MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR E ESFEROPLASTIZAÇÃO APLICADOS À
RHIZOBIACEAE

MARIA JOSÉ VALARINI

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do Tí-
tulo de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Março - 1989

Valarini, Maria José
V137m Métodos de biologia molecular e esferoplastização aplicados à Rhizobiaceae. Piracicaba, 1989.

137p. illus.

Tese - ESALQ
Bibliografia

1. Bactéria fixadora de nitrogênio - Biologia molecular. 2. Bactéria fixadora de nitrogênio - Esferoplastização. 3. Bactéria fixadora de nitrogênio - Genética. 4. Nitrogênio - Fixação. I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba.

CDD 589.95

MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR E ESFEROPLASTIZAÇÃO APLICADOS À RHIZOBIACEAE

MARIA JOSÉ VALARINI

APROVADA EM 30/03/89

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr João Lúcio de Azevedo (ESALQ/USP)

Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani - Kleiner (ESALQ/USP)

Profa. Dra. SIU MUI TSAI SAITO (CENA/USP)

Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos (FCAVJ/UNESP)

Dr. Eli Sidney Lopes (IAC/CPA-SAA)

João Lúcio de Azevedo
- ORIENTADOR -

Ao

Meu pai ("in memorium")

À minha mãe,

por tudo

Dedico

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela orientação deste trabalho e pela marcante participação em nossa carreira científica.
 - Ao Prof. Dr. Shinji Tsuyumu da Faculdade de Agricultura, Universidade de Shizuoka, Shizuoka-Shi, Japão pela decisiva colaboração no desenvolvimento do trabalho e confiança em nós depositada.
 - Ao Dr. Yoshitaka Tanaka pelo contato junto ao Prof. Shinji Tsuyumu oportunidade rara de conviver junto ao trabalho, responsabilidade e seriedade japoneses.
 - Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal/SP, pela disponibilidade de seu laboratório e concessão de uma linhagem bacteriana.
 - Aos, então, acadêmicos de agronomia Seiji Endoh e Masahiko Miura do Laboratório de Patologia de Plantas, Universidade de Shizuoka, Shizuoka-Shi-Japão e Nilo Ikuta do Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), pela imprecindível colaboração técnica e companherismo.
 - Aos funcionários e demais amigos do Setor de Genética de microrganismo do Departamento de Genética, ESALQ-USP, Piracicaba, e do Laboratório de Patologia de Plantas da Faculdade de Agricultura, Universidade de Shizuoka, Shizuoka-Shi, Japão.
- Ao Instituto de Zootecnia, CPA/SA, Nova Odessa/SP, nas pessoas do, então, Diretor Geral Dr. Ronaldo Mário Barbosa da Silva e do, então, e atual Chefe da Seção de Agronomia de Plantas Forrageiras Dr. Paulo Bardauil Alcântara pela oportunidade e incentivo.
- Ao Cláudio Costa pelo auxílio na tradução do resumo.
 - À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.
 - À Nilce T. Puga pelo auxílio na listagem bibliográfica.

ACKNOWLEDGMENTS

I am greatly indebt to:

- Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo for excellent technical assistance during this work and in my scientific career.
- Prof. Dr. Shinji Tsuyumu from the Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka-Shi, Japan, for the conclusive technical and personal help during my staying in his laboratory.
- Dr. Yoshitaka Tanaka for introducing me to Prof. Shinji Tsuyumu and for the opportunity I was given in visiting Japan and in sharing the earnestness, responsibilities and greatness of the Japanese people.
- Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos from Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal, State University of São Paulo, for the facilities in my staying in his laboratory and proving a bacterial strain.
- The staff and to all my colleagues of Departament of Genetics, ESALQ-USP, Brazil, and Laboratory of Plant Pathology, Shizuoka University, Japan.
- Dr. Ronaldo Barbosa da Silva, former Director General and to Dr. Paulo Bardauil Alcântara, Chief of the Forage Plants Section of the Insstituto de Zootecnia, CPA-SA, Nova Odessa, Brazil for their help and encouragement.
- The brazilian scholarship supporteres, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) and Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), for the scholarship.
- Cláudio Costa for the help in translating the summary.
- Nilce T. Puga for help in preparing the bibliographic references.

SUMÁRIO

PAG

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. GENES ENVOLVIDOS NA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO EM RHIZOBIACEAE.....	5
2.2. EXPRESSÃO DOS GENES SIMBIÓTICOS.....	17
2.3. ESTRATÉGIAS E MÉTODOS GENÉTICO PARA ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.....	23
3. MATERIAL E MÉTODO.....	34
3.1. LINHAGEM DE BACTERIAS UTILIZADAS.....	35
3.2. ESPÉCIE DE PLANTAS UTILIZADAS.....	37
3.3. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	37
3.3.1. MEIO COMPLETO.....	37
3.3.2. MEIO MÍNIMO.....	38
3.3.3. MEIO TY.....	38
3.3.4. L.B.....	38
3.3.5. L.A.....	39
3.3.6. YS14.....	39
3.4. SOLUÇÕES GERAIS UTILIZADAS.....	39
3.4.1. SOLUÇÃO SALINA.....	39
3.4.2. SOLUÇÃO HIPOCLORITO DE SÓDIO.....	39
3.4.3. TAMPÃO FOSFATO.....	40
3.4.4. SOLUÇÃO NUTRITIVA PARA PLANTAS.....	40
3.4.5. SOLUÇÃO DE METIONINA.....	40

3.4.6. SOLUÇÃO DE LISOZIMA.....	41
3.4.7. SOLUÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÊICOS.....	41
3.4.8. SOLUÇÃO DE AMINOÁCIDOS.....	42
3.4.9. SOLUÇÃO DE VITAMINAS.....	42
3.5. SOLUÇÕES ESPECÍFICAS UTILIZADAS.....	43
3.5.1. FUSÃO DE PROTOPLASTOS.....	43
3.5.2. DETECÇÃO DE DNA PLASMÍDICO EM RHIZOBICEAE..	43
3.5.3. ISOLAMENTO DE DNA PLASMÍDICO EM E.COLI.....	44
3.5.4. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DE BRADYRHIZOBIUM spp	45
3.5.5. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	47
3.5.6. ELETROELUIÇÃO DO DNA DO GEL DE AGAROSE.....	48
3.5.7. DIGESTÃO DO DNA PLASMÍDICO E CROMOSSÔMICO..	49
3.5.8. DEFOSFORILAÇÃO DO DNA.....	50
3.5.9. LIGAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO AO PLASMÍDIO VE- TOR.....	50
3.5.10. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	51
3.6. ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS.....	51
3.7. MUTAGENESE INDUZIDA POR ULTRA VIOLETA.....	53
3.8. INTRODUÇÃO (MUTAGENESE) DO TRANSPOSON Tn5 EM RHIZO BIUM.....	53
3.9. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFI- COS.....	54
3.10. OBTENÇÃO DE ESFEROPLASTOS EM RHIZOBIUM.....	55
3.11. FUSÃO DE PROTOPLASTOS.....	56

3.12. DETECÇÃO DE DNA PLASMIDICO EM RHIZOBIACEAE.....	57
3.13. ISOLAMENTO DE DNA PLASMIDICO EM E. COLI.....	58
3.14. EXTRAÇÃO FENOL/CLOROFORMIO.....	59
3.15. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DE RHIZOBIUM spp.....	60
3.16. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	62
3.17. ELETROELUIÇÃO DO DNA DO GEL DE AGAROSE.....	63
3.18. DIGESTÃO DO DNA PLASMÍDICO E CROMOSSOMICO.....	64
3.19. DESFOSFORILAÇÃO DO DNA.....	66
3.20. LIGAÇÃO DO DNA CROMOSSOMICO DE BRADYRHIZOBIUM COM O DNA DO PLASMÍDIO VETOR.....	67
3.21. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA PELO MÉTODO DO CLORETO DE CÁLCIO.....	67
3.22. CONJUGAÇÃO BACTERIANA.....	69
3.22.1. CONJUGAÇÃO BIPARENTAL.....	69
3.22.2. CONJUGAÇÃO TRIPARENTAL.....	70
3.23. TESTE DE NODULAÇÃO EM PLANTAS.....	71
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1. ISOLAMENTO DE MUTANTE AUXOTRÓFICO U.V. INDUZIDO...	72
4.2. TRANSFERÊNCIA DO TRANSPOSON E ISOLAMENTO DE MUTAN- TE Tn5 INDUZIDO.....	76
4.3. OBTENÇÃO DE ESFEROPLASTOS.....	79
4.3.1. TRATAMENTO COM LISOZIMA.....	79
4.3.2. TRATAMENTO COM LISOZIMA E GLICINA.....	87
4.4. FUSÃO DE PROTOPLASTOS.....	91

4.5. DETECÇÃO DE PLASMÍDIOS EM GEL DE AGAROSE EM RHIZO-	
BIUM.....	92
4.6. EXTRAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO DE BRADYRHIZOBIUM E	
REAÇÃO DE LIGAÇÃO DOS DNAs.....	96
4.7. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	98
4.7.1. PLASMÍDIO VETOR DE CLONAGEM.....	99
4.7.2. BANCO GENÔMICO DE BRADYRHIZOBIUM.....	100
4.8. CONJUGAÇÃO BACTERIANA TRIPARENTAL.....	104
5. CONCLUSÕES.....	106
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

- FIGURA 1: Curva de concentração estimada de ácido nucléico total de solução de células de R. leguminosarum biovar phaseoli e de Bradyrhizobium spp tratada com diferentes concentrações de lisozima e lisadas em meio hipotônico..... 83
- FIGURA 2: Curvas de concentração estimada de proteína de solução de células de R. leguminosarum biovar phaseoli e de Bradyrhizobium spp tratada com diferentes concentrações de lisozima e lisadas em meio hipotônico..... 84
- FIGURA 3: Células de R. leguminosarum biovar phaseoli C05 (1000X) sem tratamento enzimático (a) e tratadas com enzima de lise de parede celular, mostrando formas arredondadas (b)..... 90
- FIGURA 4: Perfil eletroforético em gel de agarose para DNA plasmídico de R. leguminosarum biovar phaseoli C05 (a) e Bradyrhizobium spp (b)..... 94
- FIGURA 5: Diagrama do plasmídio pUC119 (VIEIRA & MESSING, 1987) indicando, entre outros, os sítios de restrição da enzima Bam HI e de inserção do fragmento de DNA Sau 3AI de Bradyrhizobium spp dentro da região "lac".....102

LISTA DE TABELAS

PAG

TABELA 1: Espécies e linhagens de bactérias utilizadas, características relevantes e fonte de obtenção ou referência das mesmas.....	36
TABELA 2: Modo de ação, mecanismos de resistência e fabricantes dos antibióticos utilizados no trabalho.....	52
TABELA 3: Números e porcentagens de células de <u>R. leguminosarum</u> biovar <u>phaseoli</u> C05 sobreviventes à radiação U.V. em diferentes tempos de tratamento...	73
TABELA 4: Valores relativos à espectrofotometria de varredura de onda de 220 a 300 nm para uma solução de células de <u>R. leguminosarum</u> biovar <u>phaseoli</u> C05 submetida a diferentes concentrações de lisozima.....	81
TABELA 5: Valores relativos à espectrofotometria de varredura de onda de 220 a 300 nm para uma solução de células de <u>Bradyrhizobium</u> spp submetida a diferentes concentrações de lisozima..	82
TABELA 6: Porcentagem de esferoplastos e/ou protoplastos obtidos para <u>R. leguminosarum</u> biovar <u>phaseoli</u> C05 após tratamento com glicina e lisozima sob diferentes concentrações e tempos de tratamento.....	88

MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR E ESFEROPLASTIZAÇÃO APLICADOS À RHIZOBIACEAE

Autora: Maria José Valarini

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

RESUMO

O presente trabalho objetivou o estudo de alternativas de transferência genética em Rhizobium e Bradyrhizobium. Para tal, células de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli C05 e de Bradyrhizobium spp, isolado natural da leguminosa forrageira tropical Neonotonia wightii, foram ensaiadas para alguns métodos de biologia molecular, incluindo introdução de elemento de inserção genética e utilização de vetor de clonagem, isolamento de mutantes, detecção de plasmídeos em gel de agarose, isolamento de DNA total e construção de banco genômico em E. coli e esferoplastização.

Mutantes metionina-deficientes induzidos por U.V. e por introdução do transposon Tn5, foram isolados com frequências de $0,7 \cdot 10^{-3}$ (0,15%) e $0,6 \cdot 10^{-3}$ (0,18%), respectivamente, e utilizados, associados à resistência a antibióticos, como marcadores genéticos em conjugação triparental. Introdução do transposon Tn5, através do vetor suicida pJB4JI portador do fago Mu, em R. leguminosarum biovar phaseoli C05 se deu a uma frequência da ordem de 10^{-3} . O perfil de DNA plasmidial, em gel de agarose, obtido para ambas as espécies mostrou a presença de banda plasmidial para a espécie de Rhizobium mas não para a espécie de Bradyrhizobium, reiterando a dificuldade de detecção deste elemento ou que neste gênero os genes "nif" e "nod" não estejam localizados em grandes plasmídios.

Através de pré-tratamento com glicina e, em seguida, com lisozima (300ug/ml) foi possível obtenção de esferoplastos e/ou protoplastos de 90% das células com menos de 6 horas de tratamento. Células de Rhizobium e Bradyrhizobium apresentam resistência à reação de lisozima.

Utilizando-se do vetor de inativação insercional pUC 119 foi construído um banco genômico de DNA total da estirpe de Bradyrhizobium spp. e estabelecido, por transformação, em E. coli HB101. O plasmídio híbrido resultante conteve fragmentos de DNA de 10-20 kilobases inseridos no sítio de poliligação da região lac z do pUC 119. Mobilização do plasmídio pSUP 5011::Tn5 mob⁺ para R. leguminosarum biovar phaseoli C05 foi observada a uma frequência de $0,4.10^{-5}$, através de sistema plasmidial binário, incluindo o vetor de trans-complementação pRK2013 (tra⁺).

METHODS ON MOLECULAR BIOLOGY AND SPHEROPLASTING APPLIED TO RHIZABIACEAE

Author: Maria José Valarini

Adviser: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

SUMMARY

Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli C05 and a wild strain of Bradyrhizobium, isolated from the tropical forage legume Neonotonia wightii, were tested for the procedures of molecular biology, including introduction of the transposon Tn5, mutagenesis U.V. and transposon-induced, plasmid DNA detection, total DNA isolation, and genetic cloning and transfer in E. coli (genomic bank) and spheroplasting.

Methionine-requiring mutants U.V. and transposon Tn5-induced were isolated in the frequencies of $0,7 \cdot 10^{-3}$ (0,15%) and $0,6 \cdot 10^{-3}$ (0,18%), respectively. These mutants were used, associated with antibiotic resistances, as genetic markers in triparental matings. The transposon Tn5 was introduced into the genome of R. leguminosarum biovar phaseoli C05, through the suicide vector pJB4JI carrying Mu phage, in the frequency of about 10^{-3} . The plasmid DNA profile in the agarose gel only showed the presence of plasmid band to the Rhizobium species. Similar plasmid DNA cannot be detected in Bradyrhizobium species, reiterating the difficulty of detection or in Bradyrhizobium, "nif" and "nod" genes are not located on large plasmid.

By culturing cells in the presence of glycine, followed by treatment with lysozyme (300ug/ml), it was possible the formation of spheroplasts and/or protoplasts in more than 90% of the cells for less than 6 hours of treatment. Cells of Rhizobium and Bradyrhizobium are naturally resistant to the lysozyme action.

By using the insertional inactivation vector pUC119, a genomic bank of the total DNA from the Bradyrhizobium species has been constructed and established by transformation in E. coli HB101. The hybrid plasmids of the bank contained Bradyrhizobium DNA fragments of 10-20 kilobases inserted into "lac" z region. Mobilization of the pSUP 5011::Tn5 mob⁺ plasmid to R. leguminosarum biovar phaseoli C05 was effected in frequency $0,4 \cdot 10^{-5}$, through the binary plasmid system, including the "trans"-complementation vector pRK2013.

