

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Análise de genes de *Azospirillum amazonense*
envolvidos na resposta ao estresse oxidativo**

Ricardo Cecagno

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Irene S. Schrank

Porto Alegre
Outubro/2007

Este Trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul – UFRGS, sendo financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

À Dra. Irene S. Schrank pela oportunidade de realizar este trabalho e anos de ensinamentos.

À banca examinadora, Dra Luciane M. P. Passaglia, Dra Janete Palma Fett e Dr. Arnaldo Zaha pela revisão.

À minha família pelo amor e credibilidade.

Aos colegas do Laboratório de Microrganismos Diazotróficos, principalmente Fernando e Shana pela amizade e conhecimentos compartilhados.

Aos professores Augusto e Marilene pelos ensinamentos e colaborações.

Aos colegas dos laboratórios 217 e 220 pela colaboração.

A todos os professores, colegas e funcionários que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES | 6 |
| LISTA DE FIGURAS | 8 |
| LISTA DE TABELAS | 9 |
| RESUMO | 10 |
| ABSTRACT | 11 |
| | |
| 1- INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 A Fixação Biológica do Nitrogênio | 12 |
| 1.2 A Nitrogenase | 13 |
| 1.3 Bactérias Diazotróficas | 13 |
| 1.4 O Gênero <i>Azospirillum</i> | 16 |
| 1.5 <i>Azospirillum amazonense</i> | 16 |
| 1.6 A Regulação da Fixação Biológica do Nitrogênio | 18 |
| 1.7 Sensibilidade ao Nitrogênio Fixado | 19 |
| 1.8 Sensibilidade ao Oxigênio | 19 |
| 1.9 O Paradoxo do Oxigênio | 20 |
| 1.10 Estresse Oxidativo e Espécies Reativas de Oxigênio | 21 |
| 1.11 Objetivos | 22 |
| | |
| 2- MATERIAIS E MÉTODOS | 23 |
| 2.1 Linhagens bacterianas e plasmídeos | 23 |
| 2.2 Meios de cultura e seleção de microrganismos | 23 |
| 2.3 Antibióticos, soluções, tampões e paraquat | 23 |
| 2.4 Condições de crescimento e indução ao estresse oxidativo | 24 |
| 2.5 Oligonucleotídeos (primers) | 24 |
| 2.6 Extração de RNA e purificação dos mRNAs | 25 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.7 | Quantificação dos Ácidos nucléicos | 25 |
| 2.8 | Síntese de cDNA bacteriano | 25 |
| 2.9 | Clivagem do cDNA com enzimas de restrição | 25 |
| 2.10 | Ligação | 26 |
| 2.11 | Preparação do DRIVER e TESTER | 26 |
| 2.12 | Hibridização subtrativa | 26 |
| 2.13 | Amplificação diferencial | 27 |
| 2.14 | Clonagem de fragmentos de DNA | 27 |
| 2.15 | Transformação bacteriana e extração de DNA plasmidial | 28 |
| 2.16 | Seqüenciamento de DNA e análise das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos | 28 |
| 2.17 | Hibridização de DNA-DNA e DNA-RNA | 29 |
| 2.18 | Análise por bioinformática | 29 |
| 3- | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |
| 3.1 | Testes de resistência bacteriana e indução ao estresse oxidativo | 31 |
| 3.2 | Isolamento de regiões genômicas diferenciais entre <i>A. amazonense</i> e <i>A. brasilense</i> | 33 |
| 3.2.1 | Xantina oxidase/desidrogenase | 33 |
| 3.2.2 | Resistência à Acriflavina | 34 |
| 3.3 | Banco de cDNA induzido ao estresse oxidativo | 37 |
| 3.3.1 | Regulador transcricional da família GntR | 39 |
| 3.3.2 | NAD epimerase/desidratase | 39 |
| 3.4 | cDNA-RDA | 41 |
| 3.4.1 | Serina protease | 43 |
| 3.4.2 | Alcanosulfonato monooxigenase | 44 |
| 4- | CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS | 48 |
| 5- | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 49 |

ABREVIATURAS, SIMBOLOS E UNIDADES

| | |
|-----------------|--|
| A | adenina |
| Ap ^r | resistência ou resistente a ampicilina |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| ATP | trifosfato de adenosina |
| C | citossina |
| °C | grau Celsius |
| Cu-ZnSOD | cobre-zinco superóxido dismutase |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| dNTP | trifosfato de desoxirribonucleosídeo |
| DRAG | dinitrogenase redutase ativadora glicoidrolase |
| DRAT | dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase |
| ERO | espécie reativa de oxigênio |
| FBN | fixação biológica do nitrogênio |
| FeMo-co | cofator ferro-molibdênio |
| FeSOD | ferro superóxido dismutase |
| FISH | hibridização de fluorescência <i>in situ</i> |
| g | grama |
| G | guanina |
| h | hora |
| IPTG | isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo |
| m | metro |
| M | molar |
| min | minuto |
| MnSOD | manganês superóxido dismutase |
| mRNA | RNA mensageiro |
| N | nucleotídeo |
| NAD | nicotinamida adenina dinucleotídeo |
| NADP | fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo |
| nif | genes de fixação do nitrogênio |
| pb | par de bases |
| PCR | reação em cadeia da polimerase |

| | |
|-------|---|
| pH | potencial de íons hidrogênio |
| RDA | análise de diferenças representativas |
| RNA | ácido ribonucléico |
| RNase | ribonuclease |
| rpm | rotação por minuto |
| rRNA | RNA ribossômico |
| s | segundo |
| SOD | superóxido dismutase |
| T | timina |
| TE | Tris, EDTA |
| tRNA | RNA transportador |
| U | unidade (de atividade enzimática) |
| V | volt |
| W | watt |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-tiogalactopiranosídeo |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 - Complexo da nitrogenase em <i>Azotobacter vinelandii</i> | 14 |
| Figura 1.2 - Nódulo de alfafa | 15 |
| Figura 1.3 - FISH com sondas específicas para três espécies do gênero <i>Azospirillum</i> | 17 |
| Figura 1.4 - Comparação das cascatas regulatórias e transcrição dos genes <i>nif</i> | 20 |
| Figura 3.1 – Morfologia típica do biofilme de <i>A. amazonense</i> em tamanho original | 31 |
| Figura 3.2 - Curva de crescimento de <i>A. amazonense</i> em presença de paraquat | 32 |
| Figura 3.3 - Diferenças genômicas entre <i>A. amazonense</i> e <i>A. brasilense</i> | 34 |
| Figura 3.4 - Xantina desidrogenase | 35 |
| Figura 3.5 – Fragmento do gene <i>acrA</i> de <i>A. amazonense</i> | 36 |
| Figura 3.6 - Análise da população de RNA e cDNA de <i>A. amazonense</i> | 38 |
| Figura 3.7 - Regulador GntR | 40 |
| Figura 3.8 - NAD epimerase/desidratase | 40 |
| Figura 3.9 - Produtos da reação de cDNA-RDA | 43 |
| Figura 3.10 - Serina protease | 44 |
| Figura 3.11 - Alcanosulfonato monooxigenase | 45 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1 – Oligonucleotídeos utilizados | 24 |
| Tabela 3.1 – Códigos de acesso e identidade dos genes com maior similaridade aos isolados de <i>A. amazonese</i> por RDA. | 37 |
| Tabela 3.2 – Códigos de acesso e identidade dos genes com maior similaridade aos isolados de <i>A. amazonese</i> no banco de cDNA. | 41 |
| Tabela 3.3 – Códigos de acesso e identidade dos genes com maior similaridade aos isolados de <i>A. amazonese</i> por cDNA-RDA | 46 |

RESUMO

O surgimento e conseqüente acúmulo de O₂ livre na atmosfera a partir do início da atividade fotossintética foi um evento que causou extinções em massa no nosso planeta. Apesar do grande aumento da quantidade de energia disponibilizado pela utilização do O₂ na oxidação dos alimentos em comparação com a fermentação, a toxicidade do mesmo causou uma pressão seletiva nos organismos e o desenvolvimento de atividades de proteção contra o ataque do oxigênio e seus radicais aos clusters metálicos de enzimas de atividades essenciais como a nitrogenase e outras biomoléculas. Trabalhos demonstraram que o microrganismo diazotrófico *Azospirillum amazonense*, apesar de pouco estudado, está presente em grande quantidade no solo de pastagens e culturas de arroz, trigo, milho e cana-de-açúcar no Brasil, e além de estar adaptado à acidez do solo, produz importantes hormônios vegetais em associação com as mesmas. O presente estudo tem o objetivo de contribuir para o entendimento da alta tolerância de *A. amazonense* ao estresse por oxigênio e seus radicais. A utilização do herbicida Gramoxone (Singenta) como indutor da resposta bacteriana resultou na resistência pelo microrganismo a concentrações maiores do que 100µM de paraquat. A metodologia de *Representational Difference Analysis* (cDNA-RDA) como forma de identificar genes diferencialmente expressos pela bactéria nessa condição resultou no isolamento de seis genes envolvidos direta e indiretamente no processo sendo um regulador transcricional da família GntR; uma alcanosulfonato monooxigenase; uma epimerase/desidratase dependente de NAD e uma serina protease. Este é o primeiro trabalho que utiliza emulsão fenólica em ciclos oscilatórios de temperatura (OSPERT) associada a cDNA-RDA. A metodologia utilizada mostrou ser funcional para as condições testadas sendo uma grande ferramenta para o estudo de expressão diferencial em organismos cujo genoma não é conhecido.

ABSTRACT

The emergence and consequent accumulation of free O₂ in the atmosphere from the beginning of the photosynthetic activity was an event that caused mass extinctions on our planet. Despite of the large increase in the amount of energy available by the use of O₂ in the oxidation of nutrients compared to the fermentation, the toxicity of the same caused a selective pressure on live organisms and the development of activities to protect against the attack of oxygen radicals in essential clusters of metallo-enzymes as nitrogenase and other biomolecules. Previous works showed that the diazotrophic microorganism *Azospirillum amazonense*, is present in large quantities in the soil, pasture, rice, wheat and sugarcane in Brazil, and besides being adapted to the acidity of the soil, is able to produce important phytohormones in association with them. This study is intended to contribute to the understanding of the high tolerance of *A. amazonense* to stress by oxygen and their radicals. The use of the herbicide Gramoxone (Singenta) as inducer of bacterial response resulted in resistance greater than 100µM of paraquat by the microorganism. The methodology of *Representational Difference Analysis* (cDNA-RDA) as a way to identify genes expressed by bacteria in this specific conditions resulted in the isolation of six genes involved directly and indirectly in the process being a transcriptional regulator of the GntR family; an alcanosulfonato monooxygenase; a NAD dependent epimerase/desidratase and one serine protease. This is the first work that uses *Oscillating Phenol Emulsion Reassociation Technique* (OSPERT) in association with cDNA-RDA. The methodology used was shown to be functional for the conditions tested and it's a powerful tool for the study of differential expression in organisms whose genome is unknown.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Fixação Biológica do Nitrogênio

O nitrogênio, quimicamente inerte na sua forma molecular, é de extrema importância para a vida, devido à sua presença em diferentes biomoléculas como ácidos nucleicos e aminoácidos. Além disso, o ciclo do nitrogênio está intimamente relacionado ao ciclo da água e do carbono, ambos imprescindíveis para as formas conhecidas de vida (RAISON & STOTTLEMEYER, 1991).

A amônia produzida industrialmente, e que tem como principal finalidade a produção de fertilizantes para a agricultura é sintetizada pelo processo de Haber-Bosch que emprega altas pressões e temperaturas, sendo portanto oneroso. Foi demonstrado que alguns herbicidas podem influenciar no ciclo do nitrogênio e na aeração do solo, além de contaminar fontes de bens naturais de consumo (VIENNEAU *et al.*, 2004).

O Ciclo do Nitrogênio é composto por vários processos: nitrificação, denitrificação, fixação do nitrogênio atmosférico e amonificação. Devido ao pequeno grupo de organismos que podem tornar o nitrogênio molecular novamente disponível para os outros seres vivos e ao custo do processo industrial, além dos danos ambientais, o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) tem despertado grande atenção dos cientistas como alternativa aos fertilizantes nitrogenados (FERGUSON & STUART, 1998).

Acredita-se que a FBN tenha se desenvolvido quando as reservas geoquímicas de nitrogênio fixado se tornaram escassas na biosfera. O esgotamento dos óxidos de nitrogênio, nitratos e nitritos pelos organismos teria provavelmente, limitado seu crescimento e ocasionado uma pressão seletiva que favoreceu o aparecimento da diazotrofia. A capacidade de fixar nitrogênio teria sido, portanto, um evento relativamente precoce na evolução dos organismos procarióticos e anterior ao surgimento da fotossíntese - e conseqüente aumento da concentração de oxigênio livre na atmosfera - uma vez que a nitrogenase, enzima que catalisa a redução de N_2 a amônia é extremamente sensível ao oxigênio (PEDROSA *et al.*, 2000).

1.2 A Nitrogenase

O complexo protéico da nitrogenase, a despeito da ampla variedade de bactérias diazotróficas existentes, se apresenta relativamente conservado em termos de estrutura e função. Basicamente, o sistema é formado por duas metalo-proteínas: a ferro proteína (Fe-proteína ou dinitrogenase redutase), codificada pelo gene *nifH* e a molibdênio-ferro proteína (MoFe-proteína ou dinitrogenase), codificada pelos genes *nifDK*, que catalisam, na presença de ATP, a redução de nitrogênio atmosférico a amônia. A Fe-proteína é o componente que se liga a ATP e atua como doador de elétrons, enquanto que a MoFe-proteína contém o sítio de redução do substrato (REES & HOWARD, 2000). Existem, no entanto, sistemas alternativos homólogos ao da Fe/MoFe-proteína, em que o molibdênio é substituído por vanádio ou então uma única Fe-proteína está presente (EADY, 1996).

Ambos os componentes da nitrogenase são extremamente sensíveis ao oxigênio. A sensibilidade da Fe-proteína é devido à exposição do cluster 4Fe-4S, que une as subunidades do dímero. A MoFe-proteína possui dois centros metálicos: o cluster P [8Fe-7S] e o MoFe cofator [MoFe₇S₉], que é o sítio catalítico de redução do substrato (EINSLE *et al.*, 2002; SEEFELDT *et al.*, 2004) (Figura 1.1).

O mecanismo de atividade da nitrogenase necessita da redução da Fe-proteína por doadores de elétrons como ferridoxinas e flavoproteínas, a transferência de elétrons da Fe-proteína para a MoFe-proteína e finalmente a transferência interna na MoFe-proteína, do cluster P até o MoFe-cofator (DIXON & KAHN, 2004).

Além de catalizar a redução de N₂ a NH₃ e prótons a hidrogênio, a nitrogenase reduz pequenas moléculas insaturadas como o acetileno. A reação de redução do acetileno pela nitrogenase é experimentalmente utilizada para se avaliar a atividade da enzima, bem como a capacidade de fixar nitrogênio de um organismo (HARDY *et al.*, 1972).

