

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO QUE CONTROLA A EXPRESSÃO DOS GENES *nifHDK* NA BACTÉRIA *Azospirillum amazonense*.** Guilherme S. Jacques<sup>1,2</sup>, Deise P. Potrich<sup>1,2</sup>, Irene S. Schrank<sup>1</sup> e Luciane M. P. Passaglia<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup> Centro de Biotecnologia, <sup>2</sup> Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS)

O estudo dos genes envolvidos na síntese e no funcionamento da Nitrogenase mostrou que esse é um sistema complexo e que envolve ao menos 20 genes, chamados *nif*, que respondem à variação de oxigênio e nitrogênio disponíveis no ambiente. Os genes *nif* foram identificados nas bactérias diazotróficas, das quais *Azospirillum amazonense* mostrou-se interessante por desenvolver uma relação do tipo endofítico-facultativa com diversas gramíneas, principalmente a cana-de-açúcar. Os genes *nif* possuem seqüências reguladoras características: um promotor na posição -24/-12, que é reconhecido pela RNA-polimerase- $\sigma^{54}$  e seqüências ativadoras upstream (UAS), reconhecidas pela proteína ativadora do sistema, NifA. Em nosso laboratório, promotores de diversos genes *nif* de *A. brasilense* foram isolados e demonstraram a existência das seqüências reguladoras descritas. De particular interesse foi o promotor do operon *nifHDKorf1Y*, que apresenta duas seqüências UAS sobrepostas e funcionalmente distintas. Com o objetivo de isolarmos e caracterizarmos a região reguladora dos genes *nifHDK* de *A. amazonense* utilizamos um fragmento de DNA de *A. brasilense*, contendo a região correspondente como sonda, em uma reação de hibridização com o DNA total de *A. amazonense*, clivado com diferentes enzimas. Uma banda na região de ~ 6,5 kb de *EcoRI* foi identificada. Os fragmentos correspondentes a essa região foram purificados e clonados em pUC18, clivado com *EcoRI*. O DNA de cada um dos plasmídeos recombinantes obtidos foi extraído e hibridizado com um fragmento de 700 pb, que contém a porção central do gene *nifD* de *A. brasilense*. Os plasmídeos que hibridizarem com a sonda serão sequenciados a fim de confirmarmos a clonagem e caracterizarmos a região reguladora desejada. (FAPERGS, CNPq-PIBIC/UFRGS 99/2000)