1.- INTRODUÇÃO

Na natureza, a capacidade de fixação biológica de nitrogênio atmosférico é restrita a certos procariotos os quais apresentam a capacidade de sintetizar nitrogenase, enzima que cataliza a redução de nitrogênio elementar (N_2) à amônia (NH_3). Bactérias dos gêneros Rhizobium e Bradyrhizobium(1) são capazes de estabelecer associações simbióticas fixadoras de N_2 com plantas da família Leguminosae, principalmente. Tal processo é representado por vários estágios incluindo, reconhecimento e infecção dos pelos radiculares,

(1)

O novo sistema de classificação para a família Rhizobiaceae reconhece três Gêneros, sendo que os Gêneros I e II incluem espécies de bactérias do tipo rizóbio enquanto o Gênero III inclui espécies do tipo agrobactéria. Segundo JORDAN (1984) todos os rizóbios de crescimento rápido e produtores de ácido foram classificados dentro do Gênero Rhizobium (Gênero I) e todos os rizóbios de crescimento lento e produtores de álcali, dentro do Gênero Bradyrhizobium (Gênero II). Sob esse novo sistema Rhizobium trifolii, R. phaseoli e R. leguminosarum foram agrupados dentro da espécie R. leguminosarum na forma de três biovariedades, trifolii, phaseoli e viceae. R. meliloti permaneceu como anteriormente e R. loti foi classificado como rizóbio de crescimento rápido associado a Lotus. Os rizóbios nodulantes

desenvolvimento e diferenciação de nódulos, multiplicação da bactéria e conversão em bacteróides nas células da planta hospedeira e, finalmente, redução do nitrogênio molecular à amônia. É um fenômeno complexo o qual demanda grande quantidade de energia, requerendo expressão gênica sequencial e coordenada de ambos os simbiossiontes - há especificidade nessa interação. Melhoramento de leguminosas para aumento da fixação simbiótica de nitrogênio tem sido objetivo de diversos programas, sendo que, durante a última década pesquisas em fixação biológica de N_2 foram consideravelmente intensificadas. Tal fato resultou em um rápido aumento do conhecimento principalmente do gênero Rhizobium, com possibilidade de manipulação genética do mesmo.

Diversas técnicas experimentais têm sido desenvolvidas para análise dos genes para simbiose em Rhizobium e Bradyrhizobium. Transferência de material genético

de L.corniculatus, L.tenuis, Cicer arietinum, Leucaena leucocephala e Sophora microphylla, principalmente, foram considerados geneticamente relacionados ao R.lotii. Os rizóbios específicos de soja (Glycine max) foram classificados em espécies pertencentes à dois diferentes Gêneros, R.japonicum (crescimento rápido e produtor de ácido) e Bradyrhizobium japonicum (crescimento lento e produtor de álcali). Os rizóbios simbiossiontes de Vigna, Arachis, Desmodium, Macroptilium, Stylosanthes, Neonotonia, etc. não foram classificados em espécie, mas agrupados no Gênero Bradyrhizobium. Há que se informar que a nomenclatura considerada no texto manteve a notação original dos autores citados, sendo que o presente trabalho adotou a taxonomia atualizada.

por conjugação e transdução possibilitou a construção de mapas de ligação em diferentes espécies. Através de tratamentos mutagênicos, mutantes alterados em propriedades simbióticas foram obtidos e caracterizados. Hibridização interespecífica de sequências *nif*, clonadas a partir de Klebsiella pneumoniae contribuiu decisivamente para identificação de muitos genes simbióticos. Utilizando-se de técnicas de eletroforese em gel de agarose tem-se verificando que em muitas espécies de Rhizobium, genes para nodulação (*nod*) e fixação de N_2 (*fix*), incluindo genes estruturais codificadores da enzima nitrogenase (*nif*) estão localizados em plasmídios (*sym*).

Desenvolvimentos recentes em pesquisas do REGULAÇÃO *nif*, através de técnicas de DNA recombinante, elementos de inserção genética (transposons) e fusão de genes têm contribuído para a determinação do número e função dos genes em termos bioquímicos, bem como dos fatores reguladores da expressão e melhoramento genético da fixação de nitrogênio.

O presente trabalho objetivou ensaiar as espécies Bradyrhizobium spp e Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli C05, quanto a metodologias de biologia molecular, in-

cluindo a utilização de elementos da inserção, vetor de clonagem, isolamento de plasmídios por meio de eletroforese em gel de agarose, construção de banco genômico, obtenção de esferoplastos e/ou protoplastos como alternativas de recombinação genética em Rhizobiaceae.

Pretende-se, com o desenvolvimento de tais metodologias, identificar (Hibridização tipo "SOUTHERN") e transferir sequências genéticas responsáveis pela nodulação (fragmentos "nod") entre as referidas espécies de Bradyrhizobium e Rhizobium. Há que se salientar, também, que esses métodos constituem, praticamente, pré-requisitos para manipulação genética em espécies de bactérias, principalmente.

2.- REVISÃO DE LITERATURA

2.1. GENES ENVOLVIDOS NA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO EM RHIZOBIACEAE.

A identificação e caracterização dos genes envolvidos na associação simbiótica fixadora de N_2 atmosférico em Rhizobiaceae, objetivando estabelecer correlação entre os *loci* genéticos e os eventos múltiplos que ocorrem durante o referido processo, têm sido objeto de muitos estudos (BANFALVI et alii, 1981; CORBIN et alii, 1982 e 1983; HIRSCH et alii, 1983; DOWNIE et alii, 1983; KONDOROSI et alii, 1984a; ROSTAS et alii, 1984; EBELING et alii, 1987; HAHN & HENNECKE, 1988). Os genes bacterianos responsáveis pela fixação simbiótica de N_2 podem ser divididos em genes *nif*, *fix* e

nif.

Os genes *nif* têm sido definidos com base na analogia com genes *nif* de Klebsiella pneumoniae, uma enterobactéria fixadora de nitrogênio (KENNEDY, 1977; MACNEIL et alii, 1978, PUHLER et alii, 1979; RIEDEL et alii, 1979). Sete genes *nif* (K, D, H, A, B, E e Q), foram detectados em Rhizobium através de homologia com K.pneumoniae (ROBERTS et alii, 1978; HILL & KAVANAGH, 1980). Os três primeiros genes citados codificam os componentes estruturais da enzima nitrogenase e são comuns a todos os microrganismos que possuem relação simbiótica com plantas; os genes *nif* B e E devem estar envolvidos na síntese do cofator ferro-molibdênio da nitrogenase, o *nif* Q media a absorção de molibdênio e o *nif* A codifica uma proteína regulatória considerada ativadora transcricional da expressão de todos os outros operons *nif* (ROBERTS et alii, 1978).

Os genes *fix* são, também, necessários para a fixação de N_2 mas não apresentam homologia com os genes de K.pneumoniae. Assim, o papel dos produtos dos genes *fix* não tem sido determinado claramente, especulando-se que eles possam estar envolvidos no desenvolvimento e/ou manutenção da função do bacteróide, fundamental no processo da fixação

(ROLFE et alii, 1981). As células dos rizóbios, quando em associação simbiótica, sofrem diferenciações morfológicas e bioquímicas, sendo denominadas bacteróides. Os bacteróides apresentam-se morfológicamente arredondados, ramificando-se, eventualmente, em estruturas pleiomórficas e são especializados em fixação de N_2 (MACKENZIE et alii, 1973; PAAU et alii, 1980). Depois da liberação da bactéria no estágio do *cordão de infecção* para dentro da célula hospedeira, os simbiossiontes trocam metabólitos numa interação bastante rígida. Na ausência dos genes *nif* e *fix*, o Rhizobium é capaz de ativar a formação de nódulos morfológicos mas não fisiologicamente normais na planta hospedeira. Assim, a expressão dos genes para produção de nodulina, proteína envolvida na formação do nódulo (LANG-UNNASCH & AUSUBEL, 1985) parece não ser influenciada pelos produtos funcionais dos genes *nif* e *fix* apesar de mutações em *nif* causarem, eventualmente algumas anormalidades no desenvolvimento do bacteroide (HIRSCH et alii, 1983). Sugere-se que o papel dos genes *nif* e *fix* seja restrito aos estágios posteriores do desenvolvimento do nódulo.

Os genes envolvidos nos estágios iniciais do desenvolvimento do nódulo, denominados *nod*, foram localizados em um segmento restrito de DNA (DOWNIE et alii, 1983). Nos últimos anos, estudos de complementação e análises de sequências de genes da região de nodulação resultaram em uma visão

geral da organização dos genes da nodulação em R. leguminosarum, R. trifolii e R. meliloti. Essas três espécies apresentam uma região de genes comuns de nodulação, *nod* A, B, C e D, ativos em uma ampla gama de hospedeiros, flanqueada por uma outra região contendo os genes *nod* E, F, G, H e M de especificidade hospedeira (KONDOROSI et alii, 1984a). Esses mesmos autores demonstraram, também, que os genes envolvidos nas funções iniciais da nodulação em R. meliloti, bem como os genes estruturais *nif* e *fix* adjacentes localizaram-se em uma região do DNA de cerca de 40 kb (quilobases). Hibridização de fragmentos *nod* de R. meliloti contra DNA total de diferentes espécies de Rhizobium revelou regiões de alta homologia (KONDOROSI et alii, 1984 a). Hibridização de um fragmento de 2 kb dentro da região *nod* possibilitou uma indicação adicional da homologia interespecífica dos genes *nod* comuns. PRAKASH & ATHERLY (1984) sugeriram que ambas as sequências gênicas *nif* e *nod* devam estar presentes em mais de uma cópia em espécies de Rhizobium de crescimento rápido, uma vez, que os padrões de hibridização foram idênticos nessas espécies. A função das cópias extras dos referidos genes não é totalmente conhecida, mas estudos realizados em Rhodopseudomonas capsulata mostraram que a sequência *nif* extra pode ser, também, ativada (SCOLNIK & HASELKORN, 1984). Análises da expressão dos genes da nodulação, através de fusão de sequências promotoras com a sequência da enzima β -galactosidase, revelaram que o gene *nod* D é constitutivamente expresso na maioria das espécies de

Rhizobium. Na presença de exudatos de raiz, o gene *nod* D controla a expressão do operon *nod* ABC (INNES et alii, 1985; MULLIGAN & LONG, 1985). As moléculas presentes nos exudatos de raiz da planta as quais ativam a expressão do gene *nod*, foram identificadas como flavonóides, hidroxiflavonas, sendo que cada espécie de Rhizobium é ativada mais eficientemente por uma flavona específica (INNES et alii, 1985).

Em muitas espécies de Rhizobium, os genes envolvidos na nodulação (*nod*) e fixação de nitrogênio (*fix*), bem como os genes estruturais da nitrogenase (*nif*) estão localizados em grandes plasmídios ("*sym*") de 90 a 300 MDaltons (NUTTI et alii, 1977; CASSE et alii, 1979; GROSS et alii, 1979; BREWIN et alii, 1980a; HIRSCH et alii, 1980; BANFALVI et alii, 1981; PRAKASH et alii, 1981; ROSEMBERG et alii, 1981; KONDOROSI et alii, 1982; SCOTT & RONSON, 1982; ZURKOWSKI, 1982; KONDOROSI et alii, 1984b; PRAKASH & ATHERLY, 1986). Em Rhizobium, portanto, mais de 20% do total da informação genética é codificada em plasmídios, sendo que o envolvimento desses plasmídios na simbiose é substantiado por várias evidências bioquímicas e genéticas, tais como (a) isolamento de mutantes simbioticamente defectivos concomitante com perdas ou mudanças fisicamente detectáveis representadas por deleções em plasmídios originais e isolamento de estirpes *nod* - originadas de estirpes *nod*⁺; (b) demonstrada instabili-

dade de propriedades simbióticas em Rhizobium, especialmente quando do uso de acridinas, agentes de cura plasmídica; (c) transferência, sob condições especiais, do fenótipo simbiótico com frequências maiores que aquelas encontradas para marcas cromossômicas; (d) tanto em Rhizobium, como em Agrobacterium, mais de um plasmídio está usualmente presente na célula e (e) genes plasmídicos são transcritos ativamente nos nódulos - hibridização de RNA de bacteróides endossimbióticos com mistura de plasmídios de R. leguminosarum, permitiu transcrição de fragmentos específicos nos mesmos (BANFALVI et alii, 1981; NUTI, 1981; ROSEMBERG et alii, 1981; KONDOROSI et alii, 1984a).

Uma vez que a aquisição dos genes para fixação de nitrogênio permite ao organismo novos nichos, incluindo interação simbiótica, sugere-se que a presença de plasmídios relacionados com a fixação de nitrogênio deva ser resultado de disseminação por plasmídios conjugativos entre espécies de bactérias (MASTERSON et alii, 1982). Nesse particular, SCHOFIELD et alii, 1987), trabalhando com uma população de R. leguminosarum biovar trifolii isolada do solo, verificaram que diferentes plasmídios *sym* puderam ser encontrados em idênticos hospedeiros bacterianos e vice-versa. Tais resultados corroboram a existência de trocas e/ou recombinação genética entre plasmídios *sym* em populações de bactérias

do solo. Transferência por conjugação de plasmídios *sym* (JOHNSTON et alii, 1978; HIRSCH et alii, 1980) bem como obtenção de tais plasmídios recombinantes (BREWIN et alii, 1982; CHRISTENSEN & SCHUBERT, 1983; DJORDJEVIC et alii, 1983) têm sido demonstrada sob condições de laboratório em Rhizobium. KROL et alii (1982) verificaram que estirpes de Rhizobium meliloti continham apenas um plasmídio carregando genes *nif* e que hibridização com RNA isolado de bacteróides mostrou que o plasmídio *sym* foi fortemente expresso no estágio endossimbiótico. Por outro lado, MASTERSON et alii (1985), através de hibridização tipo *Southern* (SOUTHERN, 1975) em Rhizobium japonicum, verificaram que, ao contrário da maioria dos casos, uma estirpe apresentou localização de genes *nif* em um plasmídio de 112 MDaltons e os genes *nod* em um plasmídio de 195 MDaltons.

Células de Rhizobium podem conter mais de um plasmídio, sugerindo que os plasmídios maiores possam ser multímeros dos menores e, então devem apresentar sequências homólogas. Tal fato significaria poliploidia para certos genes simbióticos na bactéria. Ao contrário, os plasmídios poderiam ser diferentes, codificando informações complementares necessárias para o estabelecimento de um completo sistema fixador de nitrogênio. Os plasmídios possuem um papel fundamental na simbiose Rhizobium-leguminosa. Estirpes de Rhizobium

curadas de um plasmídio ou portadoras de deleção no mesmo perderam a capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio. Um plasmídio pode, além de conter genes determinantes da especificidade hospedeira (JOHNSTON et alii, 1978) contribuir em alguns casos, com aproximadamente 50% da capacidade competitiva (BREWIN et alii, 1983). Por outro lado PANKHURST et alii (1986), estudando nodulação em Lotus pedunculatus, mostraram, pela primeira vez, aumento na competitividade e capacidade de fixação de N_2 através da eliminação de um plasmídio original do Rhizobium associado à referida leguminosa. O incremento na eficiência simbiótica foi devido a um aumento no número de nódulos e não na atividade da nitrogenase.