1.3 Bactérias Diazotróficas

As bactérias fixadoras de nitrogênio se encontram distribuídas em vários tipos de ambientes e habitats, mostrando-se bem adaptadas a diferentes climas e solos. Embora a diversidade de diazotróficos seja muito grande, incluindo cianobactérias (MONTROYA *et al.*, 2004) e simbioses de corais (LESSER *et al.*, 2004), elas podem ser divididas em dois

grupos principais: bactérias diazotróficas simbióticas e bactérias diazotróficas não-simbióticas/facultativas (BURRIS & ROBERTS, 1993).

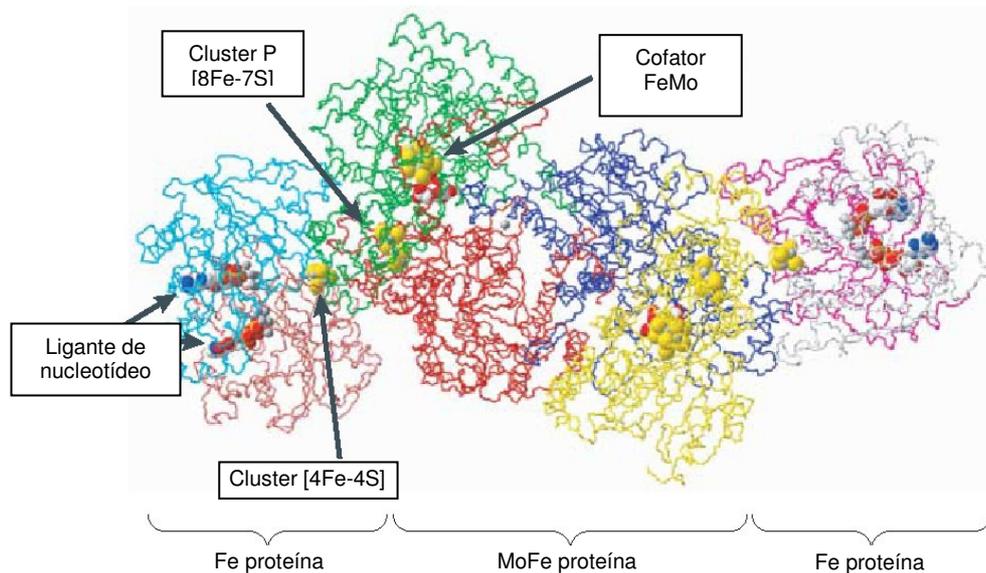


Figura 1.1 – Complexo da nitrogenase em *Azotobacter vinelandii* (SCHMID *et al.*, 2002). A figura mostra a estrutura das duas subunidades da nitrogenase interagindo. As duas subunidades da Fe-proteína estão em azul claro, marrom, bordô e cinza. As subunidades α da MoFe-proteína estão em verde e amarelo e as subunidades β em vermelho e azul.

As bactérias diazotróficas simbióticas, cujos principais representantes são os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, estabelecem uma relação íntima, mutualística, com as plantas às quais se associam, havendo a formação de estruturas especializadas para a fixação do nitrogênio nas raízes, os nódulos, um processo temporal e espacialmente coordenado do qual participam tanto genes bacterianos como vegetais. O nódulo oferece proteção para a nitrogenase em relação ao oxigênio, isso ocorre graças a uma barreira cortical, e da presença de leg-hemoglobina (DIXON & KAHN, 2004) (Figura 1.2).

O segundo grupo, denominado endofíticos não obrigatórios ou facultativos, no qual faz parte o gênero *Azospirillum*, pode habitar a superfície ou interior de algumas gramíneas de grande importância econômica como milho, trigo, arroz e cana de açúcar. A grande maioria destes diazotróficos foi isolada de solos de regiões tropicais como o Brasil. O interesse na associação com gramíneas reforça a importância da FBN para a agricultura

sustentável nos sistemas brasileiros onde baixas quantidades de fertilizantes têm sido utilizados para essas culturas (BALDANI *et al.*, 1997; DÖBEREINER, 1995).

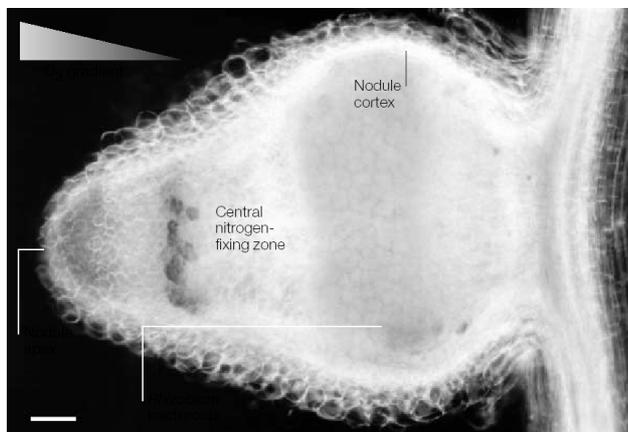


Figura 1.2 – Nódulo de alfafa (DIXON & KAHN, 2004), mostrando a barreira cortical nodal e a região de fixação do nitrogênio.

Embora as bactérias fixadoras de nitrogênio mais eficientes sejam aquelas que estabelecem simbiose com seus respectivos hospedeiros (MYLONA *et al.*, 1995), exibindo taxas de nitrogênio fixado bastante superiores às apresentadas pelas bactérias de vida livre, essas últimas ocorrem em grande escala no solo e possuem uma alta diversidade específica, além da produção de fitormônios e defesa contra patógenos na rizosfera. Como sua associação não se restringe à determinadas espécies vegetais, elas podem ser inoculadas nas sementes de diversas culturas e também servir como pré-adubadoras de solos oligotróficos (BALDANI *et al.*, 1997), halosolos (EL-KOMY *et al.*, 2003) e regiões do semi-árido (TIWARI *et al.*, 2003).

Recentemente, os diazotróficos endofíticos foram subdivididos em endofíticos facultativos e endofíticos obrigatórios para distinguir, respectivamente, linhagens que são capazes de colonizar tanto a superfície quanto o interior de raízes e sobreviver bem no solo, daquelas que não sobrevivem bem no solo, mas colonizam as raízes e partes aéreas das plantas. Ao contrário das bactérias da rizosfera, as endofíticas obrigatórias são incapazes de viver na parte externa dos tecidos vegetais e parecem seguir o ciclo biológico de seu hospedeiro. Por outro lado, os endofíticos facultativos são capazes de infectar e colonizar o tecido interno da planta, mas apresentam habilidade de viver no exterior do tecido vegetal por período variável de tempo (BALDANI *et al.*, 1997).

1.4 O Gênero *Azospirillum*

Há quase 50 anos Döbereiner e Rushel (1958), isolaram a bactéria *Beijerinckia fluminensis* da rizosfera de cana-de-açúcar de regiões tropicais, demonstrando o potencial da associação diazotrófico-planta, mas somente após a redescoberta do gênero *Azospirillum* por Döbereiner e Day (1975) é que os cientistas passaram a investigar a FBN em gramíneas (BALDANI *et al.*, 1997).

Atualmente, onze espécies são conhecidas no gênero *Azospirillum*: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. rugosum*, *A. oryzae*, *A. canadense* e *A. melinis* (TARRAND *et al.*, 1978; MAGALHÃES *et al.*, 1983; REINHOLD *et al.*, 1987; KHAMMAS *et al.*, 1989; DEKHIL *et al.*, 1997; ECKERT *et al.*, 2001; MEHNAZ *et al.*, 2007; XIE & YOCOTA, 2005; YASSIN, 2006; PENG *et al.*, 2006). O gênero *Azospirillum* está classificado com base na homologia das seqüências de rRNA 16S, dentro do grupo α das Proteobacterias, juntamente com os gêneros *Rhodospirillum* e *Aquaspirillum* (HARTMANN & BALDANI, 2006).

1.5 *Azospirillum amazonense*

Um estudo parcial dos genes *nif* dessa bactéria demonstrou que a organização dos genes da FBN é semelhante ao das outras espécies do gênero, mas apresenta maior similaridade com *A. irakense* do que *A. brasilense* (POTRICH *et al.*, 2001). *A. amazonense* apresenta outras características diferenciais com relação à enzima nitrogenase, que possui baixa tolerância ao oxigênio, além de utilizar preferencialmente a sacarose como fonte de carbono (MAGALHÃES *et al.*, 1983). Análises do metabolismo de carboidratos em seis linhagens *A. amazonense* demonstraram a capacidade dessa bactéria de utilizar dissacarídeos, hexoses e pentoses, mas não intermediários tricarbóxicos. Um sistema de transporte ativo foi encontrado para sacarose e glicose, mas não para o manitol (MARTINEZ-DRETS *et al.*, 1985).

Potrich *et al.* (2001) caracterizou parcialmente os genes *nif* de *A. amazonense* e também desenvolveu *primers* espécie-específicos baseados na seqüência do 16S rDNA, que amplificam somente nessa espécie quando comparada com *A. brasilense*. Hartmann &

Baldani, (2006) realizaram experimentos de hibridização *in situ* baseados na técnica de Eckert (2001) com oligonucleotídeos específicos para três espécies de *Azospirillum* (Figura 1.3).

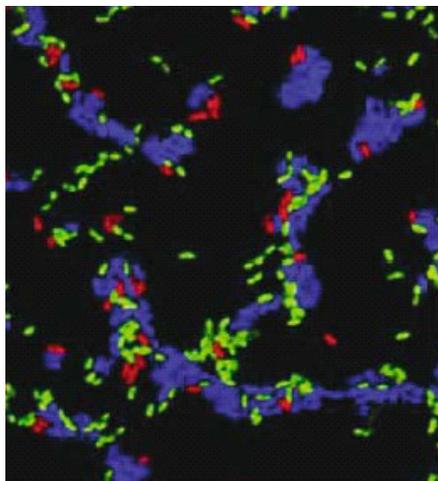


Figura 1.3 – FISH com sondas específicas para três espécies do gênero *Azospirillum*. *A. brasilense* em azul, *A. amazonense* em verde e *A. lipoferum* em vermelho (HARTMANN & BALDANI, 2006).

Trabalhos realizados com cana-de-açúcar micropropagada demonstraram a capacidade de *A. amazonense* em associação com outras bactérias de promover a multiplicação de mudas em diferentes misturas que simulam solos utilizados para o plantio dessa gramínea no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Além da fixação do nitrogênio, uma característica de extrema importância dessa espécie é a capacidade de produzir fitormônios como auxinas, giberelinas e citocininas em associação com gramíneas que compõe as pastagens, já que a falta de nitrogênio é o principal fator que limita a fertilidade das mesmas (REIS JUNIOR *et al.*, 2004). O fato de *A. amazonense* ser ácido-tolerante contribuiu para o grande destaque dado a esta espécie nos últimos anos já que a acidez é uma característica comum à maioria dos solos brasileiros. Análises de variância molecular mostraram que o genótipo da planta hospedeira bem como a produção de diferentes exudatos influencia na genética das populações de *A. amazonense* encontradas no solo (AZEVEDO *et al.*, 2005).

1.6 A Regulação da Fixação Biológica do Nitrogênio.

A enzima nitrogenase possui um *turnover* relativamente lento, o que faz com que os diazotróficos sintetizem grandes quantidades dessa proteína, atingindo um valor de aproximadamente 20% do conteúdo celular. Esse gasto energético faz com que sua expressão seja altamente controlada em nível transcricional, em resposta à quantidade de nitrogênio fixado.

A sensibilidade ao oxigênio também impõe consideráveis restrições para a diazotrofia. Na maioria dos organismos fixadores várias estratégias de proteção ao dano por oxigênio são conhecidas como o consumo deste por bactérias aeróbicas na respiração, compartimentalização da nitrogenase e barreiras de difusão de oxigênio, como os nódulos (DIXON & KAHN, 2004).

Em adição à regulação ao nível transcricional, alguns diazotróficos como *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus* e *Azospirillum brasilense* possuem regulação pós-traducional da nitrogenase (MASEPOHL *et al.*, 2002). Isso é mediado pela ADP-ribosilação da Fe-proteína pela enzima DraT (dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase), que inativa a nitrogenase em resposta a amônia e alta intensidade luminosa. A modificação covalente da nitrogenase é revertida por DraG (dinitrogenase redutase glicohidrolase), que remove a ADP-ribose sob condições apropriadas de fixação (HALBLEIB *et al.*, 2000).

A necessidade de responder tanto ao oxigênio como ao nitrogênio fixado faz com que várias estratégias de controle sejam comuns nos diazotróficos, porém podem diferir dependendo da fisiologia do hospedeiro. Por exemplo, bactérias que apresentam associação simbiótica possuem baixa ou nenhuma regulação em resposta ao nitrogênio fixado. Isso ocorre provavelmente graças à incorporação da amônia pelo vegetal (RATET *et al.*, 1989).

O fato de não ter sido encontrado o sistema DraT-DraG, responsável pela regulação pós-traducional da nitrogenase pode fazer com que a fixação do nitrogênio em *A. amazonense* tenha uma regulação menos estrita (BURRIS *et al.*, 1991).

1.7 Sensibilidade ao Nitrogênio Fixado

A transdução de sinal utilizando a proteína PII é um mecanismo importante para a comunicação nas bactérias diazotróficas. A disponibilidade de vários homólogos a PII, proporciona uma cascata regulatória em que um homólogo pode regular uma segunda proteína. Um dos primeiros sistemas estudado foi em *K. pneumoniae*, onde a proteína GlnB controla a atividade do sistema NtrB-NtrC, que por sua vez regula GlnK e conseqüentemente, NifLA em resposta ao nitrogênio fixado (Figura 1.4). GlnB e GlnK estão sujeitas a uridilação pela Utase, produto do gene GlnD. Sob condições limitantes de nitrogênio, o aminoácido glutamina, que é um sinal chave no processo, torna-se escasso no citoplasma, o que faz com que a proteína GlnK seja uridilada, ativando a transcrição dos genes *nifLA* e, conseqüentemente, a fixação do nitrogênio (DIXON & KAHN, 2004).

1.8 Sensibilidade ao Oxigênio

Quatro grupos de proteínas que regulam a fixação do nitrogênio e tem sensibilidade ao oxigênio são conhecidos. No primeiro grupo está a proteína FixL (histidina-quinase), que, na ausência de oxigênio, é autofosforilada. Neste estado, ela transfere o grupo fosfato para a proteína FixJ, resultando na ativação de FixJ, que por sua vez, ativa a transcrição dos demais genes da fixação (TUCKERMAN *et al.*, 2002).

O segundo grupo responde ao estado de oxidação e foi primeiramente descrito nas α -proteobactérias. Este sistema de dois componentes RegA-RegB apresenta resíduos de cisteína essenciais para a sensibilidade ao estado redox, localizados entre o sítios de autofosforilação e de ligação ao ATP (SWEM *et al.*, 2007).

Os outros dois grupos de proteínas apresentam o anti-ativador NifL, que é transcrito juntamente com NifA, inativando-a e também a própria proteína NifA, que é uma EBP (Enhancer-binding protein) σ -54 dependente (STUDHOLME & DIXON, 2004).

