivation of this gene in mutant strain C12 led to the non-motile and flagella-less phenotype.

Motility by flagella has been shown to be involved in the formation of bacterial biofilms, and a model has been proposed where planktonic bacterial cells depend on flagellar motility to form an initial monolayer of cells on a surface as a first stage in biofilm formation (Pratt and Kolter 1998; O'Toole and Kolter 1998). Therefore, we tested if the flagellar mutant strain C12 was able to form normal biofilms. Strain PAL5 formed biofilms on glass wool in LGI medium, which were visible as small aggregates after 48 h of growth, and which could be stained with crystal violet. After 72 hours of incubation, stained biofilms were visualized in greater detail with a light microscope (Fig. 3e). In contrast to PAL5, the mutant C12 did not adhere and form biofilm on glass wool. The difference in biofilm-forming capacity between the wild-type PAL5 and the mutant strain C12 was confirmed by biofilm quantification (Fig. 3f). Together, these data strongly suggest that the *flgA* *G. diazotrophicus* gene was indeed disrupted in strain C12, confirming the efficiency of Tn5 mutagenesis using the transposome system for *G. diazotrophicus*. Besides, our results suggest that the *G. diazotrophicus flgA* gene product is involved in flagella biosynthesis, motility and biofilm-forming capacity. The possible involvement of flagella in biofilm formation by *G. diazotrophicus* is especially interesting since *Sinorhizobium meliloti* flagellar mutants were shown affected both in biofilm-forming capacity and nodule formation (Fujishige et al. 2006).

Conclusively, the data presented here show that electroporation of PAL5 with transposome enabled the rapid generation of elevated numbers of random Tn5 transposon mutants. An adapted form of the IPCR methodology enabled rapid identification of transposon insertion sites, dispensing cloning procedures. Additionally, mutants were shown

to be genetically stable. The robustness of the methodology was reinforced by the observation that a mutant in a putative flagellar gene, as predicted, lacked flagella, motility, and biofilm formation. PAL5 transposon mutant libraries have already been successfully screened for several traits in our lab and have enabled the identification of several genes (not published). Together, these results show the potential of Tn5 transposon mutagenesis with the transposome technology in genetic approaches to study *G. diazotrophicus* physiology and plant-bacterium interactions.

Acknowledgements We would like to thank Geraldo B. da Cruz for his help with electron microscopy and Kátia R.S. Teixeira and Marcia S. Vidal for helpful suggestions. We are grateful to Robert M. Boddey for English corrections and to Stefan Schwab for helpful suggestions and critically reading the manuscript. This study was financially supported by Pronex/Faperj (project number E-26/171.208/2003) and CNPq (project number 50.6355/2004-7). The first author received a CNPq fellowship.

References

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
- Baldani JI and Baldani VL (2005) History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An Bras Acad Cienc* 77:549-79
- Bastián F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R, Bottini R (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A(1) and A(3) by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul* 24:7-11
- Boddey RM, Urquiaga S, Alves BJR, Reis V (2003) Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant Soil* 252:139-149
- Bretz J, Losada L, Lisboa K, Hutcheson SW (2002) Lon protease functions as a negative regulator of type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* 45:397-409
- Cavalcante JJV, Vargas C, Nogueira EM, Vinagre F, Schwarcz K, Baldani JI, Ferreira PCG, Hemeryly AS (2007) Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. *J Exp Bot* 58:673–686
- Cavalcante VA, Döbereiner J (1988) A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108:23-31
- Danhorn T and Fuqua C (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61:401-422
- Fuentes-Ramírez LE, Jiménez-Salgado T, Abarca-Ocampo IR and Caballero-Mellado J (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars in Mexico. *Plant Soil* 154:145-150
- Fujishige NA, Kapadia NN, De Hoff PL, Hirsch AM (2006) Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol* 56:195–206
- Gillis K, Kersters K, Hoste B, Janssens D, Kroppenstedt RM, Stephan MP, Teixeira KRS, Döbereiner J, De Ley J (1989) *Acetobacter diazotrophicus* sp. Nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *Int J Syst Bact* 39:361-364
- Goryshin IY, Jendrisak J, Hoffman LM, Reznikoff WS (2000) Insertional transposon

- mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. *Nature Biotechnol* 18:97-100
- Guilhabert MR, Hoffman LM, Mills DA, Kirkpatrick BC (2001) Transposon mutagenesis of *Xylella fastidiosa* by electroporation of Tn5 synaptic complexes. *Mol Plant-Microbe Interact* 14:701-706
- Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C, Levy R, Chun-Rong L, Guenthner D, Bovee D, Olson MV, Manoil C (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14339–14344
- Koide T, Neto, JFS, Gomes SL, Marques MV (2004) Insertional transposon mutagenesis in the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain with transposome. *Curr Microbiol* 48:247–250
- Lauriano CM, Barker JR, Nano FE, Arulanandam BP, Klose KE (2003) Allelic exchange in *Francisella tularensis* using PCR products. *FEMS Microbiol Lett* 229:195-202
- Lee S, Flores-Encarnación M, Contreras-Zentella M, Garcia-Flores L, Escamilla JE, Kennedy C (2004) Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. *J Bacteriol* 186:5384-5391
- Lee S, Reth A, Meletzus D, Sevilla M, Kennedy C (2000) Characterization of a major cluster of nif, fix and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. *J Bacteriol* 182:7088-7091
- Letunic I, Copley RR, Schmidt S, Ciccarelli FD, Doerks T, Schultz J, Ponting CP, Bork P (2004) SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res* 32:D142–D144
- Lima E, Boddey RM, Döbereiner J (1987) Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N aided balance. *Soil Biol Biochem* 19:165-170
- Li Y, Hao G, Galvani CD, Meng Y, Fuente L, Hoch HC, Burr TJ (2007) Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. *Microbiology* 153:719–726
- Martin VJ and Mohn WW (1999) An alternative inverse PCR (IPCR) method to amplify DNA sequences flanking Tn5 transposon insertions. *J Microbiol Meth* 35:163-166
- McKinnon RD, Wayne JS, Bautista DS, Graham FL (1985) Nonrandom insertion of Tn5 into cloned human adenovirus DNA. *Gene* 40:31-38
- Nambu T and Kutsukake K (2000) The *Salmonella* FlgA protein, a putative periplasmic chaperone essential for flagellar P ring formation. *Microbiology* 146:1171-1178
- O’Toole GA and Kolter R (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30:295–304
- Perlova O, Nawroth R, Zellermann E-M, Meletzus D (2002) Isolation and characterization of the *glnD* gene of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, encoding a putative uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme. *Gene* 297:159-168
- Perlova O, Ureta A, Nordlund S, Meletzus D (2003) Identification of three genes encoding PII-like proteins in *Gluconacetobacter diazotrophicus*: studies of their role(s) in the control of nitrogen fixation. *J Bacteriol* 185:5854-5861
- Pratt LA and Kolter R (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30:285–293
- Prust C, Hoffmeister M, Liesegang H, Wiezer A, Fricke WF, Ehrenreich A, Gottschalk G, Deppenmeier U (2005) Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconacetobacter oxydans*. *Nature Biotechnol* 23:195-200

- Reis VM, Olivares FL, Döbereiner J (1994) Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J Microbiol Biotechnol* 10:401-405
- Rocha FR, Papini-Terzi FS, Nishiyama Jr MY, Vêncio RZN, Vicentini R, Duarte RDC, de Rosa Jr VE, Vinagre F, Barsalobres C, Medeiros AH, Rodrigues FA, Ulian EC, Zingaretti SM, Galbiatti JÁ, Almeida RS, Figueira AVO, Hemerly AS, Silva-Filho MC, Menossi M, Souza GM (2007) Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC Genomics* 8:71
- Rodrigues Neto j, Malavolta Jr VA, Victor O (1986). Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Sum Phytol* 12:16
- Sambrook J, Fritsh EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory press, New York, USA
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5857–5864
- Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C (2001) Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and mutant strains. *Mol Plant-Microbe Interact* 14:358–366
- Simon R, Quandt J, Klipp W (1989) New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. *Gene* 80:161-169
- Sun Q, Wu W, Qian W, Hu J, Fang R, He C (2003) High-quality mutant libraries of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* generated by an efficient transposon mutagenesis system. *FEMS Microbiol Lett* 226:145-150
- Teixeira KRS, Wüiling M, Morgan T, Galler R, Zeller mann E-M, Baldani JI, Kennedy C, Meletzus D (1999) Molecular analysis of the chromosomal region encoding the *nifA* and *nifB* genes of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiol Lett* 176:301-309
- Ureta A and Nordlund S (2001) Glutamine synthase from *Acetobacter diazotrophicus*: properties and regulation. *FEMS Microbiol Lett* 202:177-180
- Vinagre F, Vargas C, Schwarcz K, Cavalcante J, Nogueira EM, Baldani JI, Ferreira PCG, Hemerly AS (2006) SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂-fixing endophytic bacteria association. *J Exp Bot* 57:559-569