Além dos plasmídios *sym*, pouco se conhece sobre outras funções do DNA extracromossômico em Rhizobium. Tolerâncias à acidez e alumínio são características estáveis em algumas estirpes de Rhizobium (MUNNS & KEYSER, 1981) e, apesar de pouca informação sobre a genética da resistência à metais pesados em Rhizobium (VALARINI, 1981; YELTON et alii, 1983), tais características têm sido consideradas plasmidiais em outras espécies de bactérias. Produção de bacteriocina, capacidade de conjugação e mobilização de DNA são, também,, associadas a grandes plasmídios (HIRSCH, 1979; BREWIN et alii, 1980b; HOMBRECKER et alii, 1981). Apesar de aparentemente não apresentarem funções simbióticas, tais plasmídios

podem apresentar efeitos indiretos no processo de fixação de nitrogênio (HIRSCH, 1979). Nesse particular, THURMAN et alii (1985) encontraram uma correlação aparente entre número de plasmídios e taxa de crescimento em R. trifolii. Sugeriram-se que plasmídios adicionais podem conferir vantagem competitiva a estas espécies na rizosfera. Apesar dos genes *nif*, *nod* e *fix* localizarem-se em plasmídios, outros genes envolvidos em diferentes estágios da simbiose, tais como biossíntese do núcleo Heme e transporte do C₄-dicarboxilato, estavam localizados no cromossomo (LEONG et alii, 1982; RONSON et alii, 1984).

Sugerem-se que os plasmídios *sym* tenham se originado da recombinação entre plasmídios bacteriocinogênicos (B). Com a formação de plasmídios recombinantes para nodulação e fixação de nitrogênio tem sido possível transferirem-se, os determinantes para tais características bem como para absorção de hidrogênio (Hup⁺), como unidade única (BREWIN et alii, 1982). Nesse aspecto, o isolamento e relativa estabilidade de plasmídios cointegrados compostos de plasmídios específicos e de amplitude hospedeira, capazes de alta frequência de transferência, poderiam ser úteis em diferentes manipulações genéticas (KISS & KALMAN, 1982; SCOTT & RONSON, 1982).

Ao contrário do gênero Rhizobium, espécies de Bradyrhizobium não apresentam plasmídios simbióticos detectáveis através dos métodos até então utilizados e os genes envolvidos na interação simbiótica com plantas devem estar localizados no cromossomo. (EBELING et alii, 1987; NIEUWKOOP et alii, 1987; HAHN & HENNECKE, 1988). Tal diferença na localização dos genes simbióticos em Rhizobiaceae poderia refletir divergência evolutiva intergenérica (PANKHURST et alii, 1986). Dentro do gênero Bradyrhizobium, informação mais detalhada sobre a organização dos genes simbióticos tem sido verificada somente para B.japonicum (HENNECKE et alii, 1985). Dois grupos gênicos têm sido encontrados nesta espécie: grupo I, contendo, pelo menos, 9 genes envolvidos na fixação de nitrogênio (*nif* D, *nif* K, *nif* E, *nif* N, *nif* S, *nif* B, *nif* H, *fix* B e *fix* C) (FUHRMANN et alii, 1985; EBELING et alii, 1987); grupo II, contendo os genes comuns da nodulação (*nod* A, *nod* B, *nod* C, *nod* D, *nod* I e *nod* J) e os genes *nif* A e *fix* A (LAMB & HENNECKE, 1986; NIEUWKOOP et alii, 1987). HAHN & KENNECKE (1987a e b) verificaram, ainda, que o genoma de B.japonicum apresentou um segmento de DNA não usual, maior que 230 quilobases (kb), caracterizado pela presença de sequências repetidas (RS) e genes para fixação de N₂. Análises de tais sequências mostrou similaridade, em estrutura, à uma sequência de inserção (KALUZA et alii, 1985) mas sem características de elementos transponíveis (HAHN & HENNECKE, 1987a).

Sequências de DNA repetitivo associadas a genes da fixação de nitrogênio têm sido reconhecidas em diferentes espécies de Rhizobium, sendo que podem ocorrer mais de uma vez na mesma porção promotora dos genes *nif* e *fix* (QUINTO et alii, 1982; KALUZA et alii, 1985; WATSON & SCHOFIELD, 1985; HAHN & HENNECKE, 1987b). Em Rhizobium fredii, uma espécie de crescimento rápido associada à soja (Glycine max), o fato dos genes *nif* localizarem-se no cromossomo e/ou no plasmídio permitiu, no entanto, sugerir-se que tais genes poderiam estar localizados em um elemento transponível, possibilitando sua ocorrência em diferentes locais do genoma (BARBOUR et alii, 1985).

Estudos de complementação e hibridização mostraram que, além da conservação de funções, também a organização do operon *nod* ABC foi a mesma em Rhizobium e Bradyrhizobium (MARVEL et alii, 1985; MASTERSON et alii, 1985). Nesse particular, conservação similar de sequências *nif* e *nod* foi observada entre DNA plasmidial de diversas espécies de crescimento rápido (JARVIS et alii, 1983; PRAKASH et alii, 1981), sugerindo que essas sequências devam ser essenciais para fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico. Pouco se sabe sobre os genes que determinam especificidade hospedeira em Bradyrhizobium. Recentemente, foi identificado um "locus" próximo aos genes *nod* comuns os quais foram, provavelmente,

requeridos especificamente para nodulação em siratro (Macrop-tilium atropurpureum) (NIEUWKOOP et alii, 1987). Em Bradyrhi-zobium sp, bem como em B. japonicum, as regiões contidas entre *nod* A e *nod* D são conservadas, sugerindo que devam estar en-volvidas na regulação transcricional; os genes *nod* de Rhizo-bium e Bradyrhizobium devem ser regulados de maneira simi-lar. Espécies de Bradyrhizobium podem utilizar a mesma se-quência de gene *nod* para iniciar desenvolvimento de nódulos morfológicamente diferentes em leguminosas e não-leguminosas.

Muitas espécies de Bradyrhizobium podem apre-sentar plasmídios de alto peso molecular, porém, hibridização dos mesmos não mostrou presença detectável de genes envolvi-dos na fixação de nitrogênio (MASTERSON et alii, 1982). Se espécies de Bradyrhizobium apresentam as regiões *nif* e *nod* localizadas no DNA cromossômico, especula-se que o DNA plas-mídico das mesmas possa permitir excisão e integração ao cro-mossomo hospedeiro (MASTERSON et alii, 1985).

Há evidências que ambas as características, sym-plasmídicas e cromossômicas influenciam a efetividade simbiótica (SCHOFIELD et alii, 1987), sugerindo que obtenção ou isolamento de recobinantes possa ser útil no desenvolvi-mento de estirpes inoculantes superiores (De JONG et alii,

1982). Caracterização molecular, através de análise de hibridização de DNA, do plasmídeo *sym* e do cromossomo em Rhizobiaceae poderia facilitar o estudo da perda temporal de inoculantes no solo, um importante problema agrônômico (SCHOFIELD et alii, 1987).

2.2. EXPRESSÃO DOS GENES SIMBIÓTICOS

Alguns membros da família Rhizobiaceae são relacionados entre si, razão pela qual as biovariedades trifolii, viciae e phaseoli foram recentemente classificados como membros da espécie Rhizobium leguminosarum (JORDAN, 1984). As bactérias de crescimento lento e de pouca especificidade hospedeira foram classificadas como espécies do Gênero Bradyrhizobium.

Transferência de plasmídios *sym* em Rhizobiaceae tem resultado em expressão variável. Quando tais megaplasmídios foram transferidos entre bactérias, pertencentes ou não ao Gênero Rhizobium, os transconjugantes obtidos formaram nódulos pequenos e ineficientes no hospedeiro original (KONDOROSI et alii, 1982; KONDOROSI et alii, 1984a). Tal fa-

to, também, mostrou uma vez mais que os genes responsáveis pelos estágios iniciais da nodulação e especificidade hospedeira estão contidos nestes plasmídios (BANFALVI et alii, 1981; ROSEMBERG et alii, 1981). HOOYKAS et alii (1981) observaram que os plasmídios *sym* de R.leguminosarum e R.trifolii expressaram propriedades fixadoras de nitrogênio completas quando transferidos entre essas duas espécies. Por outro lado, quando esses mesmos plasmídios foram transferidos para R.meliloti, induziram a formação de nódulos inativos para fixação de nitrogênio. FISHER et alii (1985) verificaram que os genes responsáveis pela nodulação em R.meliloti foram funcionalmente substituídos por um segmento de DNA da região *nod* de R.trifolii e que R.meliloti igualmente complementou dois mutantes *nod* da referida espécie. Sugeriram, então, que esses genes devem representar funções comuns de nodulação, havendo, provavelmente, uma relação alélica entre genes *nod* em R.meliloti e R.trifolii (LONG et alii, 1986). É possível que essa série de genes para nodulação em diferentes espécies de Rhizobium, sejam sobrepostos mas, não completamente idênticos. Expressão dos genes *nod* DABC nas referidas espécies pode ser induzida por um composto flavonóide, luteolina, (PETERS et alii, 1986) presente em exudatos de raiz da planta hospedeira (INNES et alii, 1985; MULLIGAN & LONG, 1985; BRUSSEL et alii, 1986) e dependente da expressão de gene *nod* D (MULLIGAN & LONG, 1985).

Plasmídios determinantes da especificidade hospedeira foram, também, transferidos com sucesso de R. vi-
ceae para R. trifolii e R. phaseoli (JOHNSTON et alii, 1978). Nesse particular, JOHNSTON & BERINGER (1977), previamente, mostraram que cromossomos dessas espécies, agora biovariedades, foram aparentemente idênticos. DJORDJEVIC et alii (1983) observaram que transferência dos plasmídios pJB5JI e pBRIAN, os quais codificam especificidade para ervilha e trevo, respectivamente, para várias estirpes sem plasmídios de R. meliloti resultou em incapacidade para nodulação em ambas as espécies de leguminosas citadas. Por outro lado, KONDOROSI et alii (1984a) verificaram que hibridização de um fragmento *nod* de R. meliloti com DNA total de outras diferentes espécies de Rhizobium revelou regiões de alta homologia. Em uma espécie de Rhizobium tropical, provavelmente Bradyrhizobium, esse mesmo fragmento mostrou homologia com uma região de DNA localizada à cerca de 30 kb dos genes estruturais *nif* no plasmídio *sym*. Hibridização com um fragmento de 2 kb dentro da região *nod* possibilitou, ainda, uma indicação adicional da homologia interespecífica dos genes *nod* comuns. Quando os plasmídios pJB5JI e pBRIAN, acima referidos, foram introduzidos em uma estirpe de crescimento rápido de R. parasponium, os transconjugantes resultantes mostraram uma alteração no espectro de plantas noduladas (DJORDJEVIC et alii, 1983).

A transferência do plasmídio de amplitude hospedeira pJB5JI de R. leguminosarum para R. fredii reproduziu apenas os estágios iniciais de desenvolvimento do nódulo em ervilhas (RUIZ-SAINZ et alii, 1984). Os mesmos autores verificaram que conjugação entre R. phaseoli e R. leguminosarum possibilitou a ambas as espécies, comportarem-se como receptores e doadores de plasmídio de especificidade hospedeira, demonstrando que as mesmas foram capazes de receber e replicar tal plasmídio. Incompatibilidade e instabilidade do plasmídio *sym* podem ser atribuídas à expressão variável do mesmo em diferentes hospedeiros (DJORDJEVIC et alii, 1982; CHRISTENSEN & SCHUBERT, 1983). WANG et alii, (1986), confirmam observações prévias (BEYNON et alii, 1980; DJORDJEVIC et alii, 1982), as quais relatam que os genes responsáveis pela amplitude hospedeira em Rhizobium podem ser funcionalmente incompatíveis mesmo que os plasmídios que os contenham sejam aparentemente compatíveis durante o crescimento das células em meio da cultura. Tais resultados mostraram, também, que a planta hospedeira pode exercer alguma forma de incompatibilidade funcional quando interagindo com estirpes híbridas de Rhizobium e que alguns hospedeiros podem ser mais rigorosos que outros nessa pressão seletiva de transconjugantes.

Transferência de plasmídios *sym* para espécies de Bradyrhizobium possibilitou a obtenção de plantas de fenótipo simbioticamente ineficiente, reproduzindo algumas vezes apenas os estágios iniciais do desenvolvimento do nódulo (RUIZ-SAINZ et alii, 1984). NAUTIYAL et alii (1988) verificaram que nodulação da soja (Glycine max) por estirpes de Bradyrhizobium spp. foi menos eficiente que nodulação por estirpes de B. japonicum. Tal resultado sugere que espécies de Bradyrhizobium, apesar de relacionadas entre si, podem, ser diferentes na capacidade de nodulação em soja, pelo menos. Bradyrhizobium spp. apresenta maior versatilidade no reconhecimento do hospedeiro (AHMAD et alii, 1981). Por outro lado, regiões *nod* de Bradyrhizobium spp. e B. japonicum hibridizaram com sequências *nod* de R. phaseoli, R. leguminosarum, R. trifolii e R. meliloti (MARVEL et alii, 1985), mostrando que sequências do gene *nod* de Rhizobium podem ser funcional e organizacionalmente complementadas por segmentos de Bradyrhizobium.

Além de espécies de Rhizobium e Bradyrhizobium, o plasmídio *sym* foi transferido para bactérias do Gênero Agrobacterium. HODYKAS et alii (1981) transferiram o plasmídio *sym* de R. leguminosarum e R. trifolii para uma linhagem sem plasmídio tumorigênico (Ti) de A. tumefaciens e observaram que os transconjugantes foram capazes de formar nódulos em trevo

(Trifolium sp.). Através de microscopia eletrônica do nódulo, verificaram que a referida agrobactéria foi liberada do cordão de infecção para dentro da célula da planta mas, fixação de nitrogênio não foi detectada. Observações similares foram obtidas para outros plasmídios de Rhizobium quando transferidos para Agrobacterium (KONDOROSI et alii, 1982; DJORDJEVIC et alii, 1983; BROUGHTON et alii, 1984). Por outro lado, PRAKASH et alii (1981) mostraram que os plasmídios envolvidos na formação de tumor (Ti) em Agrobacterium continham sequências de DNA as quais foram também encontradas em plasmídios para especificidade hospedeira de R.viciae, R.phaseoli, R.trifolii e R.meliloti. De forma similar, PRAKASH & SCHILPERDORT (1982) verificaram a existência de significativa homologia entre plasmídios *sym* e plasmídio Ti, sugerindo, também, que os referidos plasmídios continham sequências derivadas de um plasmídio ancestral comum.

Através de experimentos de hibridização DNA-DNA, foi verificado que sequências dos genes estruturais codificadores da enzima nitrogenase foram conservadas não somente em bactérias fixadoras de nitrogênio mas, também, em algas cianofíceas (NUTI et alii, 1979; RUVKUN & AUSUBEL, 1980). Entretanto, outros genes requeridos para o processo da fixação de N_2 , tais como aqueles determinantes de proteínas especificamente envolvidos no transporte eletrônico do com-

plexo da nitrogenase, devem, provavelmente, ter-se adaptado ao requisito metabólico geral de um determinado organismo (DIXON et alii, 1981).

2.3. ESTRATÉGIAS E MÉTODOS GENÉTICOS PARA ANÁLISE FUNCIONAL DOS GENES DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO.

Identificação e caracterização funcional dos genes envolvidos na fixação simbiótica de nitrogênio têm sido obtidas por diferentes metodologias, incluindo transferência e cura plasmídiais, análises de mutantes, expressão em minicélulas, fusão de genes com o segmento *lac*, mapeamento por endonucleases de restrição e fusão de protoplastos. Alguns desses procedimentos, aplicam-se a análises genéticas plasmidiais bem como genômicas.

Mutagênese transposon-induzida vem se constituindo em útil metodologia para análise genética, em diferentes espécies, principalmente de Rhizobium (BERINGER et alii, 1978; BUCHANAN-WOLLASTON et alii, 1980; ROLFE et alii, 1980; RUVKUN & AUSUBEL, 1981; WALTON & MOSELEY, 1981; CEN et alii, 1982;

MEADE et alii, 1982; FORRAI et alii, 1983; JAGADISH & SZALAY, 1984; THOMAS et alii, 1986). Transposons ou elementos transponíveis, são segmentos específicos de DNA os quais podem mover-se de um local genético para outro, promovendo recombinação transposicional como um mecanismo alternativo de reestruturação cromossômica através de rearranjo, adição ou deleção da informação genética (GRINDLEY & REED, 1985). Inserção de um transposon pode resultar em mutação relativamente estável (inativação insercional) ou, mais frequentemente, em mutação fortemente polar devido ao impedimento da transcrição normal pelo sinal de terminação do transposon no operon distal (BERG et alii, 1980; ALI et alii, 1984; JAGADISH & SZALAY, 1984).