A Figura 1.4 compara o mecanismo de regulação transcricional da fixação do nitrogênio em bactérias de vida livre e simbióticas.

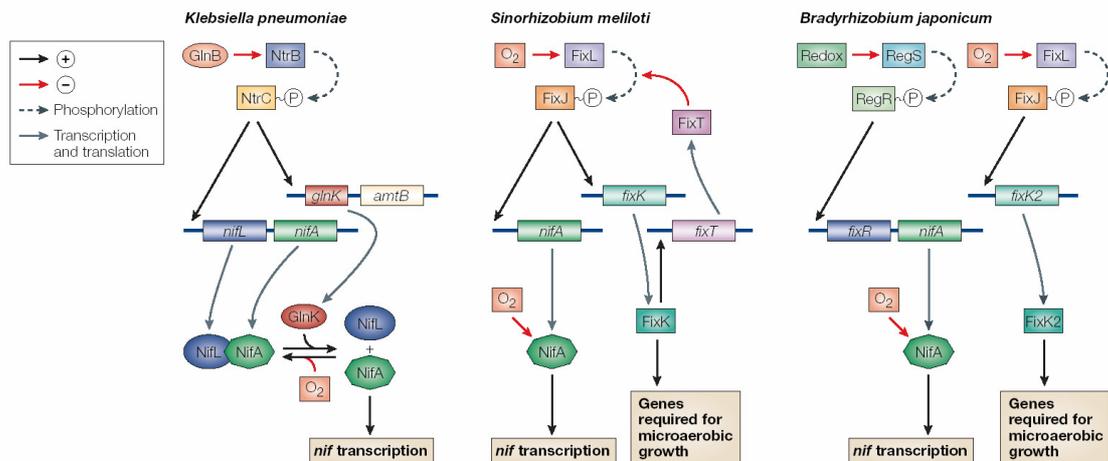


Figura 1.4. Comparação das cascatas regulatórias que controlam a transcrição dos genes *nif* na bactéria fixadora de nitrogênio de vida livre *Klebsiella pneumoniae* em relação a organismos simbiotes *Sinorhizobium meliloti* e *Bradyrhizobium japonicum*. (DIXON & KAHN, 2004).

1.9 O Paradoxo do Oxigênio

Se por um lado o metabolismo oxidativo é energeticamente favorável aos organismos, em relação à fermentação, o oxigênio é tóxico aos mesmos, já que reage e inativa enzimas que possuem “clusters” com íons metálicos no seu sítio ativo como a nitrogenase. O aumento da concentração de O₂ livre, a partir do início da atividade fotossintética pelas cianobactérias, causou extinção de muitas espécies e uma pressão seletiva favoreceu o aparecimento de enzimas de defesa como superóxido dismutases, catalases e glutatona na maioria dos organismos vivos. Mecanismos alternativos com a função de evitar esse elemento poluente essencial foram desenvolvidos por algumas espécies, como a formação de nódulos, heterocistos e migração para ambientes menos oxidativos por aerotaxia. A reação entre íons ferrosos muito abundantes na atmosfera ancestral e oxigênio resultou na formação de radicais livres que afetam biomoléculas como DNA, lipídios e proteínas. Uma exceção às informações anteriores é encontrada na bactéria *Streptomyces thermoautotrophicus* que apresenta uma nitrogenase aerotolerante, fixando nitrogênio em altas concentrações de oxigênio (RIBBE *et al.*, 1997).

Em *Azospirillum*, a produção de carotenóides e outros tipos de pigmentos, síntese de enzimas antioxidantes, aerotaxia e atividade respiratória elevada, além de alterações

morfológicas, como a formação de cistos e flocos sob condições ambientais desfavoráveis ou de estresse, são possíveis mecanismos de proteção com relação ao oxigênio (MARCHAL & VANDERLEYDEN, 2000).

A tolerância de *Azospirillum* a oxigênio difere tanto entre espécies como entre linhagens, sendo influenciada por fatores intrínsecos e ambientais. As espécies de *Azospirillum* são, no entanto, característica e obrigatoriamente microaeróbicas, fixando nitrogênio em concentrações de oxigênio inferiores a 10 μM . Experimentos demonstram que concentração ideal para *A. brasilense*, por exemplo, é na faixa de 2 a 8 μM (HARTMANN & HUREK, 1988).

1.10 Estresse Oxidativo e Espécies Reativas de Oxigênio

Um radical livre é quimicamente definido como um átomo ou molécula que possui um ou mais elétrons não pareados (BERGENDI *et al.*, 1999). Vários processos metabólicos geram radicais livres, principalmente enzimas relacionadas com a cadeia transportadora de elétrons como NAD(P)H desidrogenase, sulfito redutase, succinato desidrogenase e fumarase redutase (HALLIWELL *et al.*, 1999). Quando dois elétrons são transferidos ao oxigênio, o produto formado é o peróxido de hidrogênio que não é um radical livre, sendo preferencialmente chamado de espécie reativa de oxigênio (ERO). O ataque de radicais livres a grupos metálicos além de inativar enzimas, causa a liberação de íons metálicos no citoplasma o que favorece a reação de Fenton (TOUATI, 2000). Esta por sua vez, leva à produção de radicais hidroxil, muito mais reativos que o superóxido e que reagem com qualquer biomolécula produzindo, ainda, radicais secundários com reatividade variável (IMLAY *et al.*, 1988).

Existem vários compostos químicos ou estresses ambientais que podem induzir a presença destes radicais, entre eles herbicidas utilizados na agricultura como Gramoxone (Singenta) que utiliza paraquat como princípio ativo. Este composto é classificado como um herbicida de contato não seletivo, utilizado em culturas de cana-de-açúcar, arroz, trigo e milho que são colonizadas por bactérias fixadoras de nitrogênio. Vários trabalhos demonstram que a presença de paraquat induz espécies bacterianas ao estresse oxidativo e em elevadas concentrações pode levar à morte das mesmas (CASTRO-SOWINSKI *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2007; BAKSHI *et al.*, 2006).

1.11 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho é analisar a resposta genética de *Azospirillum amazonense* ao estresse oxidativo causado pelo herbicida Gramoxone (paraquat) como forma de compreender os mecanismos utilizados por essa espécie para sobreviver em um ambiente nocivo, além de padronizar experimentos de expressão gênica nessa bactéria pouco estudada e com várias características de interesse biotecnológico.

Como objetivos específicos o presente trabalho visa: a) Testar a resistência bacteriana ao herbicida. b) Sintetizar e analisar um banco de cDNA bacteriano induzido ao estresse oxidativo c) Análisar a expressão diferencial de genes de *A. amazonense* em resposta ao Gramoxone por *Representational difference analysis* - cDNA-RDA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Linhagens bacterianas e plasmídeos

A linhagem selvagem de *Azospirillum amazonense* Y2 (ATCC 35120), foi utilizada para a extração de RNA total do qual foram obtidas as populações de cDNA para a construção do banco induzido ao estresse oxidativo e cDNA-RDA. A linhagem XL1-Blue (SAMBROOK & RUSSEL, 2001), derivada de *Escherichia coli* K12, foi utilizada como hospedeira em experimentos de transformação bacteriana com a finalidade armazenar os plasmídeos contendo o produto do cDNA-RDA e banco de cDNA.

O vetor de clonagem empregado nos experimentos de transformação bacteriana foi o plasmídeo pUC18 (YANISCH-PERRON *et al.*, 1985), que confere resistência ao antibiótico ampicilina à linhagem XL1-Blue.

2.2 Meios de cultura e seleção de microrganismos

Os meios de cultura utilizados para a multiplicação da linhagem XL1-Blue foram: LB líquido e sólido (1,5% de ágar) e SOC líquido, preparados de acordo com Sambrook & Russel, (2001). O meio M79 líquido e sólido específicos para *A. amazonense*, foi descrito por Fred & Waksman, (1928). Todos os meios de cultura foram preparados com água bidestilada sendo posteriormente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min.

2.3 Antibióticos, soluções, tampões e paraquat

Todos os antibióticos, soluções e tampões empregados nos experimentos foram devidamente preparados com água bidestilada ou MilliQ. Quando necessário, foram preparados sob condições de esterilidade ou posteriormente esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. Sua composição encontra-se descrita em Sambrook & Russel (2001).

O herbicida comercial Gramoxone 200 (Singenta) baseado em paraquat, foi diluído para uma concentração estoque de 10mM com água MilliQ conforme dados do fabricante.

2.4 Condições de crescimento e indução ao estresse oxidativo

Para testar a resistência bacteriana ao herbicida, bem como no experimento de cDNA-RDA, *A amazonense* foi incubado a 37°C com agitação de 160 rpm em incubador com agitação orbital de bancada CT 712 (Cientec) até uma DO de 0,2, o que corresponde a fase inicial da multiplicação que acontece em aproximadamente 16 horas. Posteriormente, diferentes concentrações de paraquat, variando de 10µM a 250µM foram adicionadas ao meio de cultura sendo o RNA extraído entre uma e quatro horas após a indução.

2.5 Oligonucleotídeos (*primers*)

Três pares de oligonucleotídeos foram utilizados nos experimentos de cDNA-RDA. Suas seqüências específicas podem ser vistas na tabela 2.1. Para o seqüenciamento de fragmentos de DNA clonados no vetor pUC18 foi utilizado *primer* universal (Amersham Pharmacia Biotech). O anelamento dos adaptadores para o cDNA-RDA foi realizado em termociclador automático Master Cycler (Eppendorff) por 1 min a 50°C seguido de uma diminuição gradual da temperatura ($r=0,3^\circ/s$) até uma temperatura de 10°C. Após 5 minutos nessa temperatura foram adicionados os reagentes para ligação (WESTBROCK-WADMAN *et al.*, 1999).

Tabela 2.1 – Oligonucleotídeos utilizados

| Adaptador | Seqüência |
|-----------|-------------------------------|
| RBam 12 | 5'GATCCTGCGTGA 3' |
| RBam 24 | 5'AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG 3' |
| NBam 12 | 5'GATCCTCCCTCG 3' |
| NBam 24 | 5'AGGCAAGTGTGCTATCCGAGGGAG 3' |
| JBam 12 | 5'GATCCGTTTCATG 3' |
| JBam 24 | 5'ACCGACGTCGACTATCCA 3' |
| Universal | 5'TTGTGAGCGGATAACAATTTC 3' |

2.6 Extração de RNA e purificação dos mRNAs

As extrações de RNA foram realizadas com reagente Trizol (GIBCO-BRL). Após eletroforese em gel de agarose 2% com finalidade de conferir a qualidade do RNA, e tratamento com DNase I (Promega), o kit Microbexpress (Ambion), que utiliza hibridizações com oligonucleotídeos ligados a esferas magnéticas, foi utilizado para remover as populações de 16S rRNA e 23S rRNA. O reagente DEPC (GIBCO-BRL) foi utilizado como forma de inativar possíveis RNAses presentes nas alíquotas de H₂O. Os protocolos utilizados foram os indicados pelos fabricantes.

2.7 Quantificação dos Ácidos nucléicos

Como forma de quantificar RNA, cDNA, plasmídeos e fragmentos usados como sonda foi utilizado o fluorímetro Qubit (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante.

2.8 Síntese de cDNA bacteriano

Após enriquecimento das populações de mRNA pela remoção dos rRNAs 16-23S, a transcriptase reversa Impron-II (Promega) foi utilizada para a síntese da primeira fita de cDNA. A metodologia utilizada foi a indicada pelo fabricante.

A síntese da segunda fita foi realizada com as enzimas DNA Polimerase I e DNA Ligase de *E coli*, bem como RNaseH e inibidores de RNase. O protocolo utilizado para síntese da segunda fita foi o descrito por Sambrook & Russel (2001).

Após a síntese das duas fitas, o cDNA foi purificado com o kit GFX (Invitrogen), utilizado conforme descrito pelo fabricante.

2.9 Clivagem do cDNA com enzimas de restrição

As reações de clivagem de cDNA foram procedidas de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante das enzimas e tampões. Para as clivagens com MboI dos

fragmentos utilizado nos experimentos de cDNA-RDA, um excesso de 10 U de enzima foi utilizado.

2.10 Ligação

As reações de ligação dos fragmentos aos adaptadores foram realizadas utilizando 500 μ M dos oligonucleotídeos de 12 e 24 pares de bases que foram anelados previamente (WESTBROCK-WADMAN *et al.*, 1999) – Tabela 2.1. As ligações foram realizadas utilizando 10 U de T4 DNA Ligase (Promega) por 16 horas a 16°C.

O produto do cDNA-RDA, assim como o cDNA não clivado para montagem do banco, foi tratado com T4 DNA Polimerase I e T4 Polinucleotídeo quinase. A ligação ao vetor de clonagem obedeceu a uma proporção de 1:1 (50 ng).

2.11 Preparação do DRIVER e TESTER

Realizada a ligação do primeiro par de adaptadores nas populações controle (sem paraquat) e induzida, foram realizados 15 ciclos de PCR por 3 minutos à 72°C como forma de liberar o adaptador de 12 pares de bases que por ser defosforilado não foi efetivamente ligado aos fragmentos, seguido por 1 minuto 94°C, 3 minutos a 70°C. Todas as reações de PCR foram realizadas utilizando a enzima GoTaq Flexi (Promega), com 4 mM de MgCl₂. Para preparação do TESTER, 500 ng do DRIVER foram clivadas com a enzima de restrição MboI, para liberar o adaptador, purificadas com *kit* GFX e ligadas a um segundo par de oligonucleotídeos (Tabela 2.1).

2.12 Hibridização subtrativa

A hibridização subtrativa foi realizada utilizando a técnica de OSPERT (BRUZEL & CHEUNG, 2006) baseada em emulsão fenólica. As estringências utilizadas foram 1ng TESTER : 100 ng DRIVER durante a primeira hibridização; 0,2 ng : 100ng (1:500) na segunda e 20 pg: 100ng (1:5000) durante a terceira hibridização

Após as populações DRIVER e TESTER serem misturadas de acordo com a estringência desejada, foram desnaturadas por 15 minutos em NaOH 0,3N e incubadas na

temperatura ambiente num volume de 17,3 μ L. A reação foi neutralizada com 2,7 μ l de MOPS 3M e acrescentada de 25 μ L de NaCl 1,5 M contendo 2 mM de EDTA e 5 μ l de fenol tamponado pH 8,0. A emulsão foi gerada dissolvendo o fenol a 65 °C por 1 minuto seguido da adição das amostras no gelo. Foram então realizados 50 ciclos de 15 segundos a 25 °C e 15 segundos a 65 °C para hibridização subtrativa que foi seguida de uma extração com 1:1 volumes de clorofórmio. O sobrenadante foi então purificado em coluna GFX estando pronto para a amplificação diferencial.

A técnica de OSPERT possui a vantagem de utilizar uma pequena quantidade de TESTER e aumentar em até 25 mil vezes a eficiência da hibridização, além de ser realizada em poucas horas quando comparada com as metodologias descritas anteriormente.