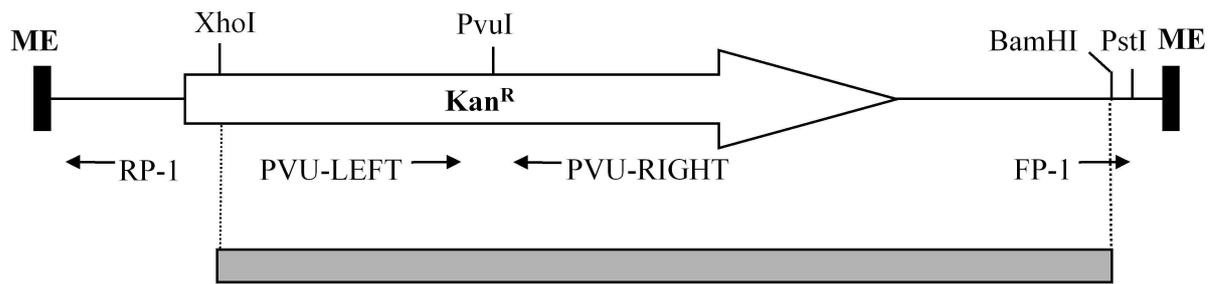
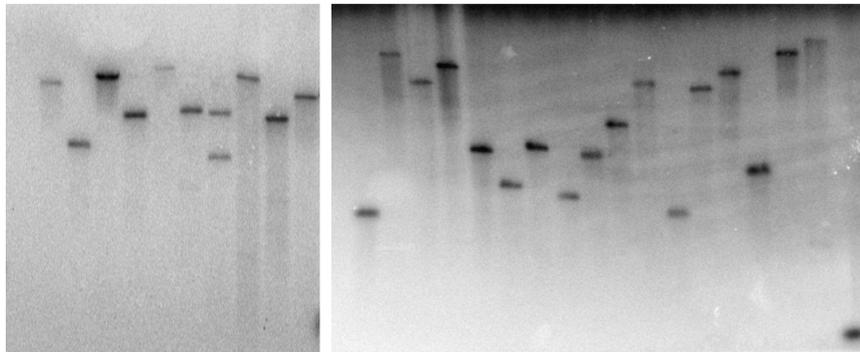


Fig. 1 The transposon-like element Tz of the transposome complex used in this work. The element consists of a kanamycin resistance gene (Kan^R), flanked by the mosaic ends (ME) of the Tn5 transposon. Primers used for IPCR and sequencing are represented by small arrows. The grey box represents the *Bam*HI/*Xho*I-fragment from the Tz element used as a probe in *Southern blot* experiments. Restriction enzymes are indicated. Figure is not to scale.

a. P5 A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9 A10 B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11 B12 B13 B14 B15 B16 B17 +



b.

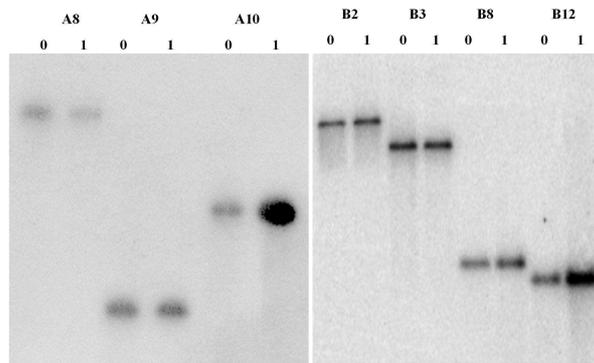


Fig. 2 *Southern blot* analysis of mutant PAL5 strains transformed with transposome. **a** *Southern blot* with *Eco*RI digested total DNA of the 27 randomly chosen transformants from 2 electroporation experiments (A1 to A10 and B1 to B17 series) and of the wild-type strain PAL5 (P5). **b** *Southern blot* experiments with *Eco*RI-digested DNA from 7 random mutants (A8, A9, A10, B2, B3, B8 and B12), isolated after 0 passages (indicated as 0) and after 6 passages (indicated as 1) in liquid Dygs culture medium. Blots were hybridized with a radioactively labeled fragment of the transposon-like element Tz. This fragment was also used as a positive control (+).