Uma variedade de veículos suicidas tem sido utilizada para introdução de transposons no genoma de *Rhizobiaceae*. O primeiro desses vetores, desenvolvido por BERINGER et alii (1978), foi denominado pJB4JI o qual consiste de um fator-R tipo P-1 promíscuo (pPH1JI), contendo uma cópia do transposon Tn5, canamicina-resistente, e do bacteriófago Mu. O referido fago previne a manutenção do vetor na célula recipiente devido, provavelmente, a um aumento na atividade de restrição do hospedeiro ao DNA exógeno e/ou à expressão de pelo menos uma função não determinada do fago Mu (BOUCHER et alii, 1977; BERINGER et alii, 1978). Na impossibilidade

de replicação, o transposon presente no plasmídio é translocado para sítios de integração no genoma do hospedeiro. Uma característica geral dos plasmídios P-1 é sua extensa amplitude hospedeira. Tais plasmídios são capazes de auto-transferência por conjugação para muitas bactérias gram-negativas (DATTA & HEDGE, 1972). Tal propriedade tem sido utilizada como base para duplicação e clonagem plasmidial em E.coli, permitindo-se extensa aplicabilidade.

Sistemas de vetor-hospedeiro utilizando-se de E.coli e seus plasmídios vetores, apesar das limitações metabólicas da referida bactéria, têm desenvolvido importante papel na clonagem, amplificação e análise de fragmentos de DNA de uma ampla variedade de organismos (COHEN, 1975; TIMMIS, 1981). Em Rhizobium, THOMAS et alii (1986) verificaram que transferências de inserções Tn5 de E.coli para R.fredii, através do plasmídio gene-mobilizante pJB3JI possibilitou uma frequência de recombinantes 400 vezes maior que a taxa de mutação espontânea. Conjugação entre Bradyrhizobium japonicum e E.coli WA 803 para introdução do vetor pGS9 na primeira espécie, resultou em frequência de transconjugantes da ordem de 10^{-6} a 10^{-7} (ROSTAS et alii, 1984). Nesse particular, SELVARAJ et alii (1987) isolaram vários mutantes simbioticamente defectivos em R.meliloti, utilizando-se de mutagênese Tn5-induzida através do mesmo vetor suicida pGS9. Tais mutantes

apresentaram-se heterogêneos quanto a atividade de redução de acetileno, morfologia e ultra-estrutura dos nódulos.

Inserções do Tn5 em genes envolvidos com a simbiose podem ser prontamente identificadas em análises moleculares através de clonagem da região contendo determinantes para resistência a antibiótico codificada no transposon (SELVARAG et alii, 1987). Em E. coli, a distribuição dos sítios de inserção do Tn5 não é totalmente ao acaso (SHAW & BERG, 1979). Em Rhizobium, apesar da aparente inespecificidade de integração (BERINGER et alii, 1978), foi verificado, mais recentemente, que o alvo preferencial do referido transposon foi um segmento Eco RI de 5,0 kb, contendo os genes da fixação da região gênica *nif*⁺ HDK em megaplasmídio (WHEATCROFT & WATSON et alii, 1987). Os mesmos autores verificaram que as inserções foram, também, encontradas em segmentos vizinhos no megaplasmídio, distante 30 kb da região dos genes *nif*⁺. ALI et alii (1984), trabalhando com isolamento de mutantes auxotróficos Tn5-induzidos em R. meliloti, verificaram que, apesar da inserção do transposon ter ocorrido em diversos sítios do replicon do Rhizobium, alguns "loci" mostraram-se alvos mais frequentes. O referido procedimento biológico de mutagênese

tem sido empregado na obtenção de mutantes de categorias diversas. Assim, VESPER et alii (1987), trabalhando com B. japonicum isolaram mutantes alterados na estrutura do *pili* celular, verificando que tal alteração estava correlacionada com a capacidade de ligação da bactéria à raiz. De outro lado, HQM et alii (1988) isolaram mutantes da referida espécie de bactéria incapazes de crescer quimioautotroficamente com CO₂ e H₂, sendo que alguns deles não apresentaram atividade de absorção de hidrogênio (Hup⁻) - algumas espécies de Rhizobium e Bradyrhizobium sintetizam a enzima hidrogenase (Hup⁺), ligada à membrana, a qual pode reciclar as moléculas de H₂ produzidas pela nitrogenase para síntese de ATP (EMERICH et alii, 1979).

Recentemente foi desenvolvido um novo sistema de mobilização de amplitude hospedeira, visando mutagênese transposon-induzida (SELVARAJ & IYER, 1983; YAKOBSON & GUINEY, 1984). Foi, então, construída uma família de plasmídios vetores contendo o sítio de reconhecimento tipo-P (sítio *mob*) o qual pode ser mobilizado com alta frequência em linhagens portadoras contendo os genes de transferência (*ori T*) do plasmídio RP4 integrado no cromossomo. Tais vetores de mobilização foram derivados dos plasmídios pACYC184, pACYC177 e pBR325 os quais são capazes de duplicação em E. coli mas não em Rhizobiaceae. Os vetores preparados incluem, principalmen-

te os transposons Tn5 (Nm, Cm; pSUP1011) e Tn7 (Sp/Sm; pSUP2017) e os genes Tcr integrados em uma área não funcional do Tn5 (pSUP10141). Em um sistema similar, desenvolvido por YAKOBSON & GUINEY (1984), a região *ori* T do plasmídio RK2 foi clonada dentro do Tn5 integrado em um derivativo do pBR322. O plasmídio ~~suicida~~ resultante, pEYDG1 pode ser transferido para diferentes espécies de bactérias gram-negativas na presença do plasmídio auxiliador (~~helper~~) pRK2013, cuja função nos sistemas é, unicamente, transcomplementar o vetor de mobilização. De maneira similar, construiu-se o pRK290 (DITTA et alii, 1980) o qual não é auto-transmissível, mas mobilizável em alta frequência através do plasmídio auxiliador Cm^r, pRK2013 (FIGURSKI & HELINSKI, 1979). DITTA et alii (1980) observaram, também, que o pRK290 foi praticamente estável em R.meliloti com apenas 0,2% de perda por geração. A intensidade, com que um plasmídio auxiliador pode co-transferir com outros plasmídios durante um experimento de mobilização depende da célula receptora. Em R.meliloti pelo menos, o plasmídio auxiliador pRK2013 não se manteve estável e os transconjugantes continham apenas o pRK290 (DITTA et alii, 1980). A utilização de sistemas plasmídicos binários facilitam significativamente análises genéticas de DNAs clonados em organismos nos quais sistemas de transformação não podem ser facilmente estabelecidos tais como, bactérias dos gênero Rhizobium e Bradyrhizobium. Um segundo grupo de vetores de clonagem de ampla gama de hospedeiros tem sido desenvolvido atra-

vés de remoção das funções de replicação e mobilização do pKT210 e inserção nos pACYC184, pBR325 ou pACYC177, resultando nos plasmídios pSUP104, pSUP204 e pSUP304, respectivamente.

Os vetores até então referidos podem ser utilizados para mutagênese ao acaso, bem como, para mutagênese sítio-específica e o gene transposon-mutado pode ser inserido no genoma por recombinação homóloga. HAHN & HENNECKE (1984) utilizaram-se desta metodologia para desenvolver mutantes sítio-específicos em B.japonicum.

Fusões do gene *lac* vêm se constituindo em outra importante metodologia no estudo de uma ampla gama de funções genéticas a níveis transcricionais bem como transduccionais em bactérias. Fusões *lac* são especialmente úteis em análises de função e regulação gênicas onde o produto gênico é de difícil experimentação ou quando o gene em questão é ativado ou desativado sob condições indefinidas. Técnicas de fusão de genes com a região *lac*, especialmente a *lacZ*, têm sido bem desenvolvidas e um grande número de vetores de clonagem construídos, facilitando análises genéticas (CASADABAN et alii, 1980; SUNDARESAN et alii, 1983; KAHN & TIMBLIN, 1984). Essa técnica vem sendo aplicada, principalmente, para análise de regulação

da atividade do gene *nif* em Rhizobium (SUNDARESAN et alii, 1983; DITTA et alii, 1987). Nesse contexto YELTON et alii (1987), utilizando-se de fusão do gene *lacZ* e *nodC* em R. meliloti, verificaram que a expressão do *nodC* foi dependente de um sinal químico (luteolina) da planta hospedeira e da expressão do gene *nodD*. Sugeriram, também, que além dos genes bacterianos *nodDABC*, outros compostos, tais como RNA polimerases, seriam necessários para resposta do gene *nod* a células da planta. DITTA et alii (1987), através de fusão de genes plasmídicos, observaram que a expressão do gene *nif* A foi induzida em R. meliloti quando a concentração externa do oxigênio foi reduzida a níveis microaerofílicos, sugerindo que a redução da tensão de oxigênio seja, potencialmente, o principal estímulo para fixação de N_2 em espécies de Rhizobium (ADAMS & CHELM, 1988).

Plasmídios codificadores de funções simbióticas em algumas estirpes de R. leguminosarum, R. trifolii e R. phaseoli foram auto-transmissíveis (BEYNON et alii, 1980; SCOTT & RONSON, 1982). Quanto a plasmídios não auto-transmissíveis, diversos métodos têm sido viabilizados para transferência a novos hospedeiros, incluindo plasmídios auxiliadores e inserção de região *nod* em plasmídios *sym* (KONDOROSI et alii, 1982).

Plasmídios do grupo P-1 podem, ocasionalmente, formar cointegrados com plasmídios originais de Rhizobium se ocorrer a existência de sítios de homologia plasmídio-plasmídio. Tais plasmídios, aparentemente, podem ser mantidos como unidades integradas apenas se baixa atividade do gene *rac*. A estiver presente. Em E.coli *rac* A⁺ os plasmídios *sym* sofreram deleções ao acaso, possibilitando a formação de uma série de deleções abrangendo todo o plasmídio (PRAKASH & ATHERLY, 1986).

Informações úteis de funções plasmídicas podem também, ser obtidas de linhagens "curadas" de plasmídios através de perda de características fenotípicas e reintrodução de fragmentos de plasmídios responsáveis por funções específicas. Agentes de cura plasmídica em espécies de Rhizobium promoveram eliminação ou deleção em plasmídios codificadores de funções de nodulação (genes *nod*) e fixação de nitrogênio (genes *nif*) (BANFALVI et alii, 1981).

Manipulação de microrganismos por melhoramento e introdução de material genético de diversas fontes vem sendo considerada no desenvolvimento da Biotecnologia microbiana. O uso de fusão de protoplastos como uma ferramenta para

manipulação genética assexual vem se constituindo em importante alternativa para transferência de fatores genéticos entre espécies ou linhagens distintas onde métodos naturais de transferência gênica não tem sido possível (PEBERDY, 1980; ZIMMERMANN & VIENKEN, 1982; VIDOLI et alii, 1982). Durante a conjugação, transformação e transdução em bactérias, apenas o material genético é envolvido; a transferência é unidirecional e apenas fragmentos de DNA são introduzidos na célula recipiente. Em fusão de protoplastos, ambos, o citoplasma e os cromossomos inteiros das duas células são reunidos em uma mesma estrutura. Devido à complexidade da parede celular em bactérias gram-negativas, a formação e regeneração de protoplastos têm sido reportadas apenas em poucos gêneros tais como Escherichia, Providentia e Pseudomonas (WEISS, 1976; COETZEE et alii, 1979). Assim, poucos trabalhos referem-se à protoplastização no gênero Rhizobium. BERRY & ATHERLY (1984) obtiveram esferoplastos em B. japonicum por meio do cultivo de células em glicina seguido de tratamento com lisozima. SINDHU & DADARWAL (1985) desenvolveram métodos para formação e regeneração de protoplastos em Rhizobium e Azospirillum nos quais variaram a solução protoplastizante.

A fusão de células é considerada de grande potencial em análises genéticas. Além disso, ambas, hibridização somática e engenharia genética, vêm oferecendo uma alter-

nativa para modificação de células visando o melhoramento. Apesar de muitos resultados promissores, a técnica de fusão de protoplastos é ainda considerada artesanal.

3.- MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho experimental aqui relatado, foi desenvolvido parcialmente, no laboratório de Genética de Microorganismos do Departamento de Genética da ESALQ/USP, Campus Piracicaba e parcialmente no laboratório de Patologia de Plantas da Faculdade de Agricultura da Universidade de Shizuoka, Shizuoka-Shi, Japão, sob a orientação do Prof. Dr. Shinji Tsuyumu. Foram realizadas no Depto. de Genética da ESALQ, as técnicas referentes à obtenção de dados sobre marcação genética das estirpes, através de indução de mutantes auxotróficos por U.V. e por introdução do transposon Tn5 via conjugação entre Rhizobium e E. coli, obtenção e tentativa de fusão de protoplastos em Rhizobium, bem como, eletroforeses em gel de agarose. No laboratório de Patologia de Plantas do Japão, foram realizadas as metodologias concernentes à detecção de plasmídios em gel de agarose, extração de DNA total de Bradyrhizobium e estabelecimento de banco genômico de Bradyrhizobium em E. coli através de transformação bacteriana, principalmente.

3.1. LINHAGENS DE BACTÉRIAS UTILIZADAS

As linhagens das diferentes espécies de bactérias utilizadas, suas características relevantes ao presente trabalho, bem como a fonte de obtenção ou referência encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Espécies e linhagens de bactérias utilizadas, características relevantes e fonte de obtenção ou referência das mesmas.

Linhagem	Características Relevantes	Fonte ou Referência
<u>Bradyrhizobium</u> spp	<i>Nod⁺Fix⁺</i> em <u>Neonotonia wightii</u> cv. Tinaroo, alto nível de resistência intrínseca à Ap, An, Sm, Cc e Tc; prototrófico; crescimento lento e baixa especificidade hospedeira.	Este trabalho
<u>Rhizobium leguminosarum</u> biovar <u>phaseoli</u> C05	<i>Nod⁺ Fix⁺</i> em <u>Phaseolus vulgaris</u> ; Cm ^S ; An ^S ; Ap ^S ; prototrófico, crescimento rápido e especificidade hospedeira	Centro de Energia Nuclear na Agricultura ESALQ/USP, Piracicaba/SP.
<u>Escherichia coli</u> JI1830	portadora do plasmídeo pJB4JI, vetor suicida para o transposon Tn5, Sc ^r , Gm ^r , Cm ^r .	BERINGER et alii (1978), obtida no Laboratório de Genética de Bactérias, UNESP - Campus Jaboticabal
<u>E.coli</u> HB101(1) pUC 119	LacZ Ap ^r	VIEIRA & MESSING, 1987
pRK2013	Plasmídeo auxiliador Cm ^r (Replicon ColE1 mais genes de transferência RK2); Cl ^S ; Ap ^S ; Tc ^S ; Sc ^S	FIGURSKI & HELINSKI (1979)
<u>E.coli</u> S17	plasmídeo pSUP5011 vetor do transposon Tn5 mob ⁺ Cm ^r ; Nm ^r ; Cl ^r ; Ap ^r ; Sm ^r ; Tc ^r .	SIMON et alii (1983)

s= sensível

r= resistente

Ap= Ampicilina

An= Ácido nalidixico

Sm= Estreptomicina

Cc= Carbenicilina

Tc= Tetraciclina

Sc= Espectinomicina

Cl= Cloranfenicol

Cm= Canamicina

Nm= Neomicina

(1) Apresenta o genótipo F⁻, hsdS20 (R⁻B, M⁻p), recA13, ara-14, pro A₂, lacY1; galK2, rpsL20 (Sm^r), Xyl-5, mtl-1, sup E44, λ⁻. Essa linhagem, um híbrido entre E.coli K-12 e E.coli B, é comumente utilizada como recipiente em transformação, constituindo-se em útil hospedeiro para crescimento e purificação de plasmídeo em larga escala (BOLIVAR & BACKMAN, 1979).