2.13 Amplificação diferencial

Todo o material eluido da coluna de purificação, que corresponde ao produto da hibridização subtrativa deve ser utilizado na primeira PCR. Nesta reação o *primer* (adaptador de 24 pb) deve ser adicionado após a reação ser incubada a 72 °C por 3 minutos, quando ocorre a síntese das seqüências complementares aos adaptadores e que serão responsáveis pela amplificação diferencial. O PCR foi realizado por 10 ciclos de 1 minuto a 94 °C seguido de 3 minutos a 72 °C.

Os fragmentos foram então purificados em coluna e tratados com Mung bean nuclease (Biolabs) com objetivo de degradar fragmentos que são linearmente amplificados na PCR. Após o tratamento e purificação, 5 μ l dos 50 eluidos foram reamplificados por 20 ciclos na 1^a e 2^a hibridizações e 30 ciclos na 3^a hibridização subtrativa.

2.14 Clonagem de fragmentos de DNA

Aproximadamente 5 μ g de DNA do vetor pUC18 foram clivados com a enzima de restrição SmaI a 37 °C por 2 h. O vetor foi posteriormente defosforilado com fosfatase alcalina de camarão (USB Corporation) a 37 °C por 2 h, sendo em seguida purificado com fenol-clorofórmio e ressuspendido em TE (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Na reação de preenchimento das extremidades, cerca de 500 ng de DNA foram incubados com 1 mM de dNTPs, 10 mM de ATP, 1,5 U de T4 DNA Polimerase I, tampão de reação, 6U de T4 Polinucleotideo Quinase e água MilliQ para um volume final de reação de 60 µl, a 25 °C por 1 h. Os fragmentos foram então purificados com coluna GFX para clonagem subsequente.

2.15 Transformação bacteriana e extração de DNA plasmidial

As transformações bacterianas foram realizadas utilizando células eletrocompetentes da linhagem XL1-Blue de *E. coli*, preparadas conforme Sambrook & Russel, (2001). Aproximadamente 50 ng da reação de ligação de DNA foram usados em cada transformação. Após o choque elétrico, as células foram imediatamente transferidas para um tubo de ensaio contendo 1 ml de LB líquido e incubadas com agitação (200 rpm) a 37°C por 1 h. Alíquotas de 100 µl dessa preparação foram plaqueadas em LB sólido contendo concentrações adequadas de antibióticos, IPTG e X-Gal. A seleção das colônias recombinantes foi feita visualmente, através do sistema enzimático da β-galactosidase de *E. coli*. As colônias brancas foram individualmente multiplicadas em 1 ml de LB líquido com agitação (200 rpm) a 37°C por 16 h.

O DNA dos plasmídeos recombinantes foi isolado e purificado em pequena escala segundo a técnica de lise alcalina descrito em Sambrook & Russel, (2001).

2.16 Seqüenciamento de DNA e análise das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos

Para o seqüenciamento dos fragmentos provenientes do RDA, foi utilizado o seqüenciador automático *MEGABACE* (Amersham Biosciences), seguindo-se as especificações de uso do fabricante.

Uma vez obtidas as seqüências de nucleotídeos, foi realizada uma busca de similaridade no banco de dados *GenBank*. Depois de identificados, os clones de maior interesse foram submetidos à hibridização por *Dot-blot* (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

2.17 Hibridização de DNA-DNA e DNA-RNA

Nas hibridizações *northern blot* 5 µg de RNA total foram transferidos para uma membrana de *nylon* (GE Healthcare) utilizando o sistema Bio-Dot (Bio-Rad). A transferência foi realizada conforme indicado pelo fabricante.

A hibridização DNA-RNA foi realizada com *kit ALKphos* (GE Healthcare) conforme indicado pelo fabricante, utilizando como sonda um fragmento de superóxido dismutase de *A. amazonense* isolado em nosso laboratório. O forno utilizado foi o Hybaid HS9360 (eBay express) A detecção foi realizada com equipamento *Pharos* (Bio-Rad).

Durante a análise de fragmentos presentes exclusivamente em *A. amazonense*, 50; 5 e 0,5 ng de cada um dos 32 clones foram transferidas para uma membrana de *nylon* (GE Healthcare) utilizando o sistema Bio-Dot (Bio-Rad). A transferência foi realizada conforme indicado pelo fabricante. As hibridizações foram realizadas utilizando como sonda o produto do RDA e o DRIVER de *A. brasilense*, indicando que as seqüências isoladas parecem estar presentes somente na primeira população. Aqui a marcação foi realizada com fósforo radioativo e a detecção feita em filme radiográfico após 24 horas a -80 °C, conforme Sambrook & Russel, (2001).

2.18 Análise por bioinformática

Após o sequenciamento dos clones, as seqüências de baixa qualidade e pertencentes ao vetor de clonagem foram removidas utilizando a ferramenta Pregap4 do pacote de programas Staden. A comparação com banco de dados foi realizada usando as ferramentas Blastn para eliminar as seqüências de rDNA e Blastp para analisar a similaridade dos fragmentos provenientes do Blastn. A seleção das seqüências homólogas aos genes de *A. amazonense* foram obtidas do *Entrez Protein* (NCBI), e alinhadas utilizando *Bioedit Sequence Alignment Editor* Versão 7.0.5.2.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *A. amazonense* (MAGALHAES *et al.*, 1983), parece mais distribuída nos solos brasileiros do que *A. brasilense*. Além de ser ácido tolerante, característica comum nos solos brasileiros e estar presente em maior quantidade em solos de pastagens (OLIVEIRA *et al.*, 1987), cana-de-açúcar, arroz, trigo, milho e outras gramíneas de importância econômica, essa espécie é capaz de produzir fitormônios como auxinas, giberelinas e citocininas em associação com as mesmas, característica compartilhada com outras espécies.

Esses dados fazem de *A. amazonense* uma bactéria de interesse biotecnológico tanto no sentido da recuperação destes solos oligotróficos como economicamente em termos de gastos com fertilizantes nitrogenados, que contaminam bens naturais de consumo.

Poucos estudos foram realizados até o momento com esta espécie, sendo *A. brasilense* a bactéria mais estudada no gênero. Uma das características interessantes é que *A. amazonense* parece possuir um genoma com 500 kpb a mais do que *A. brasilense*. O fato de não ter sido encontrado até agora um sistema de regulação pós-traducional da nitrogenase em *A. amazonense* também contribui para um grande potencial de utilização com relação à bactéria.

Em termos de inoculo a campo, a maioria dos experimentos feitos ao longo dos últimos 20 anos utilizaram *A. brasilense* e *A. lipoferum*, sendo que somente em alguns trabalhos realizados no Brasil, utilizaram *A. amazonense*. A expectativa de sucesso da inoculação está ao redor de 50 a 75%, o que parece estar acima do esperado, já que em várias leguminosas a taxa de resposta à inoculação é de 50%.

Em 1987, Hartmann e Burris publicaram um trabalho indicando que *A. amazonense* possui uma nitrogenase com alta tolerância ao oxigênio, o que parece ocorrer devido ao fato de possuir mecanismos avançados de defesa quando comparada com *A. brasilense* e *A. lipoferum*.

Podemos visualizar que essa espécie sobrevive por muito mais tempo (podendo chegar ao dobro) que *A. brasilense* em placas cultivadas em temperatura ambiente. A morfologia da colônia é de extrema importância, já que torna *A. amazonense* de fácil

caracterização quando comparado com outra bactéria em placas de meio de cultivo sólido (Figura 3.1).

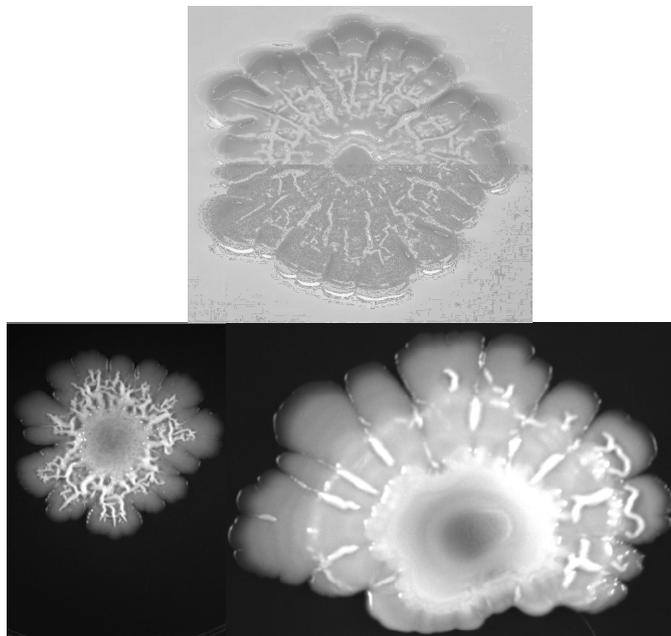


Figura 3.1 - Morfologia típica do biofilme de *A. amazonense* em tamanho original. A bactéria foi mantida em meio M79 por 30 dias.

3.1 Testes de resistência bacteriana e indução ao estresse oxidativo

Para determinar a tolerância bacteriana ao herbicida, assim como avaliar a indução ao estresse oxidativo, *A. amazonense* foi incubado em 150 ml de meio M79 a 37°C com agitação de 160 rpm. Ao atingir uma densidade óptica de 0,2, esse volume foi separado em amostras de 20 ml no qual diferentes concentrações de paraquat foram adicionadas ao meio. Após 2, 3 e 4 horas de indução, 1ml de cada amostra foi retirado e quantificado espectrofotometricamente a 550 nm. O experimento foi realizado em triplicata e o resultado está apresentado na figura 3.2.

Podemos observar que baixas concentrações de paraquat (10 µM) foram suficientes para provocar efeitos de retardamento na multiplicação bacteriana. A concentração de 100 µM foi utilizada para induzir a expressão gênica nos experimentos de construção do banco de cDNA e cDNA-RDA. Esse valor foi escolhido pelo pouco comprometimento da

viabilidade das células (ver concentração de 250 μ M), o que pode ser percebido já que a densidade das mesmas continua aumentando após várias horas na presença do herbicida.

Crescimento de *A. amazonense* em diferentes concentrações de paraquat

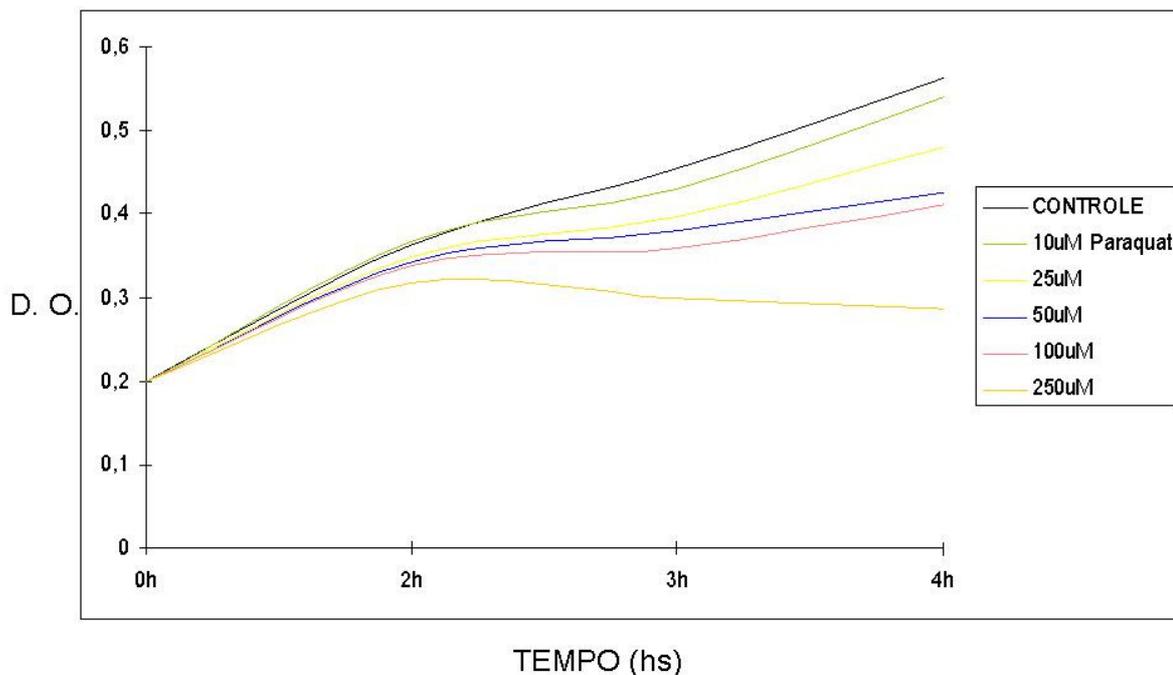


Figura 3.2 – Curva de crescimento de *A. amazonense* em presença de paraquat. *A. amazonense* Y2 foi incubado em concentrações de 10 a 250 μ M de paraquat.

Como forma de determinar o melhor tempo de indução com paraquat, um fragmento de superóxido dismutase de *A. amazonense* isolado em nosso laboratório foi utilizado como sonda em experimentos de hibridização (*northern blot*) onde 5 μ g de RNA total extraído entre uma e 4 horas após a indução foram fixados em uma membrana. Este experimento sugeriu que esse herbicida parece induzir uma maior quantidade de transcritos 3 horas após a indução.

O experimento de indução à resposta genética demonstrou uma boa resistência por parte do microrganismo, permanecendo metabolicamente ativo até concentrações superiores a 100 μ M de paraquat na fase inicial de crescimento, quando comparada a outros experimentos com bactérias e archeas (YAMANAKA, 1983; BRIOUKHANOV *et al.*, 2006).

Outros trabalhos que utilizam paraquat para comparar a resistência de duas linhagens de *E. coli* ao efeito inibitório do agente demonstraram que *E. coli* K12 possui

maior tolerância do que a linhagem *E. coli* B. Os valores de tolerância dessa bactéria são muito maiores do que os suportados por *Azospirillum* podendo ultrapassar 0,5mM. Isso provavelmente deve-se à adaptabilidade dessas bactérias a ambientes mais oxidativos que normalmente é encontrado por espécies patogênicas (KITZLER *et al.*, 1990).

3.2 Isolamento de regiões genômicas diferenciais entre *A. amazonense* e *A. brasilense*

Martin-Didonet *et al.*, (2000) demonstraram que enquanto *A. brasilense* possui 6,8 Mpb divididos em 7 replicons, *A. amazonense* tem um genoma maior, com 7,3 Mpb distribuídos em 4 replicons. Trabalhos feitos em nosso laboratório com a finalidade de visualizar as diferenças entre estes dois genomas resultaram no isolamento de seqüências envolvidas em vários processos metabólicos (CECAGNO R., 2004). Entre eles podemos citar transportadores ABC, que de bactérias a humanos estão envolvidos no bombeamento de uma série de moléculas através da membrana (DAVIDSON & MALONEY, 2007); genes envolvidos com a organização da forma da célula como o gene MreB/MreC que são homólogos bacterianos da actina (DIVAKARUNI *et al.*, 2007); genes envolvidos no metabolismo oxidativo, como a xantina oxidoreductase que é capaz de induzir a formação de radicais superóxido durante sua ação enzimática (HALLIWELL *et al.*, 1999) e genes de defesa a agentes antimicrobianos como a acriflavina. Os dois últimos serão discutidos neste trabalho por estarem envolvidos nos processos de formação e defesa de radicais de oxigênio.