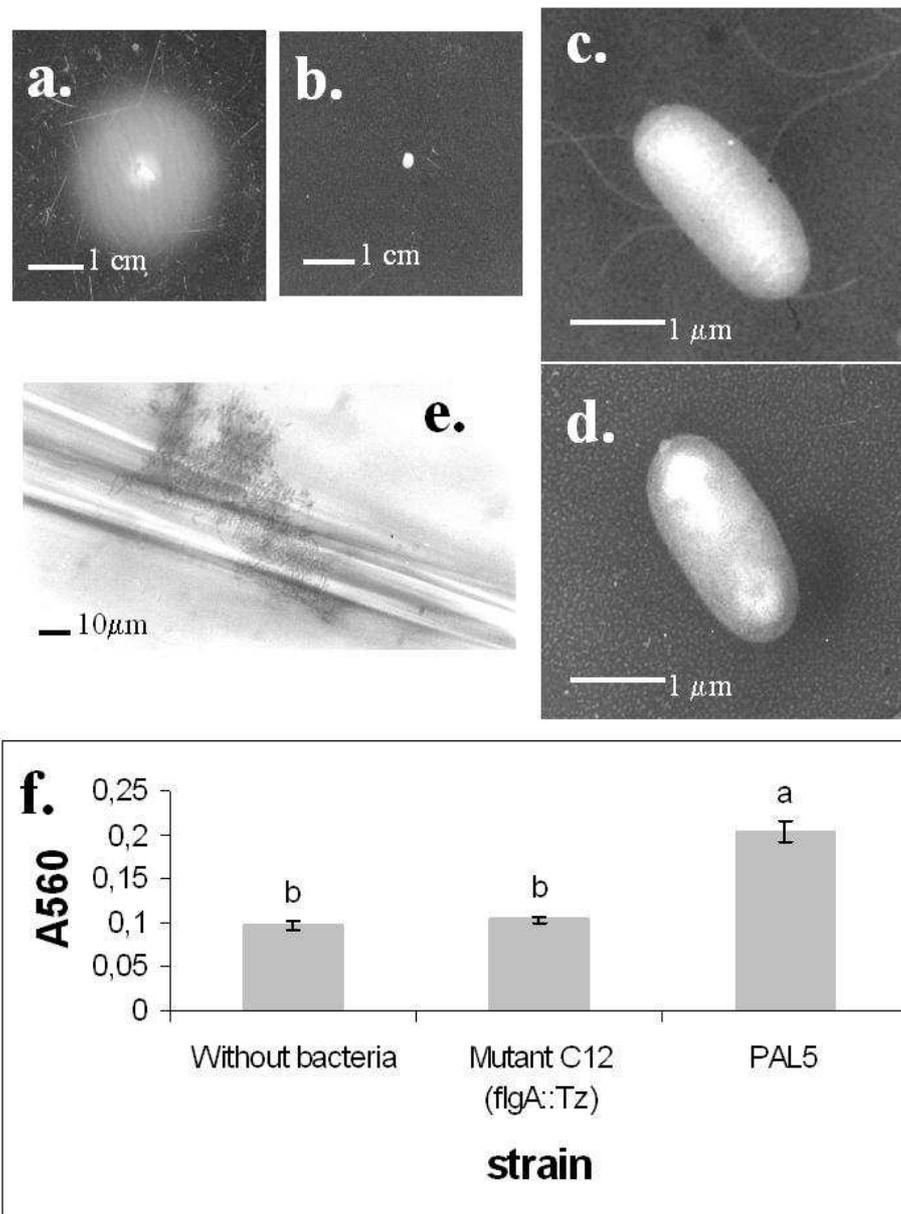


Fig. 3 Characterization of mutant strain C12 with a mutation in a flagellar homologous gene. Motility was evaluated after 3 d growth on motility agar and showed a motile phenotype for wild type PAL5 (a), while mutant strain C12 was non-motile (b). Transmission electronic microscopy images are shown of a typical wild-type PAL5 cell (c) and of a typical mutant cell of strain C12 (d). Biofilms on glass wool were stained with 1% crystal violet solution and studied by light-microscopy; wild-type PAL5 biofilms could be visualized (e), while mutant strain C12 could not (not shown). To quantify biofilm formation, crystal violet was ethanol-extracted from stained biofilms grown on glass wool during 72 h; quantification of crystal violet was realized by measuring absorbance of extracts at 560 nm. Wild-type PAL5 biofilm and mutant strain C12 biofilm as well as a non inoculated control were evaluated (f); the results show the average and standard error of at least four independent experiments. Letters a and b in the graph represent statistical difference as determined by Tukey's test at $p < 0.05$.