3.2. ESPÉCIES DE PLANTAS UTILIZADAS

As espécies de leguminosas utilizadas foram Neonotonia wightii cv. Tinaroo (soja perene), uma leguminosa forrageira tropical; Phaseolus vulgaris (feijão preto, variedade Negro Argel) obtidas na seção de Agronomia de Plantas Formageiras do Instituto de Zootecnia, CPA/SA, Nova Odessa/SP e Seção de Microbiologia do Solo do Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA, ESALQ/USP, Piracicaba, SP, respectivamente.

3.3. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

3.3.1. Meio Completo-MC (VINCENT, 1970)

Manitol, 10,00g; extrato de levedura, 0,50g; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,65g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,80g; NaCl, 0,20g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 16,50mg; glutamato de sódio, 0,50g e agar, 16,00 g por litro de água destilada. O pH foi ajustado a 7,0 com NaOH ou HCl.

3.3.2. Meio Mínimo-MM (ALI et alii, 1984)

Glucose, 10,00g; K_2HPO_4 , 0,50g; NH_4NO_3 , 0,50g; $Mg\ SO_4.7H_2O$, 0,20g; tiamina, 0,50mg; biotina,, 10,00 mg e agar 15,00g por litro de água destilada. O pH foi ajustado a 7,2 com NaOH ou HCl

3.3.3. Meio TY (BERINGER, 1974)

Tryptona, 5,00g; extrato de levedura, 3,00g; $CaCl_2.6H_2O$, 1,30g por litro de água destilada.

3.3.4. Meio L.B

Tryptona, 10,00g; extrato de levedura, 5,00g; NaCl, 5,00 g por litro de água destilada. O PH foi ajustado a 6,8.

3.3.5. Meio L.A

Adicionados 15,00g de agar por litro de meio LB.

3.3.6. Meio YS-14 (VINCENT, 1970, modificado)

Manitol, 10,00g; sacarose, 140,00g (14%); K_2HPO_4 , 0,50g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,20g; NaCl, 0,10g; extrato de levedura, 0,40g e glicina, 300 mg (0,03%) por litro de água destilada. O pH foi ajustado a 6,9 com NaOH ou HCl.

3.4. SOLUÇÕES GERAIS UTILIZADAS

3.4.1. Solução Salina

NaCl, 0,89% dissolvido em água esterilizada em autoclave por 20 minutos a uma atmosfera.

3.4.2. Solução Hipoclorito de sódio

Hipoclorito de sódio, 8% (V/V) em água destilada esterilizada.

3.4.3. Tampão Fosfato

KH_2PO_4 , 0,28g; K_2HPO_4 , 1,24g por litro de água destilada. O pH foi ajustado para 7,2 com NaOH ou HCl.

3.4.4. Solução Nutritiva para Plantas (NORRIS & DATE, 1976)

KCl, 74,50 mg; K_2HPO_4 , 10,86 mg; $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 246,50 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 39 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 110,00 ug; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,02 mg; $(\text{NH}_4)_6\text{Mg}_7\text{O}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 ug; H_3BO_3 , 715,00 ug; citrato férrico 1,80 mg e $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 68,00 mg. por litro de água destilada.

3.4.5. Solução de metionina

Metionina, 0,3 mM por placa (20 ml), dissolvida em água e esterilizada por autoclavagem.

3.4.6. Solução de lisozima

Lisozima (Sigma) em solução aquosa sob diferentes concentrações (250 à 3.000 ug/ml) e esterilizada em membrana tipo milipore. (0,45 u0)

3.4.7. Solução de ácidos nucleicos

Solução A: ácido nucleico de leveduras, 2,0g; ácido clorídrico 1N, 15ml.

Solução B: ácido nucleico de leveduras, 2,0g; hidróxido de sódio 1N, 15,0ml.

As soluções foram aquecidas em banho-Maria por 20 minutos, misturadas e o pH ajustado a 6,0 com solução de hidróxido de sódio. A solução final foi, então, diluída a 40,0 ml com água destilada, esterilizada e conservada em frasco escuro no refrigerador.

3.4.8. Solução de aminoácidos

Caseína hidrolizada, 0,1g em 10,0ml de água destilada esterilizada. A solução foi preparada em frasco esterilizado, aquecida em banho-Maria por 20 minutos e, posteriormente, conservada em refrigerador.

3.4.9. Solução de vitaminas

Ácido nicótico, 100,0mg; ácido p-aminobenzóico, 10,0mg; biotina, 0,2mg; piridoxina, 50,0mg; riboflavina, 100,0mg e tiamina, 50,0mg. A solução foi colocada em banho-Maria por 20 minutos e, posteriormente, conservada em frasco escuro no refrigerador, sob clorofórmio.

3.5. SOLUÇÕES ESPECÍFICAS UTILIZADAS

3.5.1. Fusão de protoplastos

3.5.1.1. Solução SET : Tris HCl, 0,2M; EDTA, 0,5 mM;
sacarose, 0,5M; pH 8,0

3.5.1.2. Solução P1 : sacarose, 0,5M; CaCl₂, 100mM;
MgCl₂, 30mM; pH 7,4

3.5.1.3. Solução P2 : sacarose, 0,5M; CaCl₂, 30 mM;
MgCl₂, 30mM; pH 7,4

3.5.1.4. Solução hipertônica semi-sólida : sacarose,
0,5M; MgCl₂, 20mM; agar 1%; pH 7,4

3.5.2. Detecção de DNA plasmidico em Rhizobiaceae.

3.5.2.1. Solução fenol/clorofórmio: fenol
cristalizado liquefeito a 50°C e misturado ao clorofórmio na
proporção 1:1 (vol/vol).

3.5.2.2. Solução de lise: Dodecil Sulfato de Sódio(SDS), 3%; Tris HCl, 50mM. O pH foi ajustado a 12,6, adicionando-se 1,6 ml de NaOH 2N.

3.5.2.3. Tampão TAE: Tris-acetato, 4mM, pH 7,9; EDTA Na₂, 2 mM. O pH foi ajustado com ácido acético glacial. (Tampão de baixa concentração de sais para evitar superaquecimento e resolução de plasmídios de alto peso molecular).

3.5.2.4. Solução A: Azul de bromocresol, 0,25%; glicerol, 50%; Tris-Acetato, 0,05M, pH 7,9.

Todas as soluções acima referidas foram feitas com água bi-destilada e conservadas à temperatura ambiente.

3.5.3. Isolamento de DNA plasmídico em E.coli

3.5.3.1. Tampão SET: sacarose, 20%; Tris HCl, 50 mM, pH 7,6; EDTA, 50 mM.

3.5.3.2. Mistura lítica: SDS, 1%; NaOH, 0,2N (duração da mistura, no máximo, duas semanas).

3.5.3.3. Solução acetato de sódio: acetato de sódio, 3M; pH 4,8. O pH foi ajustado com ácido acético glacial.

3.5.3.4. Solução RNase: ribonuclease pancreática A, 10 mg/ml em acetato de sódio, 0,1M; EDTA-Na₂ 0,3 mM; pH 4,8. A solução foi pré-aquecida a 80°C por 10 minutos.

3.5.4. Extração do DNA total de Bradyrhizobium spp

3.5.4.1. Solução de lise: Dodecil Sulfato de Sódio(SDS), 3%; Tris HCl, 50mM. O pH foi ajustado a 12,6, adicionando-se 1,6 ml de NaOH2N.

3.5.4.2. Solução acetato de sódio: item 3.5.3.3.

3.5.4.3. Tampão TEN: Tris HCl, 10 mM; pH 7,6; EDTA, 1 mM; NaCl, 10 mM.

3.5.4.4. Solução de lisozima: lisozima (Sigma), 5 mg/ml em tampão TEN.

3.5.4.5. Solução RNase: item 3.5.3.4.

3.5.4.6. Solução Clorofórmio/Álcool isoamílico: mistura 24:1, respectivamente.

3.5.4.7. Solução Pronase: Pronase, 2 mg/ml em tampão TEN. A solução foi pré-aquecida a 37°C por 15 minutos.

3.5.4.8. SDS 25%: em água bidestilada.

3.5.4.9. Solução de NaCl: NaCl, 5M em água bidestilada.

3.5.3.10. Etanol 95%: estocado em congelador.

3.5.5. Eletroforese em Gel de Agarose

3.5.5.1. Tampão TAE: Tris-acetato, 4mM, pH 7,9; EDTA Na₂, 2 mM. O pH foi ajustado com ácido acético glacial. (Tampão de baixa concentração de sais para evitar superaquecimento e resolução de plasmídios de alto peso molecular).

3.5.5.2. Mistura paralisadora de reação: uréia, 5M; glicerol, 10%; SDS, 0,5%; xileno cianol, 0,025%; azul de bromofenol, 0,025%.

3.5.5.3. Gel de agarose: agarose, 0,7 a 1% dissolvida em tampão AE, dependendo se a resolução era para plasmídios grandes ou fragmentos de DNA.

3.5.5.4. Solução de brometo do etídio: brometo de etídio, 1 mg/ml em água bidestilada.

3.5.5.5. Tampão TAE: item 3.5.5.1.

3.5.6. Eletroeluição do DNA do Gel de Agarose.

3.5.6.1. Tampão TAE: item 3.5.5.1.

3.5.6.2. Solução EDTA: EDTA, 2 mM em água bi-destilada.

3.5.7. Digestão do DNA Plasmídico e Cromossômico

3.5.7.1. Tampão de reação da enzima Bam HI (Endonuclease de Restrição): TrisHCl, 10 mM; NaCl, 100 mM; MgCl₂, 5 mM; 2-mercaptoetanol, 1 mM; pH 8,0 (a 37°C).

3.5.7.2. Tampão de reação de enzima Sau 3AI (Endonuclease de Restrição): TrisHCl, 10 mM; NaCl, 100 mM; MgCl₂, 5 mM; 2 mercaptoetanol, 5mM; pH 8,5 (a 37°C).

3.5.7.3. Endonuclease Bam HI: Bam HI (Boehringer-Mannheim) diluída em tampão a 1 unidade/ml.

3.5.7.4. Endonuclease Sau 3AI: Sau 3AI (Boehringer-Mannheim) diluída em tampão a 1 unidade/ml.

3.5.7.5. Mistura paralisadora de reação: item 3.5.5.2.

3.5.7.6. Solução de DNA do fago λ digerido com a endonuclease de restrição Hind III.

3.5.8. Desfosforilação do DNA

3.5.8.1. Tampão de reação de desfosforilação: Tris HCl, 0,1 M; pH 8,0.

3.5.8.2. Enzima fosfatase alcalina: fosfatase alcalina bacteriana (BAP) em tampão 10X.

3.5.9. Ligação do DNA Cromossômico ao Plasmídio Vetor

3.5.9.1. Tampão de reação da DNA ligase T4 10X: Tris HCl, 0,2 M, pH 7,5; MgCl₂, 0,1 M; ditiotretitol, 0,1M.

3.5.9.2. DNA ligase T4: 1 unidade weiss/reação de ligação (Boehringer-Mannheim)

3.5.9.3. ATP 10X: ATP, 5 mM.

3.5.10. Transformação Bacteriana

3.5.10.1. Solução de CaCl_2 : CaCl_2 , 50 mM;
Tris HCl, 10 mM, pH 8,0.

3.5.10.2. Tampão TE: Tris HCl, 10 mM; EDTA 1
mM, pH 8,0.

3.6. ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS

A tabela 2 traz os antibióticos utilizados em meio de cultura, bem como seus modos de ação, mecanismos de resistência e fabricantes.

Tabela 2: Modo de ação, mecanismos de resistências e fabricantes dos antibióticos utilizados no trabalho.

Antibiótico	Modo de Ação	Mecanismo de Resistência	Fabricante
Ampicilina anidra (Ap)	Um Derivativo da Penicilina que interfere na reação terminal da síntese de parede celular	O gene da resistência (<i>bla</i>) especifica uma enzima periplasmática, B-lactamase, a qual cliva o anel B-lactâmico do antibiótico.	Sigma
Sulfato de Canamicina (Cm)	um agente bactericida que se liga ao ribossomo 70S e causa erro de leitura do RNA mensageiro	O gene de resistência (Kan) especifica uma enzima que modifica o antibiótico e previne sua interação com os ribossomos.	Bristol
Sulfato de Estreptomicina (Sm)	um agente bactericida que se liga à subunidade 30S do ribossomo e causa erro de leitura do RNA mensageiro	O gene de resistência (<i>str</i>) especifica uma enzima que modifica o antibiótico e inibe sua ligação ao ribossomo	INLAB

Os antibióticos, acima relacionados, foram dissolvidos em água destilada e esterilizados por filtração em membrana tipo Milipore (0,45 μ m). A ampicilina anidra teve sua solubilidade auxiliada pela adição de gotas de NaOH 0,1N. Além desses antibióticos, foram, utilizados, ainda, carbenicilina (100ug/ml); tetracilina (30ug/ml) e Ácido nalidixico (30 ug/ml) na forma de disco para antibiograma, produzido pela INLAB.

3.7. MUTAGÊNESE INDUZIDA POR ULTRA VIOLETA

Células de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli C05 foram cultivadas em TY a 28°C, sob agitação, até a fase logarítmica. A seguir, foram centrifugadas, lavadas, ressuspensas em tampão fosfato (pH 7,2) e submetidas a uma dose de irradiação Ultra-Violeta (U.V.) de 150 J/m² (Mineralight, 50-60 CVC, 60 amps.) por 30 segundos (sobrevivência <1%). A padronização do tempo de irradiação foi feita através de curva de sobrevivência a diferentes tempos de exposição à U.V. emitida pela referida fonte.

3.8. INTRODUÇÃO (MUTAGÊNESE) DO TRANSPOSON Tn5 EM RHIZOBIUM

Células de E.coli JI1830/pJB4JI (pPH1JI::Mu::Tn5), doador, e de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli C05 Sm^r, mutante espontâneo derivado da estirpe C05 parental, receptor, foram cultivadas em LB e TY a 37°C e 28°C até a fase logarítmica. As concentrações celulares foram padronizadas através de leituras KLETT (Colirímetro Fotoelétrico Klett-

Summerson, N.Y.-USA). A seguir as suspensões de células foram misturadas na proporção 1:1, a mistura filtrada em membrana tipo Milipore (0,45 μ m ϕ) e incubada durante à noite em agar TY a 28°C. As células bacterianas aderidas ao filtro foram, então, lavadas, diluídas e semeadas em meio MC Suplementado com sulfato de estreptomicina (100 μ g/ml) e Sulfato de Canamicina (30 μ g/ml). Este meio de cultivo permitiu contraselecionar o doador e isolar apenas derivativos de R.leguminosarum biovar phaseoli C05 carregando Tn5. Os transconjugantes foram detectados depois de incubação por 3 dias a 28°C.

3.9. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES AUXOTRÓFICOS

Colônias individualizadas de R.leguminosarum biovar phaseoli C05 provenientes de mutagênese com luz U.V. e por inserção do Tn5 foram, então transferidas, através de réplica em veludo, para MM sólido. Os mutantes assim isolados foram transferidos para MM sólido Suplementado com solução de aminocácidos (0,1ml/20ml meio), solução de ácidos nucleicos (0,1ml/20ml meio) ou solução de vitaminas (0,1ml/20ml meio). Após determinação do requisito nutricional, os mutantes foram analisados para capacidade de crescimento em MM sólido suple-

mentado com intermediários biossintéticos relacionados à auxotrofia detectada. Ensaio de reversão e/ou supressão da mutação auxotrófica foi realizado em MM sólido.

3.10.- OBTENÇÃO DE ESFEROPLASTOS EM RHIZOBIUM (BERRY & ATHERLY, 1984).