A figura 3.3 mostra um experimento de hibridização DNA-DNA onde os clones do produto diferencial foram transferidos para uma membrana sendo hibridizados com duas sondas: em A, o produto do RDA de *A. amazonense* e em B o DRIVER de *A. brasilense*.

3.2.1 Xantina oxidase/desidrogenase

Entre as enzimas do metabolismo bacteriano indutoras de radicais superóxido podemos ressaltar a xantina oxidase. A maior parte da oxidação de xantinas e hipoxantinas na célula, porém, é realizada pela xantina desidrogenase, que transfere elétrons para NAD^+ e não para O_2 , sem formar radicais livres. O termo oxidoreductase é utilizado para definir ambas as enzimas já que uma pode ser convertida na outra por clivagem proteolítica em resposta ao dano oxidativo (HALLIWELL *et al.*, 1999). Uma vez formados, os radicais

superóxido são convertidos a peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil, muito mais reativos, e que reagem com lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (CHUNG *et al.*, 1997).

O alinhamento da figura 3.4 mostra o fragmento da xantina desidrogensase de *A. amazonense* juntamente com as seqüências mais similares conforme o resultado obtido utilizando o programa Blastp. Em média essas proteínas possuem 750 aminoácidos, sendo que o fragmento isolado possui 260. Como pode ser observado na figura, uma alta homologia é encontrada principalmente entre os aminoácidos 150 e 270 do alinhamento mostrado. Os valores de similaridade e códigos de acessos das proteínas encontram-se na tabela 3.1.

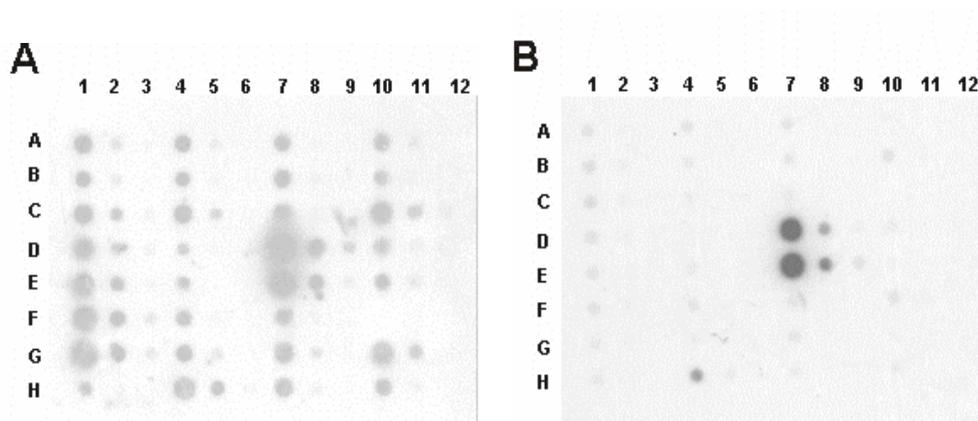


Figura 3.3 - Diferenças genômicas entre *A. amazonense* e *A. brasilense*.

Hibridização (*Southern blot*) mostrando o produto do RDA de *A. amazonense* quando comparado com *A. brasilense*. As sondas marcadas radioativamente foram o produto do RDA em A e o DRIVER de *A. brasilense* em B e foram utilizadas na mesma membrana.

3.2.2 Resistência à Acriflavina

A acriflavina é uma substância antibacteriana capaz de inibir a síntese de DNA. Vários produtos químicos que não são necessariamente danosos à células podem ser transformados em produtos tóxicos *in vivo*. Esta observação pode ser confirmada no organismo *Dyctioselium* que possui o gene *acrA* ativo. Mutantes para esse gene tornam-se resistentes ao metanol e outros agentes tóxicos como a acriflavina e tiabendazol enquanto que o gene *acrA* ativo é letal na presença destas substâncias. Experimentos demonstraram que os genes *acrA* (resistência à acriflavina) e *katA* catalase A parecem muito semelhantes (GARCIA *et al.*, 2002).

Trabalhos em *E. coli* mostraram que ácido poli-hidroxibenzóico induz a expressão do gene *yhcP* que codifica uma proteína também relacionada com o efluxo de múltiplas drogas. Vários componentes contendo ácidos carboxílicos aromáticos estão envolvidos na indução do cluster *yhcRQP* (VAN DYK *et al.*, 2004). Outras proteínas como AcrAB-TolC de *E. coli*, pertencentes à mesma família das anteriores são induzida por paraquat (ROSNER & STORZ, 1997), ácido carboxílicos (MARTIN & ROSNER, 1995) e sais biliares (ROSENBERG *et al.*, 2003).



Figura 3.4 –Xantina desidrogenase. Tradução do fragmento do gene de *A. amazonense* comparado com as seqüências mais similares definidas pelo Blastp. Os valores de identidade e valor E estão mostrados na tabela 3.1.

A figura 3.5 mostra o alinhamento da tradução do fragmento do gene codificante de *acrA* com as seqüências mais similares definidas pelo programa Blastp. O fragmento de 290 aminoácidos corresponde a 30% da média da proteína completa de outras espécies, que tem aproximadamente mil aminoácidos. A maior similaridade é encontrada entre os aminoácidos 180 e 240. Os valores de similaridade e códigos de acessos das proteínas encontram-se na tabela 3.1.

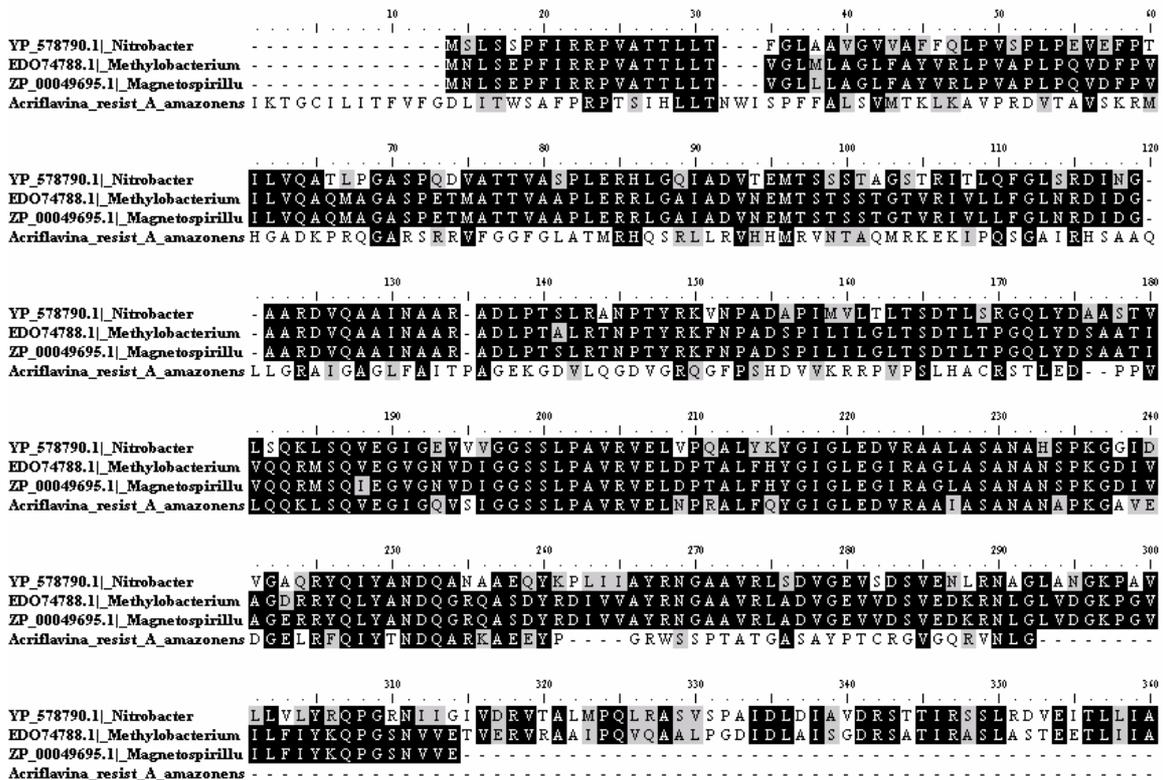


Figura 3.5 – Fragmento do gene *acrA* de *A. amazonense*. Alinhamento da tradução do fragmento do gene de *A. amazonense* comparado com as seqüências mais similares definidas pelo Blastp. Os valores de identidade e valor E estão mostrados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Códigos de acesso e identidade dos genes com maior similaridade aos isolados de *A. amazonense* por RDA.

| Nº de Acesso | Gênero | Produto | Positivos | Valor E |
|----------------|-----------------------------|---|-----------|---------|
| YP_987305.1 | <i>Acidovorax sp.</i> | Xantina desidrogenase | 68% | 5e-42 |
| YP_001418642.1 | <i>Xanthobacter sp.</i> | Xantina desidrogenase | 64% | 8e-42 |
| YP_725526.1 | <i>Ralstonia sp.</i> | Xantina desidrogenase | 62% | 8e-41 |
| YP_001313231.1 | <i>Sinorhizobium sp.</i> | Xantina desidrogenase | 57% | 9E-38 |
| AAAY88879.1 | <i>Azospirillum sp.</i> | Oxidoreductase | - | - |
| YP_578790.1 | <i>Nitrobacter sp.</i> | Proteína de resistência à acriflavina | 87% | 1e-26 |
| EDO74788.1 | <i>Methylobacterium sp.</i> | Proteína de resistência à acriflavina | 83% | 5e-25 |
| ZP_00049695.1 | <i>Magnetospirillum sp.</i> | Proteína relacionada com o efluxo de múltiplas drogas | 83% | 8e-25 |

A análise dos genes presentes exclusivamente em *A. amazonense* comparativamente a *A. brasilense* demonstrou que a metodologia de RDA utilizada (FELSKE, 2002) é promissora para bactérias de solo, mas produz falsos positivos (Figura 3.3B). Apesar dos genes não terem sido testados individualmente para confirmar a presença específica, o fato da maior distribuição de *A. amazonense* quando comparada com *A. brasilense* e o maior tamanho do seu genoma são indícios para acreditar na maior complexidade do genoma da primeira espécie. O fragmento que corresponde à sequência do gene de xantina desidrogenase analisado não parece ser específica de *A. amazonense* já que oxidoreductases de *A. brasilense* já foram seqüenciadas (WASIM & ALEXANDRE, 2005). A caracterização de transportadores ABC e genes de resistência a drogas como acriflavina pode contribuir para o entendimento da maior tolerância ao oxigênio da nitrogenase desta bactéria em extratos brutos, além de maior tolerância ao pH ácido o que já foi confirmado em *A. amazonense* (BURRIS & HARTMANN, 1987; MAGALHÃES *et al.*, 1983).

3.3 Banco de cDNA induzido ao estresse oxidativo

Com o objetivo de isolar seqüências gênicas envolvidas no metabolismo oxidativo e resposta a estresse em *A. amazonense*, esta bactéria foi incubada em meio M79 líquido por 3 horas com 100 µM de paraquat. O banco de cDNA foi sintetizado a partir de uma

população de mRNA enriquecida pela remoção dos 16S e 23S rRNA com *kit Microbexpress* (Ambion). Antes da purificação dos mensageiros o RNA total das condições controle e induzida foram analisados em gel de agarose 2% (Figura 3.6a). Como forma de analisar as populações de cDNA bem como a contaminação por DNA cromossomal, uma amplificação de 25 ciclos de PCR foi realizada, resultando em fragmentos entre 200 e 1400 pb (Figura 3.6b). Devido à ausência de fragmentos maiores e pela visualização de uma população variada nas amostras que corresponderiam ao DRIVER/TESTER concluímos que a qualidade do cDNA correspondia à necessária para o prosseguimento do experimento.

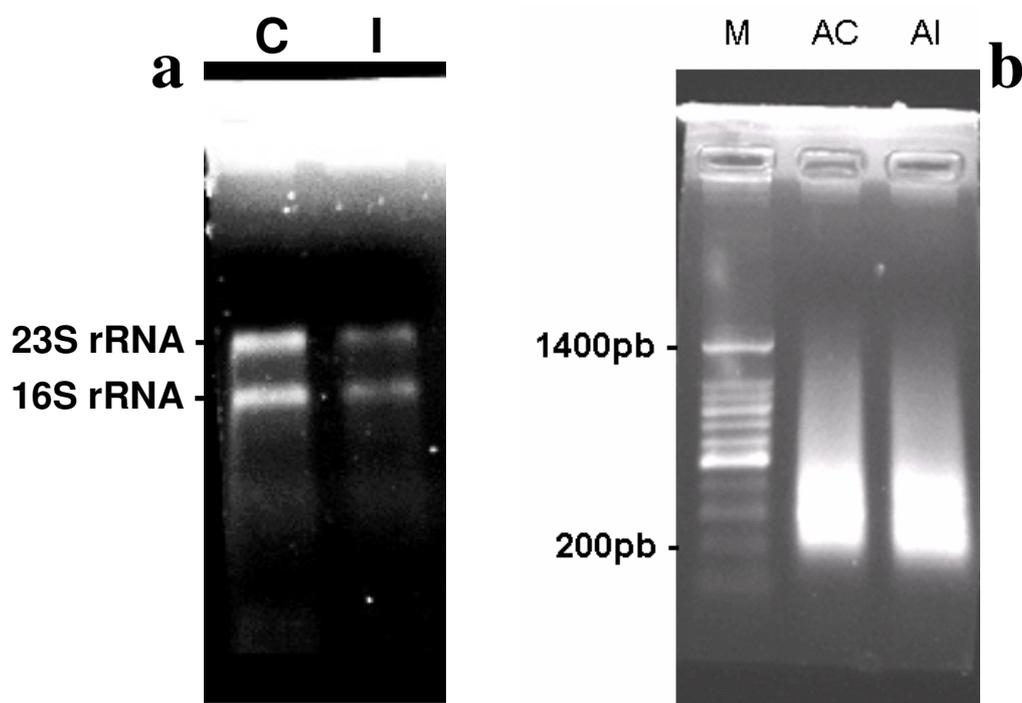


Figura 3.6 Análise da população de RNA e cDNA de *A. amazonense*. a) RNA isolado a partir das condições controle (C) e induzida (I) ao estresse oxidativo. *A. amazonense* foi incubado a 37°C e 160 rpm até uma DO de 0,2. Após esse período 100 µM de paraquat foram adicionados ao meio e o RNA extraído após três horas de indução. b) Análise da qualidade dos fragmentos de cDNA ligados aos adaptadores nas condições controle (AC) e induzida (AI). (M) Marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 (Ludwig)

Após a clonagem e sequenciamento de 96 clones, foram identificadas somente 8 seqüências que correspondiam a genes não relacionados aos rDNAs. Apesar da quantidade razoável de seqüências de rRNA incluindo 5S e tRNA, fragmentos de genes envolvidos no metabolismo oxidativo foram isolados como também algumas seqüências sem similaridade com as depositadas no banco de dados. Entre as seqüências de genes isoladas que codificam proteínas com possível correlação ao metabolismo oxidativo, podemos ressaltar um regulador transcricional da família GntR e uma epimerase/desidratase dependente de NAD.