Table 1 Characteristics of identified insertion sites from 31 PAL5 mutant strains

Mutant strain	GenBank accession number of sequence at insertion site	Identity of insertion site
A2	EF999407	Putative acriflavin resistance protein
A5	EF999408	Conserved hypothetical protein
A7	EF999409	Putative IstB-like ATP binding protein
A8	EU005653	Putative MF transporter protein
A9	EU005654	Putative NAD-dependent deacetylase NpdA
A10	EU005655	Putative LysR type transcriptional regulator
B1	EF999410	Putative glycosyl transferase
B2	EF999411	Intergenic
B3	EU005656	Putative vanillate O-demethylase oxygenase subunit
B4	EU005657	Putative TRP domain protein
B5	EF999412	16S-23S spacer region
B7	EU005658	Hypothetical protein
B8	EU005659	Putative queuosine biosynthesis protein QueC
B9	EF999413	16S-23S spacer region
B10	EU005660	Putative fumarate hydratase FumA
B12	EF999414	Putative UvrABC system protein UvrC
B15	EU005661	Putative amino acid permease
B16	EF999415	Putative histidine amino lyase HutH
B17	EU005662	Conserved hypothetical protein
C1	EF999416	Putative permease protein
C2	EF999417	Intergenic
C3	EF999418	Putative serine protease
C4	EF999419	Conserved hypothetical protein
C5	EF999420	Intergenic
C6	EF999421	Putative glycine dehydrogenase GvcP
C7	EF999422	Putative inosine-5'-monophosphate dehydrogenase
GuaB		
C8	EF999423	Putative transporter protein
C9	EF999424	Putative xanthine dehydrogenase protein XdhC
C10	EF999425	Intergenic
C11	EF999426	Putative nonribosomal peptide synthetase
C12	EF999427	Putative flagellar protein precursor FlgA

ANEXO IV: Composição de meios de cultura para *G. diazotrophicus*.

Meio Dygs (pH 6,0)

2 g/l	glicose
1,5 g/l	peptona
2 g/l	extrato de levedura
0,5 g/l	K_2HPO_4
0,5 g/l	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$

Meio C2 (pH 6,0)

10 g/l	peptona
15 g/l	glicose
5 g/l	NaCl
5 g/l	extrato de levedura

Meio LGI-P (1,0 l; pH 5,5):

100 g	sucrose
2 ml	de solução K_2HPO_4 (10%)
6 ml	de solução KH_2PO_4 (10%)
2 ml	de solução $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (10%)
2 ml	de solução $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (1%)
1 ml	de solução $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (1%)
2 ml	de solução $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1%)

Meio LGI (1,0 l, pH 5,5):

5 g	glicose
2 ml	de solução K_2HPO_4 (10%)
6 ml	de solução KH_2PO_4 (10%)
2 ml	de solução $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (10%)
2 ml	de solução $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (1%)
4 ml	de solução FeEDTA (1.64%)
2 ml	de solução $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (1%)

ANEXO V: CURRICULUM VITAE

Nome: Luc Felicianus Marie Rouws

Nascimento: 28/07/1976

Naturalidade: Breda, Holanda

Formação acadêmica:

- Mestrado direto em Ciências Biológicas pela Universidade de Wageningen (WU, Holanda), agosto de 1995 a junho de 2001.

- Doutorado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Comunicação em Congresso

- 2 comunicações em congressos nacionais

- 3 comunicações em congressos internacionais

Publicações:

Rouws, L.F.M., Simões-Araújo, J.L., Hemerly, A.S. & Baldani, J.I. (2008) Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. Arch. Microbiol., 189:397-405.

Rouws, L.F.M., Hemerly, A.S. & Baldani, J.I. (2006) Transformação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5 pela técnica de eletroporação. *Comunicado técnico* 84, Embrapa Agrobiologia (ISSN 1517-8862).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)