Células de R.leguminosarum biovar phaseoli C05 foram cultivadas em TY até a concentração de aproximadamente 10^8 células/ml; a seguir foram centrifugadas e ressuspendidas em YS-14 e incubadas a 28°C sob agitação de baixa rotação (100 rpm) por 24 horas. Após esse período, lisozima foi adicionada nas concentrações 300, 450 e 600 ug/ml e as células incubadas por 6,18,24 e 42 horas sob agitação da mesma rotação à anterior. A contagem do número de esferoplastos e/ou protoplastos obtidos foi feita por diferença através de plaqueamento com e sem diluição em água, uma vez que esferoplastos e protoplastos são totalmente lisados em meio hipotônico. A formação de esferoplastos foi também, examinada, em microscopia ótica e fotografada com filme fotográfico FUJI (135 mm ASA 100).

Tratamento por 6 horas com lisozima exclusiva para obtenção de protoplastos foi realizado até altas concentrações (>1.000 ug/ml) (Tabelas 4 e 5) da referida enzima, sendo que a suspensão de lise foi submetida à espectrofotometria de varredura de onda de 220 à 300 nm (Espectrofotômetro LKB-Biochron Ultrospec-4050).

3.11. FUSÃO DE PROTOPLASTOS

Células de R. legumiosarum biovar phaseoli C05 met⁻ Cm^r e de Bradyrhizobium ssp met⁺ Cm^s foram crescidas em 10 ml de TY a 28°C até a concentração de 10^8 células/ml. Em seguida foram centrifugadas, ressuspendidas em YS-14, contendo glicina (0,03%) e incubadas a 28°C sob agitação leve por 24 horas. Após centrifugação a 8.000 rpm, por 10 minutos, à temperatura ambiente, os precipitados foram ressuspendidos em 3ml de solução SET e novamente centrifugados. Os precipitados foram, então, ressuspendidos em 0,5 ml de solução SET, contendo lisozina (300 ug/ml e a suspensão foi incubada por 1-2 horas a temperatura ambiente. Após certificação de lise em água destilada, 0,1ml das soluções de protoplastos de cada espécie foram misturados e adicionados a 1.2ml de Polietileno Glicol (PEG) 50% em solução P1. Após agitação leve, a suspensão foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, di-

luida em 8,5 ml de solução P2 centrifugada a 3.000 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente e ressuspendida em 1ml de solução P2. A solução de protoplastos foi diluída até 10^{-4} , 0,1 ml de cada diluição foi adicionado a 3ml de solução hipertônica semi-sólida e colocados sobre placa meio seletivo (MM + Cm (30ug/ml) para células fundidas.

3.12. DETECÇÃO DE DNA PLASMÍDICO EM RHIZOBIACEAE (KADO & LIU, 1981)

Células de R.leguminosarum biovar phaseoli COS e Bradyrhizobium spp foram incubadas em 3ml de TY a 28°C por 24 horas sob agitação intensa (250 rpm) para atingir a fase logarítmica. A seguir, foram centrifugadas a 6.000 rpm (Centrifuga Sorvall RC2-B, Rotor SS34) por 7 minutos e o precipitado ressuspendido em 1 ml de tampão AE. As células foram lisadas através da adição de 2 ml de solução de lise a qual foi misturada por agitação suave. A solução foi aquecida a 50-65°C em banho-maria por 20 minutos. Dois volumes de solução fenol-clorofórmio (1:1, vol/vol) foram, então, adicionados, a solução foi emulsificada por agitação leve e a emulsão centrifugada à 6.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa superior foi, a seguir, transferida para novo tubo com auxí-

lio de pipeta de orifício largo. Amostras de 35 ul dessa solução foram misturadas com 10 ul de Solução A (Carregador da amostra) e eletroforizadas em gel de agarose (item 3.16). Para minimizar quebras dos plasmídios de alto peso molecular é importante que as amostras sejam sempre transferidas com pipetas de pontas largas. A solução plasmídica assim obtida pode ser também, utilizada para extração de plasmídios do gel de agarose ou através de ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério.

3.13. ISOLAMENTO DE DNA PLASMÍDICO EM E.coli ("MINISCREEN") (RODRIGUEZ & TAIT, 1983)

Células de E.coli HB 101 (pUC 119) foram crescidas em LB a 37°C até a fase logarítmica. 1,5 ml da cultura foram transferidos para tubo de microcentrifuga (tipo *pendorf*), centrifugados por 30 segundos e o precipitado ressuspendido em 1 ml de tampão SET. Após total ressuspensão do precipitado, a suspensão foi centrifugada por 1 minuto e o precipitado novamente ressuspendido em 150 ul de tampão SET. 5 ul de Solução RNase foram adicionados e, em seguida,, 350 ul de mistura lítica e a solução mantida à temperatura ambiente (a solução tornou-se clareada). A seguir, a referida solução

foi mantida em banho de gelo durante 10 minutos. 250 ul de acetato de sódio 3M foram, então, adicionados, misturados por inversão lenta do tubo e a solução incubada por 30 minutos em gelo (SDS e DNA cromossômico denaturado foram precipitados nesta etapa). A solução foi, em seguida, centrifugada por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para novo tubo. Igual volume de isopropanol foi adicionado, as fases misturadas por inversão do tubo e a solução centrifugada por 5 minutos à temperatura ambiente. Os tubos foram então invertidos, o isopropanol removido e o precipitado lavado, sem ressuspensão, com etanol 70%. Em seguida foi promovida nova centrifugação por 5 minutos à temperatura ambiente e o etanol removido. O precipitado foi em seguida, seco a vácuo durante 10 minutos e ressuspenso em 20 ul de água bidestilada. 1 a 2 ul dessa solução de DNA foram então, utilizados para digestão pela endonuclease de restrição utilizada no presente trabalho (item 3.18). Quando necessário, a solução de DNA foi concentrada e reextraída em fenol/clorofórmio (item 3.14).

3.14. EXTRAÇÃO FENOL/CLOROFÓRMIO

Um volume de fenol saturado foi adicionado e misturado à solução de DNA a ser concentrada. A fase aquosa

(superior) foi separada da fase orgânica (fenol) através de centrifugação de 4.000 rpm por 3 minutos a 4°C. Após descarte do fenol, 1 volume de clorofórmio foi adicionado à fase aquosa e a suspensão foi centrifugada por 3 minutos a 4°C. A fase aquosa foi, então, transferida para novo tubo, adicionados 2,5 volumes de etanol resfriado e 0,1 volume de solução acetato de sódio 3M e a mistura mantida a -70°C por 20 minutos. A suspensão foi, em seguida, centrifugada a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C, descartado o sobrenadante e o precipitado de DNA lavado com etanol 70% sem agitação. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C, descartado o etanol e o precipitado seco a vácuo por 10 minutos. O precipitado de DNA assim obtido foi, finalmente, redissolvido em tampão ou água destilada até a concentração desejada.

3.15. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DE BRADYRHIZOBIUM spp (RODRIGUEZ & TAIT, 1983, modificado).

Células de Bradyrhizobium spp foram cultivadas em 100 ml de TY até a fase logarítmica e centrifugadas à 6.000 rpm por 7 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspendido em 15 ml de tampão TAE, dissolvido totalmente, adicionados

30 ml de Solução de lise e, a solução mantida por 30 minutos à temperatura ambiente. A seguir, o pH foi ajustado a 7,0 através de adição de solução acetato de sódio 3M. 0,5 ml de solução de lisozima (5 mg/ml em tampão TEN) e 0,3 ml de Solução RNase foram, então adicionados e a solução incubada em banho de gelo por 30 minutos. Posteriormente, 0,1 ml de SDS (25%) foi adicionado à solução e esta incubada a 37°C sob agitação leve por 3 a 6 horas. Em seguida 0,3 ml de pronase e 1,5 ml de clorofórmio/álcool isoamílico foram adicionados à solução prosseguindo a incubação a 37°C durante uma noite (10-16 horas). 1 ml de água bidestilada e 2 volumes de clorofórmio/álcool isoamílico foram, então adicionados, em seguida, a solução foi agitada por inversão lenta do tubo, durante 5 minutos e centrifugada a 9.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa (superior) foi removida com auxílio de uma pipeta de ponta larga e a extração por clorofórmio foi repetida 2 vezes mais. Após a remoção da última fase aquosa, foram adicionadas 0,2 ml de NaCl e 2 volumes de etanol 95% resfriado, a solução foi misturada por agitação leve e mantida em banho de gelo por 5 minutos. Utilizando-se de um bastão de vidro, as fitas fibrosas de DNA precipitado foram enroladas e mergulhadas em etanol 95% para remoção do DNA de baixo peso molecular contaminante. A seguir, o DNA enrolado foi dissolvido em 2 ml de tampão TEN e estocado à 4°C até sua utilização (DNA puro dissolve no referido tampão em 30 minutos; DNA contaminado com proteínas demora algumas horas para ser dissol-

vido). Se necessário, a solução de DNA foi concentrada tal como descrito no item 3.14.

3.16. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE ("MINIGEL")

Agarose a 1% foi dissolvido em tampão TAE sob aquecimento e, em seguida, adicionado 0,5 ug/ml de brometo de etídio. Após solidificação do gel, o pente foi retirado, permitindo a formação de 8 poços de volume variado (10-40 ul). Amostras de DNA plasmídico e/ou cromossômico, bem como do padrão λ (lambda) digerido com Hind III, adicionadas de 5 ul de Solução A ou em mistura paralisadora de reação foram, então, transferidas para os poços do minigel e este imerso em tampão TAE na cuba. A eletroforese foi a seguir, iniciada e prosseguida por 30-40 minutos a 100 volts (10-15 miliamps). Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido para um transiluminador de U.V., as bandas de DNA visualizadas e fotografadas através de Câmara Polaroid dotada de filme Polaroid tipo 55.

No caso de R.leguminosarum biovar phaseoli C05 e Bradyrhizobium spp, após a detecção do DNA plasmidico como em 3.12, a amostra foi submetida a eletroforese em gel de agarose 0,7% em um único poço o qual tomou toda a largura do gel. Tal procedimento foi utilizado para evitar quebras dos possíveis plasmídios grandes (megaplasmídios), ocorrentes nessas espécies de bactérias, através de micropipetagens para poços pequenos.

3.17. ELETROELUIÇÃO DO DNA DO GEL DE AGAROSE (MANIATIS et alii, 1982)

Após a eletroforese em gel de agarose da solução de DNA plasmidial e cromossomal, a banda de interesse foi localizada, com auxílio de transiluminador de U.V..A agarose correspondente foi cortada com bisturi flambado e transferida para um saco de diálise pré-aquecido em solução EDTA 0,002M (neutralização de nucleases contaminantes). A seguir adicionou-se tampão TAE para cobrir todo o gel, evitando a presença de bolhas de ar. O saco foi então amarrado nas extremidades, imerso em tampão E dentro da cuba e a eletroeluição processada a 100V durante uma hora. A polaridade foi, em seguida, revertida por 2 minutos para liberação do DNA aderi-

do à parede do saco de diálise e a solução DNA retirada com pipeta Pasteur. O pedaço do gel foi reexaminado em U.V. para certificar se todo DNA havia sido eluído. A solução de DNA assim obtida foi extraída e concentrada tal como no item 3.14.

3.18. DIGESTÃO DO DNA PLASMÍDICO E CROMOSSÔMICO

A- Utilizando-se de microtubo tipo *ependorf*, sem uso anterior, 3 ul de solução de DNA do plasmídio pUC 119, extraído de E.coli HB 101 (item 3.13) foram adicionados a 1,0 ul da enzima de restrição Bam HI, 1,5 ul de tampão 10X de reação da Bam HI e 9,5 ul de água bidestilada, totalizando um volume de 15 ul. Os referidos reagentes foram colocados em ordem ascendente, observando-se que o DNA fosse o último colocado; a mistura de reação foi centrifugada por 5 segundos. Durante as operações, os reagentes foram mantidos em gelo. A digestão foi, então, iniciada através de incubação da mistura a 37°C por uma hora ou até a digestão total, mantendo-se, em seguida em gelo. O progresso da reação foi monitorado através de eletroforese em gel de agarose (item 3.16) de amostras em mistura de paralização de reação (5 ul da amostra + 5 ul de mistura paralizadora). A quantidade de DNA adicionada na rea-

ção de digestão é baseada numa concentração de DNA de 0,5 ug/ml. Para tanto, a solução de DNA deve ser concentrada ou diluída devidamente. Em geral, o volume de DNA não deve exceder 50% do volume total da reação. A concentração do DNA na solução utilizada nesse trabalho foi estimada através de leitura de absorbância a 260 nm em espectrofotômetro Biochron Ultropec-4050. Determinou-se experimentalmente para E. coli, que uma unidade de densidade ótica (d.o.) equivale a 50ug/ml de DNA (RODRIGUEZ & TAIT, 1983). Assim, esse fator de conversão tem sido utilizado para determinação de concentração de DNA em soluções; contudo, essa relação deve ser aplicada apenas para soluções puras de DNA.

B. Utilizando-se de microtubos, tal como descrito acima, 8 ul de solução de DNA cromossômico de Bradyrhizobium spp (4 ug de DNA), extraído como em 3.15, foram adicionados a 4 ul de enzima Sau 3AI, 2 ul de tampão 10X de reação da Sau 3AI e 6 ul de água bidestilada totalizando 20 ul como volume final. Os referidos reagentes, também, foram adicionados em ordem ascendentes e a mistura de reação centrifugada por 5 segundos. A reação de digestão foi parcial a 37°C por 40 minutos, mantendo-a em congelador para paralização da reação. O progresso da reação foi monitorado em eletroforese de gel de agarose juntamente com amostras padrão de DNA do fago λ digerido com a enzima de restrição Hind III. O volume

de DNA, adicionado na reação foi baseado como no item anterior. A banda do DNA diregido correspondente a 10-20 Kb, segundo o padrão do DNA diregido do λ , foi, cortada e eluída em saco de diálise (item 3.17) para utilização do DNA na reação de ligação ao plasmídeo vetor (item 3.20).

3.19. DESFOSFORILAÇÃO DO DNA

Após digestão do plasmídeo pUC 119 tal como em 3.18.A, 10 μ l da solução de DNA em reação de digestão, foram extraídos uma vez com fenol/cloroformio (item 3.14). O DNA foi, então, dissolvido em 10 μ l de Tris HCl 0,1M (pH 8,0) e desfosforilado com 1 μ l de enzima fosfatase alcalina bacteriana (BAP) tal como se segue. Após rápida centrifugação (~5 segundos em microcentrífuga), em microtubo, a mistura foi incubada por 1 hora a 50°C para reação enzimática de remoção dos resíduos 5-fosfato dos fragmentos de DNA, prevenindo sua autoligação. Após esse procedimento, o DNA plasmídico foi novamente extraído com fenol/clorofórnio, precipitado em etanol e ressuspendido em 10 μ l de água bidestilada.

3.20. LIGAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO DE BRADYRHIZOBIUM COM O DNA DO PLASMÍDIO VETOR

As soluções de reações obtidas em 3.18.B e 3.19 foram dialisadas contra 1 litro de tampão TEN durante, pelo menos, 3 horas à temperatura ambiente em tubo tipo Eppendorf adaptado com uma membrana de diálise (minidiálise). A seguir, 8 ul da solução do DNA cromossômico dialisada de Bradyrhizobium (3.18.B) e 1 ul da solução de DNA do plasmídio vetor dialisado de E.coli foram misturados e adicionados 0,5 ul de ligase T4; 2 ul de tampão T4 ligase 10X; 2,5 ul de ATP 10X e 6 ul de água bidestilada, totalizando 20 ul. A mistura de reação de ligação foi, então, incubada durante à noite a 15°C e, em seguida, mantida a -20°C para posterior transformação bacteriana.