3.3.1 Regulador transcricional da família GntR.

Essa família de reguladores transcricionais relacionados à regulação do gluconato isolados inicialmente em *Bacillus*, está envolvida no controle de vários processos metabólicos (HAYDON & GUEST, 1991). Juntamente com fatores sigma eles regulam processos de estresse atuando via ligação no DNA (DELORY *et al.*, 2006).

O modelo de ligação do regulador isolado é o hélice-volta-hélice no qual cada um dos monômeros do dímero reconhece um sítio no DNA. Essa família de reguladores GntR-HTH, agora com mais de 270 membros foi dividida em quatro subfamílias, de acordo com a região carboxi-terminal da proteína que possui menor conservação (RIGALI *et al.*, 2002). Foi demonstrado em *E. coli* o envolvimento desses reguladores em resposta a estresse como privação de fosfatos e fontes de carbono (MURRAY *et al.*, 2005).

A figura 3.7 apresenta um alinhamento da seqüência de aminoácidos entre as proteínas desta família com a seqüência de aminoácidos traduzida do fragmento isolado do banco de cDNA. Apesar do tamanho reduzido do fragmento isolado podemos notar uma grande conservação entre os aminoácidos 25 e 55 das proteínas correspondentes, o que é esperado para a região N-terminal desses reguladores (RIGALI *et al.*, 2002). O tamanho médio das proteínas apresentadas varia entre 270 e 500 aminoácidos.

3.3.2 NAD epimerase/desidratase

A maioria dos trabalhos indica como função principal do gene que codifica para NAD epimerase/desidratase o metabolismo de açúcares, como a interconversão de UDP-

galactose para UDP-glicose (THODEN *et al.*, 1997), porém, experimentos com microarranjos demonstraram o envolvimento desse gene na resposta SOS de *Pseudomonas* ao tratamento com o antibiótico Ciprofloxacina (CIRZ *et al.*, 2006). Este é um antibiótico fluorinado utilizado como controle de bactérias Gram positivas e negativas, além de Clamídias e Micobactérias (CAMMACK *et al.*, 2006).

A figura 3.8 apresenta o alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína epimerase/desidratase isolada do banco de cDNA em comparação com o banco de dados. Apesar do fragmento de *A. amazonense* possuir apenas 30 dos 300 aminoácidos encontrados em média nessa proteína, podemos visualizar uma alta homologia entre suas seqüências codificantes.



Figura 3.7 – Regulador GntR

Alinhamento da seqüência de aminoácidos do regulador transcricional da família GntR de *A. amazonense* com as seqüências mais similares definidas pelo Blastp. Os valores de identidade e valor E são mostrados na tabela 3.2.

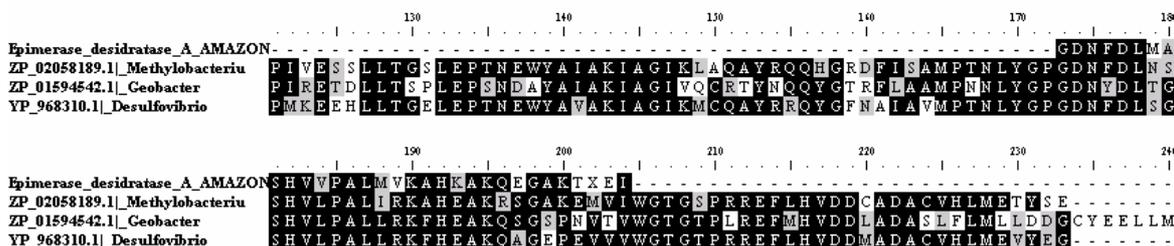


Figura 3.8 - NAD epimerase/desidratase. Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína epimerase/desidratase de *A. amazonense* com as seqüências mais similares definidas pelo Blastp. Os valores de identidade e valor E estão na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Códigos de acesso e identidade dos genes com maior similaridade aos isolados de *A. amazonense* no banco de cDNA.

| Nº de acesso | Gênero | Produto | Positivos | Valor E |
|---------------|-----------------------------|-----------------------|-----------|---------|
| NP_742652 | <i>Pseudomonas sp.</i> | Regulador GNTR | 74% | 4.4 |
| YP_001418953 | <i>Xanthobacter sp.</i> | Regulador GNTR | 74% | 0,013 |
| YP_001470767 | <i>Thermotoga sp.</i> | Regulador GNTR | 78% | 0,078 |
| ZP_02058189.1 | <i>Methylobacterium sp.</i> | Epimerase desidratase | 81% | 5e-4 |
| YP_968310.1 | <i>Desulfovibrio sp.</i> | Epimerase desidratase | 80 % | 0,006 |

O banco de cDNA induzido ao estresse oxidativo resultou na identificação de genes envolvidos com esse processo de maneira secundária, sendo a função principal dos genes encontrados, o metabolismo de açúcares, inclusive na regulação como é o caso do regulador GNTR. Apesar da utilização do *kit Microbexpress* (Ambion) como forma de remoção das seqüências de 16S e 23S rDNA apenas 10% dos fragmentos seqüenciados estavam relacionados a resposta a estresse oxidativo. Podemos sugerir que a baixa qualidade do RNA ou a grande quantidade de transcritos de 16S e 23S rRNA tenham colaborado para a baixa eficiência da purificação. Segundo o fabricante deste *kit*, a remoção dos RNA ribossomais varia de 80 a 90%. Portanto se considerarmos a população restante de 10 a 20% contendo os fragmentos de 5S rRNA e outros pequenos RNAs, podemos considerar adequado o procedimento de purificação dos RNAs mensageiros de *A. amazonense*.

3.4 cDNA-RDA

Visando o isolamento de genes expressos apenas na condição do estresse oxidativo ou de expressão aumentada por este, a metodologia de cDNA-RDA (HUBANK & SHATZ, 1994) foi utilizada. A metodologia de *Representational difference analysis* (RDA) (LISITSYN *et al.*, 1993) combina as técnicas conhecidas de hibridização subtrativa seguida por enriquecimento diferencial utilizando a PCR. Com essa metodologia foram isoladas seqüências genômicas: relacionadas a diversos tipos de cânceres genéticos (LISITSYN *et al.*, 1993); responsáveis pela patogenicidade de espécies do gênero

Neisseria (PERRIN *et al.*, 1999); regiões polimórficas em genomas (BALDOCCHI & FLAHERTY, 1997); do comportamento motor em peixe zebra (SATO & MISHINA, 2003) e seqüências únicas de procariotos (ALEN *et al.*, 2003; FELSKÉ, 2002).

Em 1994, Hubank & Shatz utilizaram a técnica de RDA como forma de analisar a expressão diferencial de genes, metodologia então denominada cDNA-RDA. A partir de então esta tem sido amplamente utilizada como forma de analisar a expressão gênica em eucariotos (SPEROTTO *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2007).

Cinco anos depois, em 1999 foram publicados os primeiros trabalhos envolvendo expressão diferencial em procariotos, onde foram analisados genes diferencialmente expressos em resposta a regulação por ferro (BOWLER *et al.*, 1999), durante a formação de biofilmes (BECKER *et al.*, 2001) ou mimetizando a bactéria em associação com vegetais (MEHTA & ROSATO, 2005).

A análise de expressão diferencial por cDNA-RDA foi realizada conforme os trabalhos de Bowler *et al.*, (1999) e Becker *et al.*, (2001) com exceção do anelamento dos adaptadores (WESTBROCK-WADMAN *et al.*, 1999) e hibridização subtrativa (BRUZEL & CHEUNG, 2006). Esse é o primeiro trabalho utilizando a metodologia de OSPERT associada a RDA. Como resultado foram isolados genes do metabolismo de *A. amazonense*, assim como seqüências envolvidas na resposta ao estresse oxidativo.

A figura 3.9 mostra a população de fragmentos do DRIVER (D) e produto do RDA após os ciclos de hibridização subtrativa seguida por PCR (DP1, DP2, DP3). Os fragmentos entre 334pb e 200pb foram retirados do gel, purificados e clonados em pUC18.

Neste trabalho 96 clones foram submetidos à reação de seqüenciamento da qual foram obtidas 85 seqüências. 40 correspondiam a 16S rRNA; 19 a 23S rRNA; 12 foram eliminadas por conterem somente seqüências correspondentes ao vetor de clonagem; 3 clones de 5S rRNA; 3 hipotéticas e 6 de baixa similaridade, além de fragmentos correspondentes a uma serina protease e alcanosulfonato monooxigenase, envolvidas indiretamente na resposta a estresse em *A. amazonense*.

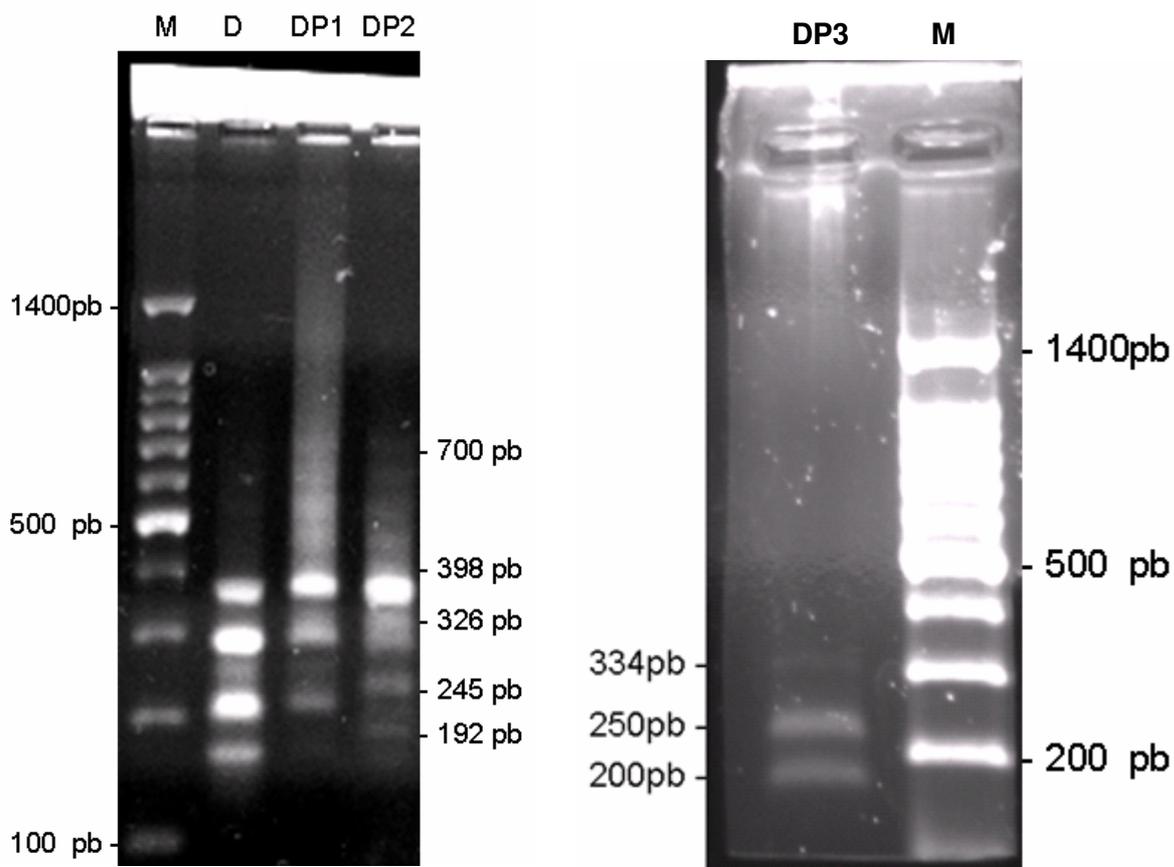


Figura 3.9 Produtos da reação de cDNA-RDA. DRIVER e o produto do RDA durante os três ciclos de hibridização subtrativa seguida de PCR. A estringência utilizada foi de 1:100 na DP1, 1:500 na DP2 e 1:5000 na DP3. Eletroforese em gel de agarose 2% onde foram adicionados 10% das rações de amplificação diferencial. (M) Marcador de peso molecular DNA Ladder 100 (Ludwig).

3.4.1 Serina protease

Trabalhos envolvendo espiroquetas relatam a produção de uma serina protease que promove a resistência a estresse oxidativo. O sequenciamento do genoma de uma espécie de *Borrelia* identificou o gene *bhpA*, homólogo a família de serina proteases HtrA, que estão envolvidas em resposta e estresse e virulência. Resultados demonstraram que *Borrelia* aumenta a expressão deste gene durante a infecção do milho. Espécies patogênicas para humanos, por exemplo, podem utilizar essa proteína para evitar o estresse oxidativo causado por elementos sanguíneos (GUYARD *et al.*, 2006).

A protease HtrA, é encontrada na maioria das bactérias Gram negativas. DegP é um homólogo de HtrA encontrado em clamídias e micobactérias, além de leveduras e humanos. Esta serina protease está associada na resposta a diversos tipos de estresse, inclusive térmico e oxidativo (JONES *et al.*, 2001).

O fragmento de 80 aminoácidos isolado e mostrado no alinhamento da figura 3.10 representa aproximadamente 20 % da média das proteínas correspondentes que possuem em média 450 aminoácidos. A maior similaridade pode ser observada entre os resíduos 200 e 235.

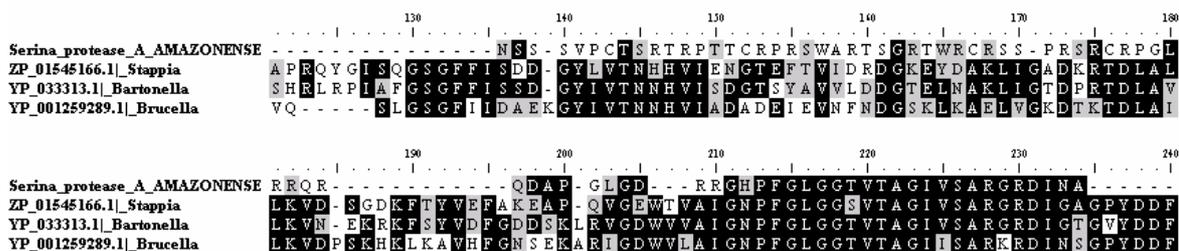


Figura 3.10 - Serina protease. Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína de *A. amazonense* com as seqüências mais similares definidas pelo Blastp. Os valores de identidade e valor E estão na tabela 3.3.