3.21. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA PELO MÉTODO DO CLORETO DE CÁLCIO (MANIATIS et alii, 1982 MODIFICADO)

10 ml de LB foram inoculados com 0,1 ml de uma cultura fresca de E.coli HB 101 e incubados sob intensa agitação a 37°C durante 3-5 horas para obtenção de uma densidade

de aproximadamente 5.10^7 células/ml ($DO_{550}=0,5$). A densidade foi monitorada em espectrofotômetro a 550 nm. A cultura foi, em seguida resfriada em gelo durante 15 minutos, centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C e, o precipitado de células, ressuspendido em 5 ml (metade do volume original) de uma solução esterilizada e resfriada de $CaCl_2$ 50 mM e Tris HCl 10 mM (pH 8,0). A suspensão de células foi transferida para um banho de gelo por 15 minutos e, então, centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 667 μ l (1/15 do volume original) da referida solução resfriada de $CaCl_2$ e Tris HCl. A seguir, foram adicionados, em novo tubo, 10 μ l da solução de DNA em tampão de ligação (item 3.20), 100 μ l de tampão TE e 200 μ l de suspensão de células competentes (passíveis de transformação) em $CaCl_2$ obtidas acima; a mistura foi levemente agitada e mantida em gelo por 2-3 horas. Após a reação de transformação, o tubo foi transferido para banho-maria a 42°C e mantido, assim, por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 ml de LB, sendo a suspensão de células, incubada a 37°C por 1 hora sem agitação para permitir recuperação das células e início da expressão da resistência ao antibiótico marcador (ampicilina). A suspensão foi, então, centrifugada à temperatura ambiente por 4 minutos e as células ressuspendidas em 100 μ l de água bidestilada, inoculadas em meio seletivo, contendo 50 μ g/ml de ampicilina e incubadas a 37°C durante à noite.

3.22. CONJUGAÇÃO BACTERIANA

3.21.1. Conjugação Biparental

Células recipientes de R.leguminosarum biovar phaseoli C05 Sm^r foram crescidas em TY a 28°C até o início da fase logarítmica. As células foram, então coletadas por centrifugação a 8.000 rpm por 10 minutos e o precipitado lavado duas vezes com tampão fosfato. Uma cultura de células doadoras de E.coli JI1830 (pJB4JI::Tn5) em fase exponencial de crescimento foi, igualmente, centrifugada e lavada. Iguais volumes (1 ml: 1ml ou mais) das culturas doadora e receptora foram forçadas em filtro membrana tipo milipore (0,45u Ø) e, este, incubado na superfície de meio TY sólido a 28°C durante uma noite. O filtro foi, a seguir, transferido para 2 ml de tampão fosfato e, as células liberadas do mesmo por vigorosa agitação. Aliquotas de 0,1 ml da mistura de conjugação foram, então, inoculadas em meio mínimo seletivo (MM ou MC+ Canamicina, 30 ug/ml) para exconjugantes do Rhizobium. A contagem das células viáveis foi realizada, utilizando-se da mesma mistura de conjugação para estabelecimento da frequência de transposição. Tal conjugação foi realizada para introdução do transposon Tn5 em Rhizobium.

3.22.2. Conjugação Triparental

Células recipientes de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli C05 met⁻, obtida neste trabalho, foram crescidas em TY a 28°C até o início da fase logarítmica. As células foram, então, coletadas por centrifugação a 8.000 rpm por 10 minutos e o precipitado lavado duas vezes com tampão fosfato. Culturas doadoras de E.coli S17 (Tn5 mob⁺/pSUP 5011) e E.coli HB 101 (pRK 2013 *helper*) em fase exponencial de crescimento foram, igualmente, centrifugadas e lavadas. Iguais volumes das referidas culturas doadoras (sistema binário de transferência) e receptadora foram forçadas em filtro membrana Milipore (0,45 µm) e este, incubado, na superfície de meio TY sólido a 28°C durante à noite. O filtro foi a seguir, transferido para 2 ml de tampão fosfato e as células liberadas do mesmo através de vigorosa agitação. Aliquotas de 0,1 ml da mistura de conjugação foram, então, inoculadas em meio mínimo seletivo (MM ou MC+met+Cm(30ug/ml)) para transconjugantes de Rhizobium. A contagem das células viáveis foi realizada utilizando-se da mesma mistura de conjugação para estabelecimento da frequência da mesma.

3.23. TESTE DE NODULAÇÃO EM PLANTAS

Sementes de feijão preto (Phaseolus vulgaris, variedade Negro Angel) e soja perene (Neonotonia wightii cv., tinaroo) foram esterilizadas superficialmente com etanol 95% por 3 minutos, seguindo-se de solução de hipoclorito de sódio 8% v/v durante 5-10 minutos de acordo com o tamanho da semente. Em seguida, foram lavadas 10 vezes com água esterilizada, escarificadas fisicamente, quando necessário, e pré-germinadas em agar. As sementes foram, então, transferidas para tubo de Gibson modificado esterilizado, contendo areia e vermiculita, na proporção 1:2, regadas com solução nutritiva para plantas (item 3.4.4). Após uma semana de crescimento, em casa-de-vegetação, as plantas foram inoculadas com solução de células de Rhizobium e Bradyrhizobium, mutantes ou selvagens na região do colo. Nodulação foi observada após 3-4 semanas de crescimento.

4.- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.- ISOLAMENTO DE MUTANTE AUXOTRÓFICO U.V.-INDUZIDO.

Seiscentos e cinquenta (650) colônias de R. leguminosarum biovar phaseoli COS, provenientes de irradiação U.V. (valores de sobrevivência, Tabela 3), foram transferidas para meio mínimo, possibilitando o isolamento de um mutante auxotrófico (~0,15%) caracterizando como metionina-deficiente. Medidas de frequência de mutação para uma variedade de genes bacterianos mostraram que mutação gênica espontânea origina, em média, na frequência de 10^{-7} (WATSON, 1977). Assim, há uma grande probabilidade de que o mutante obtido (frequência da ordem de 10^{-3}) tenha sido induzido pela radiação U.V.. Reversão e/ou supressão da mutação auxotrófica, mostrou uma frequência de $2,7 \cdot 10^{-8}$. Frequências similares foram observadas por ALI et alii (1984) e ROSTAS et alii (1984) em trabalhos de isolamento de mutantes auxotróficos em R. meliloti e R. japonicum, respectivamente. Tal como conhecidas as vias metabólicas em bac-

Tabela 3: Números e porcentagens de células de R. leguminosa
rum biovar phaseoli C05 sobreviventes à Radiação
U.V. em diferentes tempos de tratamento.

Tempo (segundo)	Nº médio de células viáveis/ml	% sobrevivência
0	76,00.10 ⁸	100,00
10	12,90.10 ⁸	16,97
20	2,35.10 ⁷	0,31
30	6,50.10 ⁶	0,09
40	1,06.10 ⁶	0,01
50	0,12.10 ⁶	< 0,01
60	0,10.10 ⁶	< 0,01

térias (JOCELYN, 1972; LEHNINGER, 1975), o mutante auxotrófico foi caracterizado, adicionalmente, para resposta de crescimento a diferentes intermediários biossintéticos dos aminoácidos e compostos contendo enxofre. Assim, o mutante desenvolveu-se também, na presença de cisteína, tiosulfato de sódio e sulfato de sódio. Nesse particular, ALI et alii (1984) distinguiram, em R.meliloti, quatro grupos de mutantes met⁻, incluindo no grupo I, aqueles capazes de desenvolver somente em metionina; no grupo II, aqueles capazes de crescer também em homocisteína; no grupo III, os que desenvolveram-se com suplementação de cistationina ou homocisteína e no grupo IV aqueles capazes de desenvolver na presença de succinil-homoserina, cistationina e homocisteína. Tais autores inferiram desses resultados que a maioria dos intermediários de metionina puderam ser utilizados eficientemente por R.meliloti, pelo menos. Por outro lado, KERPPOLA & KANN (1988) isolaram mutantes metionina-deficiente (frequência de 0,1%) os quais desenvolveram-se, também, em histidina, colina e cianocobalamina, sugerindo que tais mutações envolveram o metabolismo monocarbonico e que os compostos referidos devam ser derivativos do tetrahidrofolato metilado. Tais observações mostram a quantidade de loci, os quais podem resultar, quando mutados, em alteração no metabolismo da metionina e de outros aminoácidos contendo enxofre (SODA, 1987) e a frequente obtenção de tais mutantes em microrganismos como provável consequência deste fato. O mutante obtido no trabalho não foi

ensaiado para nodulação e fixação de nitrogênio. KERPPOLA & KAHN (1988) observaram entretanto, que os mutantes metionina-deficientes obtidos por eles em R. meliloti foram ineficientes para promover nodulação. A correlação de um defeito nutricional com um defeito na associação simbiótica mostra que, em alguma etapa do desenvolvimento do nódulo, o nutriente requerido não pode ser obtido da planta ou que a bactéria alterada não foi capaz de absorvê-lo possibilitando, também, o reconhecimento dos genes envolvidos nos vários passos do processo da fixação simbiótica de nitrogênio.

Idênticos perfis plasmídicos, em gel de agarose, foram observados para ambas as estirpes, parental e metionina-deficiente, tal como ilustrado na Figura 5A.

Três mil (3.000) colônias de Bradyrhizobium spp, provenientes de irradiação U.V., foram ensaiadas, sendo que nenhum mutante auxotrófico foi isolado. A dificuldade no isolamento de mutantes pode ser uma das razões pela qual pouco progresso tem sido obtido concernente ao conhecimento dos genes simbióticos em espécies de rizóbio de crescimento lento. Mutagênese química, física ou biológica tem resultado em frequências baixas ou nulas de mutantes auxotróficos em Bradyrhizobium. Tais observações sugerem redundância genética bem como a possível existência de vias alternativas para a biossíntese de compostos de crescimento no referido gênero

(ROSTAS et alii, 1984). É necessário que um procedimento de mutagênese ao acaso seja estabelecido para marcação, identificação e eventual isolamento de genes envolvidos nos vários passos do metabolismo bacteriano.

O isolamento de mutante auxotrófico nesse trabalho objetivou marcação genética das estirpes para procedimento de conjugação bacteriana.

4.2.- TRANSFERÊNCIA DO TRANSPOSON E ISOLAMENTO DE MUTANTE Tn5-INDUZIDO

A mobilização de inserções Tn5-genômicas deste trabalho, foi conduzida através de conjugação biparental entre R.leguminosarum biovar phaseoli COS e E.coli JI1830 (BERINGER et alii, 1978). Esta última linhagem citada, carrega uma cópia do plasmídio do grupo P-1 de incompatibilidade, pPH1JI, o qual provém funções Tra⁺ requeridas para mobilização via conjugação biparental de plasmídios para Rhizobium. O plasmídio pJB4JI, derivativo do pPH1JI carregando o fago Mu e o transposon Tn5 (Cm^r) (pPH1JI::Mu::Tn5), foi o vetor utilizado para introdução do referido elemento transponível na estirpe de Rhizobium. Tal plasmídio é instável em Rhizobium de-

vido à presença do Mu, suicida após transferência conjugativa (ROSTAS et alii, 1984). Tal fato pode ser devido a um aumento no mecanismo de restrição do hospedeiro ao plasmídio exógeno ou à expressão de pelo menos, uma função não determinada do Mu (BERINGER et alii, 1978, ELY & CROFT, 1982).

Seleção para transconjugantes Tn5 (Cm^r Sm^r) mostrou uma frequência da ordem de 10^{-3} , sendo que nenhuma colônia foi encontrada na placa controle. Diferentes frequências de introdução do Tn5 têm sido verificadas (ALI et alii, 1984; JAGADISH & SZALAY, 1984; THOMAS et alii, 1986).

Quinhentos e cinquenta (550) colônias provenientes de células transconjugantes, Tn5-inseridas, foram ensaiadas para auxotrofia, possibilitando o isolamento de um mutante metionina-deficiente (frequência 0,18%). Considerações genéticas e bioquímicas, concernentes à mutação para deficiência à metionina, foram relatadas o item anterior.

Esse procedimento biológico de mutagênese (LONG et alii, 1981) tem sido empregado em Rhizobium não somente para geração de mutantes auxotróficos, como também para isolamento de mutantes simbioticamente defectivos (CEN et alii, 1982; JAGADISH & SZALAY, 1984).

A frequência de reversão da mutação para metionina não foi calculada devido ao não interesse no presente trabalho. Nesse particular, porém, em E.coli, a maioria das mutações Tn5-induzidas foram capazes de reverter à prototrofia com concomitante perda da resistência à canamicina determinada pelo referido transposon. Em Rhizobium, ALI et alii (1984) observaram que alguns pseudorevertentes foram Cm^r, sugerindo que os eventos transposicionais possam ser mais complexos nesse gênero. Comparando-se os fenótipos dos mutantes auxotróficos Tn5-induzidos obtidos por outros autores (MEADE et alii, 1982; FORRAI et alii, 1983; BERINGER et alii, 1978; ALI et alii, 1984), observa-se que parece haver regiões particulares do cromossomo nas quais inserções Tn5 ocorrem mais frequentemente. Mutantes met⁻ estiveram presentes em todas as espécies de Rhizobium, sugerindo que alguns loci do replicon rizobiano devam ser alvos mais "quentes".

Cem (100) transconjugantes Cm^r T5-inseridos de R. leguminosarum biovar phaseoli CDS foram inoculados em feijão (simbionte natural), sendo que todos apresentaram nodulação a qual não diferiu do controle parental. Reisolamento de bactérias dos nódulos em meio seletivo (Cm+Sm) mostrou mais que de 90% deles continham rizobios resistentes a tais antibióticos, sugerindo estabilidade do determinante para resistência à canamicina, após passagem pela planta. Eletroforese em gel de agarose para DNA plasmidial não mostrou diferença entre a

estirpe parental e os transconjugantes, havendo possibilidades de integração do transposon ao cromossomo do Rhizobium receptor.

Alto nível de resistência intrínseca a antibióticos verificado para Bradyrhizobium spp dificultou a visualização da presença do Tn5 nesta espécie. Seleção para inserções Tn5 não possibilitou observação de frequência mais alta para resistência à canamicina que a do background do receptor. Há que se considerar, também, a possibilidade de não ocorrência de transferência conjugativa entre a espécie de Bradyrhizobium utilizada e E. coli.

4.3.- OBTENÇÃO DE ESFEROPLASTOS

4.3.1.- Tratamento com lisozima

Células de R.leguminosarum biovar phaseoli C05 e Bradyrhizobium spp foram tratadas com lisozima, a diferentes concentrações, e em seguida, adicionadas a uma solução aquosa hipotônica. Admitindo-se que os esferoplastos formados foram, assim, lisados e que os componentes celulares proteínicos e ácidos nucleicos, principalmente, foram liberados na

solução e que esta poderia conter, ainda, células intactas e produtos exógenos de seus metabolismos e lisozima, o procedimento mais adequado para análise dos resultados compreendeu a determinação das absorbâncias a 260 e 280 nm, bem como a relação entre elas. Assim a suspensão foi submetida à espectrofotometria de varredura de 220 a 300nm. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 4 para R. leguminosarum biovar phasgoli C05 e na Tabela 5 para Bradyrhizobium spp.

Tabela 4: Valores relativos à espectrofotometria de varredura de onda de 220 a 300 nm para uma solução de células de R.leguminosarum biovar phaseoli COS submetida a diferentes concentrações de lisozima.

Lisozima ug/ml	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{280/260}	Fator de ⁽¹⁾ Correção	Ácidos ⁽³⁾ Nuclêicos (%)	Proteína ⁽²⁾ Total (mg/ml)
0	0,18	0,17	1,06	0,94	0,74	4,00	0,13
250	0,26	0,32	0,81	1,23	0,91	1,72	0,29
500	0,33	0,38	0,87	1,15	0,89	2,10	0,34
750	0,31	0,33	0,94	1,06	0,83	2,83	0,27
1000	0,44	0,50	0,88	1,14	0,88	2,14	0,44
2000	0,63	0,93	0,68	1,48	1,02	0,60	0,95
3000	0,76	1,27	0,60	1,67	1,07	0,17	1,36

A₂₆₀ = absorvância a 260 nm, comprimento de onda de maior absorção pelos ácidos nuclêicos;

A₂₈₀ = absorvância a 280 nm, comprimento de onda de maior absorção pelas proteínas; (1) Fator de correção, segundo o método de WARBURG-CHRISTIAN, para determinação de proteínas (COOPER, 1977); (2) Concentração de proteínas calculada pela fórmula $(A_{280}) \times (\text{fator de correção}) = \text{mg proteína/ml}$; (3) concentração de ácidos nuclêicos segundo a tabela de WARBURG-CHRISTIAN para determinação dos fatores de correção (COOPER, 1977).