3.4.2 Alcanosulfonato monooxigenase

O cluster *ssuEADCB* de *E. coli* é necessário para a utilização de alcanosulfonatos como fonte de carbono sendo expresso sob condições de limitação de enxofre e cisteínas (EICHHORN *et al.*, 1999). Também foi demonstrado que o estresse oxidativo causado pela multiplicação de *E. coli* na presença de cromatos induz a expressão da alcanosulfonato

monooxygenase, além de enzimas clássicas de efeito antioxidante como superóxido dismutase e catalase (ACKERLEY *et al.*, 2006).

A Figura 3.11 compara o fragmento de 135 aminoácidos isolado de *A amazonense*, com as seqüências mais similares definidas pelo Blastp. Essa proteína em outras espécies possui em média 360 aminoácidos. A maior similaridade é encontrada entre os resíduos 190 e 230 do alinhamento mostrado.

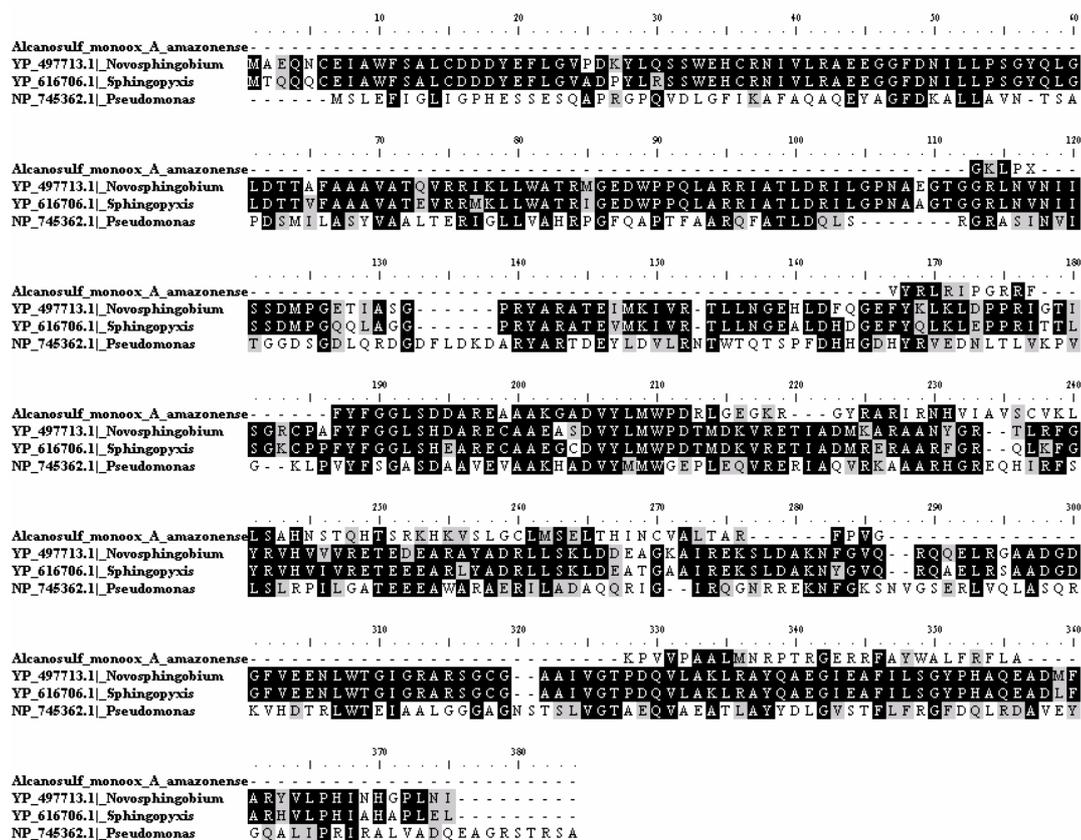


Figura 3.11 - Alcanosulfonato monooxygenase. Alinhamento da seqüência de aminoácidos da proteína de *A. amazonense* com as seqüências mais similares definidas pelo Blastp. Os valores de identidade e valor E estão na tabela 3.3.

A metodologia de cDNA-RDA em bactérias demonstrou ser um procedimento de difícil realização quando comparada com aquela aplicada para eucariotos. O fato de não existir uma cauda de poli-A nos mRNAs bacterianos ou esta ser muito curta, faz com que a síntese de cDNA seja realizada utilizando hexâmeros aleatórios como *primers*. Como resultado deste procedimento temos que o cDNA sintetizado possui grandes quantidades

de seqüências de rRNAs, além de tamanho reduzido. Esse fato é limitante para a síntese de bancos de cDNA bacterianos, assim como para outros trabalhos de expressão.

Tabela 3.3 – Códigos de acesso e identidade dos genes com maior similaridade aos isolados de *A. amazonese* por cDNA-RDA.

| Nº de acesso | Gênero | Produto | Positivos | Valor E |
|---------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------|----------------|
| ZP_01545166.1 | <i>Stappia sp.</i> | Serina protease | 81% | 6e-05 |
| YP_033313.1 | <i>Bartonella sp.</i> | Serina protease | 100% | 9e-05 |
| YP_001259289.1 | <i>Brucella sp.</i> | Serina protease | 95% | 3e-04 |
| YP_497713.1 | <i>Novosphingobium sp.</i> | Alcanosulfonato monooxigenase | 85% | 6e-06 |
| YP_616706.1 | <i>Sphingopyxis sp.</i> | Alcanosulfonato monooxigenase | 85% | 8e-06 |
| NP_745362.1 | <i>Pseudomonas sp.</i> | Alcanosulfonato monooxigenase | 55% | 0,094 |

Durante nosso experimento três diferentes abordagens foram realizadas com finalidade de subtrair as seqüências ribossomais no experimento de cDNA-RDA.

A primeira metodologia utilizada, descrita por Bowler *et al.*, 1999 adiciona um DRIVER que é produto da amplificação de seqüências de 16S e 23S rDNA, de maneira que as subtrações são realizadas com um DRIVER que corresponde à condição controle e outro formado por amplicons de rDNA. No nosso trabalho este experimento não obteve resultado satisfatório, onde apenas fragmentos de rRNA foram encontrados e a metodologia foi substituída pela de Becker *et al.*, (2001).

A segunda metodologia utilizada em nosso trabalho possui a vantagem de iniciar o experimento com quantidades muito menores de populações de TESTER e DRIVER, podendo ser inferiores a 1ng no caso do primeiro. Esse fator faz com que a metodologia seja expandida para populações muito raras de mRNAs como demonstra o experimento com biofilmes de Becker *et al.*, (2001). Somado a tudo isso ainda existe o fato da hibridização subtrativa com emulsão fenólica utilizada por este segundo autor ser realizada com maior eficiência. Um outro fator importante foi que antes do início da utilização da segunda metodologia, foi adicionado como forma de excluir as populações de seqüência de ribossomais, a purificação dos mRNAs com *kit Microbexpress* (Ambion). Desta forma, o

melhor resultado que obtivemos pode ter sido devido à utilização deste procedimento e não por ser a metodologia de Becker mais eficiente.

Em nosso experimento, a emulsão fenólica em temperaturas que oscilam entre 25°C e 65°C foi utilizada. Esta metodologia denominada de OSPERT demonstrou ser de mais simples realização, apresentar melhor desempenho e maior velocidade de realização do que as metodologias de hibridização de DNA descritas anteriormente (BRUZEL & CHEUNG, 2006). Este é o primeiro trabalho utilizando OSPERT associado à técnica de RDA.

Apesar de menos de 10% das seqüências obtidas serem correspondentes a seqüências de mRNAs, a metodologia de cDNA-RDA utilizada resultou em genes envolvidos com o processo de estresse oxidativo. A baixa qualidade do RNA inicialmente utilizado assim como a possível ausência de sítios para MboI em genes que codificam superóxido dismutase, catalase e outros conhecidamente envolvidos no processo de detoxificação de radicais livres são possíveis fatores que contribuíram para a ausência destes produtos no RDA.

A utilização simultânea de uma população de amplicons derivados de seqüências de 16S e 23S rDNA como segundo DRIVER, juntamente com a emulsão fenólica poderiam contribuir para um melhor desempenho do cDNA-RDA em bactérias.

4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que a metodologia de cDNA-RDA para bactérias é uma técnica poderosa para o isolamento de seqüências diferencialmente expressas em microrganismos cujo genoma não é conhecido. Em nosso trabalho, genes envolvidos com o metabolismo oxidativo e resposta ao estresse causado pelo herbicida Gramoxone (Singenta) foram isolados. Apesar de grande quantidade de fragmentos correspondentes a rDNA terem sido encontradas, otimizações como a melhoria da qualidade do RNA e a utilização simultânea de um segundo DRIVER baseado em amplicons de 16S e 23S rDNA com emulsão fenólica poderiam aumentar o desempenho do cDNA-RDA.

Hibridizações (*northern blot*) e RT-PCR devem ainda ser realizadas como forma de confirmar a expressão diferencial. Análises semiquantitativas da expressão desses genes também podem contribuir para o entendimento da alta tolerância de *A amazonense* ao estresse oxidativo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERLEY, D. F.; BARAK, Y.; LYNCH, S. V.; CURTIN, J., & MARTIN, A. Effect of chromate stress on *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 188(9): 3371-3381, 2006.

ALLEN, N. L.; PENN, C. W., & HILTON, A. C. Representational difference analysis: critical appraisal and method development for the identification of unique DNA sequences from prokaryotes. *Journal of Microbiological Methods*, 55(1): 73-81, 2003.

AZEVEDO, M. D. S.; TEIXEIRA, K. R. D.; KIRCHHOF, G.; HARTMANN, A., & BALDANI, J. I. Influence of soil and host plant crop on the genetic diversity of *Azospirillum amazonense* isolates. *Pedobiologia*, 49(6): 565-576, 2005.

BAKSHI, C. S.; MALIK, M.; REGAN, K.; MELENDEZ, J. A.; METZGER, D. W.; PAVLOV, V. M., & SELLATI, T. J. Superoxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. *J.Bacteriol*, 188(17): 6443-6448, 2006.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R., & DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(5-6): 911-922, 1997.

BALDOCCHI, R. A. & FLAHERTY, L. Isolation of Genomic Fragments from Polymorphic Regions by Representational Difference Analysis. *Methods*, 13(4): 337-346, 1997.

BECKER, P.; HUFNAGLE, W.; PETERS, G., & HERRMANN, M. Detection of Differential Gene Expression in Biofilm-Forming versus Planktonic Populations of *Staphylococcus aureus* Using Micro-Representational-Difference Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7): 2958-2965, 2001.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z., & FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*, 65(18-19): 1865-1874, 1999.

BOTELLA, J. A.; ULSCHMID, J. K.; GRUENEWALD, C.; MOEHLE, C.; KRETZSCHMAR, D.; BECKER, K., & SCHNEUWLY, S. The *Drosophila* carbonyl reductase sniffer prevents oxidative stress-induced neurodegeneration. *Curr Biol*, 14(9): 782-786, 2004.

BOWLER, L. D.; HUBANK, M., & SPRATT, B. G. Representational difference analysis of cDNA for the detection of differential gene expression in bacteria: development using a model of iron-regulated gene expression in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*, 145(12): 3529-3537, 1999.

BRIOUKHANOV, A. L.; NETRUSOV, A. I., & EGGEN, R. I. L. The catalase and superoxide dismutase genes are transcriptionally up-regulated upon oxidative stress in the strictly anaerobic archaeon *Methanosarcina barkeri*. *Microbiology-Sgm*, 1521671-1677, 2006.

BRUZEL, A. & CHEUNG, V. G. DNA reassociation using oscillating phenol emulsions. *Genomics*, 87(2): 286-289, 2006.

BURRIS, R. H. & ROBERTS, G. P. Biological Nitrogen Fixation. *Annual Review of Nutrition*, 13:317-335, 1993.

BURRIS, R.; HARTMANN, A.; ZHANG, Y., & FU, H. Control of nitrogenase in *Azospirillum* sp. *Plant and Soil*, 137(1): 127-134, 1991.

CAMMACK, R.; ATWOOD, T.; CAMPBELL, P.; PARISH, H.; SMITH, T.; VELLA, J. S. & FRANK. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford: Oxford University Press, 2006.

CASTRO-SOWINSKI, S.; MATAN, O.; BONAFEDE, P., & OKON, Y. A thioredoxin of *Sinorhizobium meliloti* CE52G is required for melanin production and symbiotic nitrogen fixation. *Mol Plant Microbe Interact*, 20(8): 986-993, 2007.

Cecagno, R.. *Caracterização de genes específicos de Azospirillum amazonense*. Monografia (Bacharelado em Biologia Molecular, Celular e Funcional) – Faculdade de Ciências Biológicas, UFRGS, Porto Alegre, 2004.

CHUNG, H.; BAEK, B.; SONG, S.; KIM, M.; HUH, J.; SHIM, K.; KIM, K., & LEE, K. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *AGE*, 20(3): 127-140, 1997.

CIRZ, R. T.; O'NEILL, B. M.; HAMMOND, J. A.; HEAD, S. R., & ROMESBERG, F. E. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin. *J Bacteriol*, 188(20): 7101-7110, 2006.

DAVIDSON, A. L. & MALONEY, P. C. ABC transporters: how small machines do a big job. *Trends Microbiol*, 2007.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and Economic Contribution. Angra dos Reis: 1995.

DEKHIL, B.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E., & SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Syst.Appl.Microbiol.*, 20: 72-77, 1997.

DELORY, M.; HALLEZ, R.; LETESSON, J. J., & DE BOLLE, X. An RpoH-Like Heat Shock Sigma Factor Is Involved in Stress Response and Virulence in *Brucella melitensis* 16M. *The Journal of Bacteriology*, 188(21): 7707-7710, 2006.

DIVAKARUNI, A. V.; BAIDA, C.; WHITE, C. L., & GOBER, J. W. The cell shape proteins MreB and MreC control cell morphogenesis by positioning cell wall synthetic complexes. *Mol Microbiol*, 66(1): 174-188, 2007.

DIXON, R. & KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Micro*, 2(8): 621-631, 2004.

DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(5-6): 771-774, 1997.

EADY, R. R. Structure-Function Relationships of Alternative Nitrogenases. *Chemical Reviews*, 96(7): 3013-3030, 1996.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M., & HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C(4)-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1): 17-26, 2001.

EICHHORN, E.; VAN DER PLOEG, J. R., & LEISINGER, T. Characterization of a two-component alkanesulfonate monooxygenase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 274(38): 26639-26646, 1999.

EINSLE, O.; TEZCAN, F. A.; ANDRADE, S. L. A.; SCHMID, B.; YOSHIDA, M.; HOWARD, J. B., & REES, D. C. Nitrogenase MoFe-Protein at 1.16 Å Resolution: A Central Ligand in the FeMo-Cofactor. *Science*, 297(5587): 1696-1700, 2002.

EL-KOMY, H. M. A.; SAAD, O. A. O., & HETTA, A. M. A. Significance of *Herbaspirillum seropedicae* inoculation and/or straw amendment on growth and dinitrogen fixation of wheat using N-15-dilution method. *Folia Microbiologica*, 48(6): 787-793, 2003.

FANI, R.; BANDI, C.; BAZZICALUPO, M.; CECCHERINI, M. T.; FANCELLI, S.; GALLORI, E.; GERACE, L.; GRIFONI, A.; MICLAUS, N., & DAMIANI, G. Phylogeny of the genus *Azospirillum* based on 16S rDNA sequence. *FEMS Microbiol Lett*, 129(2-3): 195-200, 1995.

FELSKE, A. Streamlined representational difference analysis for comprehensive studies of numerous genomes. *Journal of Microbiological Methods*, 50(3): 305-311, 2002.

FERGUSON, S. J. Nitrogen cycle enzymology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2(2): 182-193, 1998.

FRED, E. B. *Laboratory Manual of General Microbiology with Special Reference to de Microorganisms of soil*. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc., 1928. p. 145-

GARCIA, M. X.; ROBERTS, C.; ALEXANDER, H.; STEWART, A. M.; HARWOOD, A.; ALEXANDER, S., & INSALL, R. H. Methanol and acriflavine resistance in *Dictyostelium* are caused by loss of catalase. *Microbiology*, 148(1): 333-340, 2002.

GUYARD, C.; BATTISTI, J. M.; RAFFEL, S. J.; SCHRUMPF, M. E.; WHITNEY, A. R.; KRUM, J. G.; PORCELLA, S. F.; ROSA, P. A.; DELEO, F. R., & SCHWAN, T. G. Relapsing fever spirochaetes produce a serine protease that provides resistance to oxidative stress and killing by neutrophils. *Mol Microbiol*, 60(3): 710-722, 2006.

HALBLEIB, C. M.; ZHANG, Y., & LUDDEN, P. W. Regulation of Dinitrogenase Reductase ADP-ribosyltransferase and Dinitrogenase Reductase-activating Glycohydrolase by a Redox-dependent Conformational Change of Nitrogenase Fe Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5): 3493-3500, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J., & GUTTERIDGE, J. M. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HAMZA, I.; CHAUHAN, S.; HASSETT, R., & O'BRIAN, M. R. The Bacterial Irr Protein Is Required for Coordination of Heme Biosynthesis with Iron Availability. *Journal of Biological Chemistry*, 273(34): 21669-21674, 1998.

HARDY, R. W. F.; BURNS, R. C., & HOLSTEIN, R. D. Applications of the Acetylene-Ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biological Biochemistry*, 547-81, 1972.

HARTMANN, A. & BURRIS, R. H. Regulation of Nitrogenase Activity by Oxygen in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology*, 169: 944-948, 1987.

HARTMANN, A. & HUREK, T. Effect of carotenoid overproduction on oxygen tolerance of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Journal of General Microbiology*, 134: 2449-2455, 1988.

HARTMANN, A. & BALDANI, J. The Genus *Azospirillum*. In: Dworkin, M; Falkow, S; Rosenberg, E; Schleifer, K, & Stackbrandt, E, editors. *The Prokaryotes*. New York: Springer, 2006. p. 115-140.

HAYDON, D. J. & GUEST, J. R. A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiol Lett*, 63(2-3): 291-295, 1991.

HE, Y. W.; XU, M.; LIN, K.; NG, Y. J.; WEN, C. M.; WANG, L. H.; LIU, Z. D.; ZHANG, H. B.; DONG, Y. H.; DOW, J. M., & ZHANG, L. H. Genome scale analysis of diffusible signal factor regulon in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: identification of novel cell-cell communication-dependent genes and functions. *Mol Microbiol*, 59(2): 610-622, 2006.

HU, P.; BRODIE, E. L.; SUZUKI, Y.; MCADAMS, H. H., & ANDERSEN, G. L. Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol*, 187(24): 8437-8449, 2005.

HUBANK, M. & SCHATZ, D. G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*, 22(25): 5640-5648, 1994.

IMLAY, J. A.; CHIN, S. M., & LINN, S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*, 240(4852): 640-642, 1988.

JONES, C. H.; BOLKEN, T. C.; JONES, K. F.; ZELLER, G. O., & HRUBY, D. E. Conserved DegP Protease in Gram-Positive Bacteria Is Essential for Thermal and Oxidative Tolerance and Full Virulence in *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity*, 69(9): 5538-5545, 2001.

KHAMMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A., & KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res Microbiol*, 140(9): 679-693, 1989.

KIM, J. & REES, D. C. Nitrogenase and Biological Nitrogen Fixation. *Biochemistry*, 33: 389-397, 1994.

KITZLER, J. W.; MINAKAMI, H., & FRIDOVICH, I. Effects of paraquat on *Escherichia coli*: differences between B and K-12 strains. *The Journal of Bacteriology*, 172(2): 686-690, 1990.

LEE, J. H.; YOUN, C. H.; KIM, B. C., & GU, M. B. An oxidative stress-specific bacterial cell array chip for toxicity analysis. *Biosens Bioelectron*, 22(9-10): 2223-2229, 2007.

LESSER, M. P.; MAZEL, C. H.; GORBUNOV, M. Y., & FALKOWSKI, P. G. Discovery of Symbiotic Nitrogen-Fixing Cyanobacteria in Corals. *Science*, 305(5686): 997-1000, 2004.

LISITSYN, N.; LISITSYN, N., & WIGLER, M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, 259(5097): 946-951, 1993.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R., & DOBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 55: 417-430, 1983.

MARCHAL, K. & VANDERLEYDEN, J. The "oxygen paradox" of dinitrogen-fixing bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 30(5): 363-373, 2000.

MARTÃ-NEZ-DRETS, G.; FABIANO, E., & CARDONA, A. Carbohydrate Catabolism in *Azospirillum amazonense*. *Appl Environ Microbiol*, 50(1): 183-185, 1985.

MARTIN-DIDONET, C. C.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; KLEINA, M.; REGO, F. G.; RIGO, L. U.; YATES, M. G., & PEDROSA, F. O. Genome structure of the genus *Azospirillum*. *J Bacteriol*, 182(14): 4113-4116, 2000.

MARTIN, R. G. & ROSNER, J. L. Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to mar operator sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12): 5456-5460, 1995.

MASEPOHL, B.; DREPPER, T.; PASCHEN, A.; GROSS, S.; PAWLOWSKI, A.; RAABE, K.; RIEDEL, K. U., & KLIPP, W. Regulation of nitrogen fixation in the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 4(3): 243-248, 2002.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B., & LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(3): 620-624, 2007.

MEHTA, A. & ROSATO, Y. B. Identification of differentially expressed genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by representational difference analysis of cDNA. *Genetics and Molecular Biology*, 28:140-149, 2005.

MONTOYA, J. P.; HOLL, C. M.; ZEHR, J. P.; HANSEN, A.; VILLAREAL, T. A., & CAPONE, D. G. High rates of N₂ fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature*, 430(7003): 1027-1032, 2004.

MURRAY, E. L. & CONWAY, T. Multiple Regulators Control Expression of the Entner-Doudoroff Aldolase (Eda) of *Escherichia coli*. *The Journal of Bacteriology*, 187(3): 991-1000, 2005.

MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K., & BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell*, 7: 869-885, 1995.

OLIVEIRA, A. L. M., URQUIAGA, S., DOBEREINER, J., AND BALDANI, J. I. Biological nitrogen fixation (BNF) in micropropagated sugarcane plants inoculated with different endophytic diazotrophic bacteria. 38, 425. 2006. The Netherlands, Kluwer Academic Publ. Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity.

OLIVEIRA, I. P.; FERREIRA, E.; ALVES, B. J. R.; CADISCH, G.; MIRANDA, C. H. B.; VILELA, L.; BODDEY, R. M.; & URQUIAGA, S. A Baixa Disponibilidade de Nutrientes do Solo Como Uma Causa Potencial da Degradação de Pastagens No Cerrado Brasileiro. 110-117. 1987. Viçosa: SOBRAD; UFV/DPS/DEF, OURO PRETO-MG.

PARK, J. S.; CHOUNG, M. G.; KIM, J. B.; HAHN, B. S.; KIM, J. B.; BAE, S. C.; ROH, K. H.; KIM, Y. H.; CHEON, C. I.; SUNG, M. K., & CHO, K. J. Genes up-regulated during red coloration in UV-B irradiated lettuce leaves. *Plant Cell Reports*, 26(4): 507-516, 2007.

PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G., & NEWTON, W. E. Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity: Kluwer Academic Publishers, 2000.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E. T., & TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(6): 1263-1271, 2006.

PERRIN, A.; NASSIF, X., & TINSLEY, C. Identification of Regions of the Chromosome of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* Which Are Specific to the Pathogenic *Neisseria* Species. *Infection and Immunity*, 67(11): 6119-6129, 1999.

POTRICH, D. P.; BRESSEL, T. A.; SCHRANK, I. S., & PASSAGLIA, L. M. P. Sequencing and promoter analysis of the *nifENXorf3orf5fdxAnifQ* operon from *Azospirillum brasilense* Sp7. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34(11): 1365-1496, 2001.

RAISON, R. J. & STOTTLEMYER, R. Considerations in modeling change in temperate forest nitrogen cycles. 9: 209-225, 1991.

RATET, P.; PAWLOWSKI, K.; SCHELL, J., & DE BRUIJN, F. J. The *Azorhizobium caulinodans* nitrogen-fixation regulatory gene, *nif A*, is controlled by the cellular nitrogen and oxygen status. *Mol.Microbiol.*, 3: 825-838, 1989.

REES, D. C. & HOWARD, J. B. Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4(5): 559-566, 2000.

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

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S., & REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28: 103-113, 2004.

RIBBE, M.; GADKARI, D., & MEYER, O. N₂ Fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* Involves a Molybdenum-Dinitrogenase and a Manganese-Superoxide Oxidoreductase That Couple N₂ Reduction to the Oxidation of Superoxide Produced from O₂ by a Molybdenum-CO Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42): 26627-26633, 1997.

RIGALI, S.; DEROUAUX, A.; GIANNOTTA, F., & DUSART, J. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J Biol Chem*, 277(15): 12507-12515, 2002.

ROSENBERG, E. Y.; BERTENTHAL, D.; NILLES, M. L.; BERTRAND, K. P., & NIKAIDO, H. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Mol Microbiol*, 48(6): 1609-1619, 2003.

ROSNER, J. L. & STORZ, G. Regulation of bacterial responses to oxidative stress. *Curr Top Cell Regul*, 35: 163-177, 1997.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.

SATO, T. & MISHINA, M. Representational difference analysis, high-resolution physical mapping, and transcript identification of the zebrafish genomic region for a motor behavior. *Genomics*, 82(2): 218-229, 2003.

SCHMID, B.; EINSLE, O.; CHIU, H. J.; WILLING, A.; YOSHIDA, M.; HOWARD, J. B., & REES, D. C. Biochemical and Structural Characterization of the Cross-Linked Complex of Nitrogenase: Comparison to the ADP-A1F4-Stabilized Structure. *Biochemistry*, 41(52): 15557-15565, 2002.

SEEFELDT, L. C.; DANCE, I. G., & DEAN, D. R. Substrate Interactions with Nitrogenase: Fe versus Mo. *Biochemistry*, 43(6): 1401-1409, 2004.

SONG, S. D.; HARTMANN, A., & BURRIS, R. H. Purification and properties of the nitrogenase of *Azospirillum amazonense*. *The Journal of Bacteriology*, 164(3): 1271-1277, 1985.

SPEROTTO, R. A.; RICACHENEVSKY, F. K., & FETT, J. P. Iron deficiency in rice shoots: identification of novel induced genes using RDA and possible relation to leaf senescence. *Plant Cell Rep*, 26(8): 1399-1411, 2007.

STORZ, G. & IMLAYT, J. A. Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, 2(2): 188-194, 1999.

STUDHOLME, D. J. & DIXON, R. In silico analysis of the σ^{54} -dependent enhancer-binding proteins in *Pirellula* species strain 1. *FEMS Microbiology Letters*, 230(2): 215-225, 2004.

SWEM, L. R.; SWEM, D. L.; WU, J.; BAUER, C. E. & MELVIN, I. S. Purification and Assays of Rhodobacter capsulatus RegB-RegA Two[hyphen (true graphic)] Component Signal Transduction System Methods in Enzymology. Academic Press, 2007. p. 171-183.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R., & DOBEREINER, J. A taxonomic study of the Spirillum lipoferum group, with descriptions of a new genus, Azospirillum gen. nov. and two species, Azospirillum lipoferum (Beijerinck) comb. nov. and Azospirillum brasilense sp. nov. Canadian Journal of Microbiology, 24: 967-980, 1978.

TATEO, Y. Effect of Paraquat on Growth of Nitrosomonas europaea and Nitrobacter agilis. Plant and Cell Physiology, 24(7): 1349-1352, 1983.

THODEN, J. B.; HEGEMAN, A. D.; WESENBERG, G.; CHAPEAU, M. C.; FREY, P. A., & HOLDEN, H. M. Structural Analysis of UDP-Sugar Binding to UDP-Galactose 4-Epimerase from Escherichia coli. Biochemistry, 36(21): 6294-6304, 1997.

TIWARI, M.; PARODA, S., & DADARWAL, K. R. Associative diazotrophs of pearl millet (Pennisetum glaucum) from semi arid region--isolation and characterization. Indian J Exp Biol, 41(4): 341-345, 2003.

TOUATI, D. Iron and Oxidative Stress in Bacteria. Archives of Biochemistry and Biophysics, 373(1): 1-6, 2000.

TUCKERMAN, J. R.; GONZALEZ, G.; DIOUM, E. M., & GILLES-GONZALEZ, M. A. Ligand and Oxidation-State Specific Regulation of the Heme-Based Oxygen Sensor FixL from Sinorhizobium meliloti. Biochemistry, 41(19): 6170-6177, 2002.

VAN DYK, T. K.; TEMPLETON, L. J.; CANTERA, K. A.; SHARPE, P. L., & SARIASLANI, F. S. Characterization of the Escherichia coli AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve? J Bacteriol, 186(21): 7196-7204, 2004.

VIENNEAU, D. M.; SULLIVAN, C. A.; HOUSE, S. K., & STRATTON, G. W. Effects of the herbicide hexazinone on nutrient cycling in a low-pH blueberry soil. Environ Toxicol, 19(2): 115-122, 2004.

WASIM, M. & ALEXANDRE, G. Role of oxidative stress resistance in motility and cell differentiation in Azospirillum brasilense. 2005. Trabalho não publicado.

WESTBROCK-WADMAN, S.; SHERMAN, D. R.; HICKEY, M. J.; COULTER, S. N.; ZHU, Y. Q.; WARRENER, P.; NGUYEN, L. Y.; SHAWAR, R. M.; FOLGER, K. R., & STOVER, C. K. Characterization of a Pseudomonas aeruginosa efflux pump contributing

to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(12): 2975-2983, 1999.

XIE, C. H. & YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4): 1435-1438, 2005.

YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J., & MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1): 103-119, 1985.

YASSIN, A. F. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil contaminated soil. 2006. Trabalho não publicado