Tabela 5: Valores relativos à espectrofotometria de varredura de onda de 220 a 300 nm para uma solução de células de Bradyrhizobium spp submetida a diferentes concentrações de lisozima.

Lisozima ug/ml	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/280}	A _{280/260}	Fator de ⁽¹⁾ Correcção	DNA ⁽³⁾ Total (%)	Proteína ⁽²⁾ Total (mg/ml)
0	0,16	0,14	1,14	0,88	0,69	5,10	0,10
250	0,16	0,19	0,84	1,19	0,89	2,07	0,17
500	0,23	0,31	0,74	1,35	0,98	1,17	0,30
750	0,30	0,43	0,70	1,43	1,03	0,69	0,14
1000	0,41	0,62	0,66	1,51	1,05	0,52	0,65
2000	0,60	0,99	0,61	1,65	1,09	0,21	1,08
3000	0,83	1,42	0,58	1,71	1,11	0,08	1,58

A₂₆₀ = absorbância a 260 nm, comprimento de onda maior de absorção pelos ácidos nucleicos;
 A₂₈₀ = absorbância a 280 nm, comprimento de onda de maior absorção pelas proteínas; (1) Fator de correção, segundo o método de WARBURG-CHRISTIAN, para determinação de proteínas (COOPER, 1977); (2) Concentração de proteínas calculada pela fórmula (A₂₈₀)X(fator de correção) = mg proteína/ml; (3) concentração de ácidos nucleicos segundo a tabela de WARBURG-CHRISTIAN para determinação dos fatores de correção (COOPER, 1977)..

As Figuras 1 e 2 ilustram os valores das Tabelas 1 e 5 quanto à concentração de DNA total e proteína total respectivamente, em função da concentração de lisozima utilizada.

FIGURA 1: Curva de concentração estimada de ácido nucléico total de solução de células de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* e de *Bradyrhizobium* spp tratada com diferentes concentrações de lisozima e lisadas em meio hipotônico.

FIGURA 2: Curva de concentração estimada de proteína de solução de células de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli* e de *Bradyrhizobium* spp tratada com diferentes concentrações de lisozima e lisadas em meio hipotônico.

Como pode-se observar pelas Tabelas 4 e 5, os valores de absorbância para a solução pura de lisozima ("blank") não foram apresentados por que esta não absorveu significativamente nos comprimentos de onda considerados. A absorção pela lisozima ocorreu abaixo de 240nm.

Através dos dados mostrados na Tabela 4, relativos a R. leguminosarum biovar phaseoli C05, verifica-se que o percentual de ácidos nucleicos aumentou até a concentração de lisozima ao redor de 750 ug/ml; a partir de, então, tal valor foi decrescente (Figura 1). O mesmo resultado não foi observado para as células de Bradyrhizobium, onde a proporção de ácidos nucleicos foi sempre decrescente com o aumento da concentração da enzima lítica (Figura 1). A concentração de proteína total foi, para ambas as espécies, sempre crescente (Tabela 5). Em ambos os casos, as absorbâncias a 260 nm foram crescentes com a concentração de lisozima devido, provavelmente, a um aumento na quantidade de proteínas, uma vez que a presença das mesmas também contribue para a absorbância no referido comprimento de onda (RODRIGUEZ & TAIT, 1983), diminuindo, conseqüentemente, a proporção de ácidos nucleicos na suspensão. Assim, o procedimento mais adequado para a análise dos resultados compreendeu a determinação das relações das absorbâncias a 260 e 280 nm.

O aumento na quantidade de proteínas simultânea à diminuição na proporção de ácidos nucleicos, sugere a excreção de proteínas pelas células intactas durante o período de tratamento com lisozima (6 horas). Especulativamente, a presença dessas proteínas poderia ser atribuída a enzimas exportadas pelas células do rizóbio para degradar lisozima, principalmente, e demais componentes celulares liberados pelas células mortas espontaneamente, uma vez que estes eram as possíveis fontes de nutrientes presentes na suspensão durante o período de tratamento. Tal fato pode ser corroborado pelo tratamento de controle (sem lisozima) onde a proporção de ácidos nucleicos foi maior que para os outros tratamentos, com diminuição na concentração de proteínas.

Tais resultados mostram a pouca ou nenhuma ação da lisozima, enzima de lise de parede celular, sobre células de Rhizobium e Bradyrhizobium. Bactérias gram negativas possuem uma membrana celular externa à camada peptidoglicônica, de difícil remoção pela lisozima (DIRIENZO et alii, 1978). Tal fato vem dificultando a obtenção de protoplastos em Rhizobiaceae. Formação aparente de esferoplastos tem sido observada em R. leguminosarum desenvolvendo-se em meio de cultura rico em extrato de levedura e outras substâncias orgânicas (BERINGER, 1974; JORDAN, 1965). Isto, ou mesmo a

ocorrência natural do esferoplastos (SHOHNO)⁽²⁾ poderia explicar, prioritariamente à ação de lisozima, a ocorrência dos esferoplastos formados, principalmente para a estirpe de crescimento rápido. Espécies de crescimento lento devem apresentar maior resistência, ainda, à formação de protoplastos.

4.3.2.- Tratamento com lisozima e Glicina

Células de bactérias gram negativas, tal como observado também neste trabalho, são geralmente resistentes as substâncias normalmente empregadas (lisozima, penicilina) para remoção de parede celular. Dessa forma, utilizou-se pré-tratamento com glicina, baseado na sensibilidade que as referidas células podem apresentar à lisozima após crescimento na presença da referida substância (BERRY & ATHERLY, 1984). A Tabela 6 mostra as porcentagens de esferoplastos e/ou protoplastos obtidos para R.leguminosarum biovar phaseoli C05 (Figura 3) após tratamento com glicina (300 ug/ml) e lisozima sob diferentes concentrações e tempo de tratamento.

(2)

SHOHNO, K. (Departament of Pure and Applied Sciences, College of Arts and Sciences-University of Tokyo, Tokyo/Japan). Comunicação pessoal, 1987.

Tabela 6: Porcentagem de esferoplastos e/ou protoplastos obtidos para R. leguminosarum biovar phassoli, COS após pré-incubação com glicina e tratamento com lisozima sob diferentes concentrações e tempos.

Lisozima (ug/ml)+ (glicina 300 ug/ml)	% esferoplastos e/ou protoplastos			
	Tempo tratamento (Horas)			
	6	18	24	42
0	-	-	3,01	-
300	98,22	99,66	99,96	99,99
450	98,85	99,58	99,98	99,99
600	99,91	99,99	99,99	99,99

- Valor não determinado

Verifica-se, pelos resultados obtidos na Tabela 6 que, considerando pré-tratamento com glicina, concentrações de lisozima iguais ou superiores a 300 ug/ml possibilitaram a obtenção de alta porcentagem de esferoplastos e/ou protoplastos, com diferenças pouco marcantes na produção dos mesmos após 6 horas de tratamento. Menor tempo de tratamento poderia ser utilizado, principalmente, em concentrações superiores a 450 ug/ml, uma vez, que os protoplastos formados podem ser inviabilizados na presença de lisozima. Observa-se também, que o tratamento glicina exclusiva possibilitou a obtenção de 3,01% de esferoplastos e/ou protoplastos, mostrando o poder

desestabilizante de parede celular dessa substância. Glicina é considerada inibidor de crescimento em muitas espécies de bactérias, porém, o mecanismo através do qual a referida substância, inibe a síntese de parede celular não é conhecido. Em *Staphylococcus aureus*, a glicina inibiu, principalmente, a incorporação da alanina na camada peptidoglicônica, tornando a parede celular sensível a lisozima (STROMINGER & BIRGE, 1965). SHERWOOD (1972) observou que a glicina foi a principal causa da toxicidade do extrato de levedura em *R. leguminosarum* biovar *trifolii*. A ocorrência de formas bacteróides em glicina foi bem documentada por BERINGER (1974); JORDAN (1965) e SHERWOOD (1972).

Os protoplastos obtidos no presente trabalho, apresentaram-se esféricos e morfológicamente similares aos bacteróides encontrados nos nódulos maduros. A regeneração das células, a partir de esferoplastos, foi provida em meio sólido, segundo BERRY & ATHERLY (1984), sendo que a frequência obtida foi de 2,1% e considerada baixa.

Figura 3: Células de R.leguminosarum biovar phaseoli C05 (1000X) sem tratamento enzimático (a) e tratadas com enzima de lise de parede celular, mostrando formas arredondadas(b). A seta em (a) mostra uma célula típica de Rhizobium e em (b) início de liberação do protoplasma celular.

Considerando que fusão do protoplastos constitui-se em um método de transfência de fatores genéticos intra e interespecificamente, onde métodos normais de transferência gênica não são viáveis, a determinação de protocolos de formação de protoplastos é bastante importante.

4.4. FUSÃO DE PROTOPLASTOS

Tentativa de fusão de protoplastos entre R. leguminosarum biovar phaseoli CO5 e Bradyrhizobium spp foi realizada sem, porém, obtenção de regeneração de protoplastos recombinantes. É possível que tais espécies não apresentem compatibilidade entre protoplastos ou que o método utilizado, apesar de eficiente para outras espécies incluindo Bradyrhizobium japonicum e Azospirillum,⁽³⁾ necessite alterações para viabilização nas espécies utilizadas no trabalho. Há que se considerar ainda, que a baixa frequência (2,1%) de regeneração de protoplastos totais, também, pode ter dificultado ou impossibilitado a detecção de protoplastos recombinantes. Apesar de muitos resultados promissores, a técnica de fusão de protoplastos pode ser ainda, considerada artesanal. Os procedimentos comumente utilizados apresentam limitações tais como (a) as condições ótimas de fusão devem ser, quase que empiricamente, determinadas para cada sistema celular, podendo variar consideravelmente, de espécie para espécie ou mesmo serem parcialmente contraditórias; (b) o processo de fusão

-----⁽³⁾

SOSA, G.S.H. (Centro de Ingeniería Genética Y Biotecnología, C.I.G.B., Havana, Cuba) Comunicação Pessoal, 1987.

não é sincrônico e muito frequentemente pode-se estender por um longo período (mais de uma hora); (c) durante a fusão pode ocorrer perda de substâncias intracelulares, resultando em decréscimo na viabilidade dos híbridos; (d) a viabilidade pode ser afetada pelo composto fusogênico (geralmente polietilenoglicol-PEG) presente durante todo o processo de fusão (ZIMMERMANN & VIENKEN, 1982). A regeneração de protoplastos é, geralmente, realizada em meio hipertônico e influenciada por uma variedade de fatores, incluindo o próprio meio de cultura (PEBERDY, 1980).

4.5.- Detecção de plasmídios em Gel de Agarose em Rhizobium

Diferentes métodos têm sido utilizados para detecção de DNA plasmídico em bactérias gram negativas. A maioria deles é baseada no procedimento de ECKHARDT (1978), o qual envolve lise da célula bacteriana no poço do gel de agarose antes da eletroforese. Esses métodos, porém, envolvem muitas etapas, constituindo problema na visualização de bandas referentes a plasmídios de baixa mobilidade (megaplasmídios). Através de algumas modificações do método de KADO & LIU (1981), foi possível detecção de plasmídio em R.legumino-

sarum biovar phaseoli C05. O método empregado nesse trabalho, utilizou-se, então, de lise alcalina (SDS, pH 12,6) e temperatura elevada (65°C), sem uso de enzima litica.

A Figura 4 mostra os perfis eletroforéticos relativos a R. leguminosarum biovar phaseoli (A) e Bradyrhizobium spp (B), onde se observam, de cima para baixo, banda relativa a DNA plasmídico (somente em A) e banda relativa a DNA cromossômico. Através de elevação da temperatura do tratamento térmico, pode-se reduzir ainda mais a quantidade de DNA cromossômico presente na solução plasmídica (4).

Megaplasnídios com pesos moleculares, variando de 300-500 MDaltons constitue característica comum em espécies de Rhizobium. Admite-se que os genes que determinam funções de nodulação e fixação de nitrogênio (nod, fix) estejam localizados em grandes plasmídeos (sym) em espécies do referido Gênero (SCHOFIELD et alii, 1983; DOWNIE et alii, 1983; KONDOROSI et alii, 1984b). Entretanto, as referidas tentati-

(4)

TSUYMU, S. (Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Shizuoka University - Shizuoka, Japan) Comunicação Pessoal, 1988.

Figura 4: Perfil eletroforético em gel de agarose para DNA plasmidial de R.leguminosarum biovar phaseoli COS(A) e Bradyrhizobium spp (B). Observa-se ausência de banda plasmidial para Bradyrhizobium (B). A eletroforese foi conduzida em gel com pouco aumentado. pl, plasmídio; cr, cromossomo.

vas de isolamento de cccDNA ("closed covalently circular DNA") de bactérias da espécie Bradyrhizobium spp, utilizada no trabalho, através do método citado e de outros (ROSEMBERG et alii, 1982; RODRIGUEZ & TAIT, 1983; PACCOLA - MEIRELLES et alii, 1988), incluindo ultracentrifugação em CsCl-BrEt e eletroforese de campo pulsado (PULSAPHOR System-LKB-BROMA), foram infrutíferas. Sempre que o conteúdo de DNA extraído pelos métodos referidos era submetido à eletroforese em gel de agarose, apenas, uma banda, correspondente ao DNA linear, foi presente, indicando não detecção ou inexistência do cccDNA (DNA plasmídico) ou ainda, que tal DNA havia sido quebrado em pedaços lineares durante os vários passos dos procedimentos extrativos. O presente trabalho utilizou-se, também, de gel com poço aumentado e ponteiras de orifícios largos na tentativa de evitar quebras do DNA circular nas várias operações do método. Há que se salientar, também, que a migração de uma molécula é inversamente proporcional ao seu coeficiente friccional (dependente do tamanho e forma da molécula) e que, devido a isso, a análise eletroforética do DNA pode ser complicada pela variedade de conformação que uma molécula pode assumir. Sob condições eletroforéticas usuais, a mobilidade relativa das três formas de DNA pode ser, assim, acompanhada, segundo a velocidade de migração: forma linear > forma circular fechada > forma circular aberta.

Em espécies de Bradyrhizobium não tem sido possível detectar-se a presença de megaplasmídios através dos métodos até então utilizados, admitindo-se que os genes responsáveis pela nodulação e fixação de N_2 nessas espécies estejam localizados no cromossomo (LAMB & HENNECKE, 1986; EBELING et alii, 1987; NIEUWKOOP et alii, 1987).

4.6.- Extração do DNA cromossômico de Bradyrhizobium e reação de Ligação dos DNAs.

O método de isolamento de DNA total de Bradyrhizobium spp utilizado, constituiu-se numa modificação do método de RODRIGUEZ & TAIT (1983), diferindo-se, principalmente, na etapa de lise celular. Foi, assim, possível a extração de 50 ug de DNA a partir de 80 ml de cultura de células, quantidade considerada razoável. Os métodos comumente utilizados para determinação da concentração de DNA envolvem o uso de espectroscópio de absorção em U.V. As bases nitrogenadas em dupla fita de DNA exibem uma absorção máxima a 260 nm. Utilizando-se o fator de conversão $A_{260}=1=50 \text{ ug/ml}$ pode-se estimar a concentração de DNA da solução.

Após extração do DNA cromossômico de Bradyrhizobium e do plasmídeo pUC119 de E.coli, procedeu-se a digestão com as endonucleases de restrição Sau 3AI e Bam HI, respectivamente. Essas enzimas, consideradas do tipo II, apresentam sítios de reconhecimento compostos de 4(GATC) e 6 (GGATCC) pares de bases, para a Sau 3AI e Bam H.I, respectivamente. Ambas as enzimas, portanto, produzem fragmentos de DNA com idênticos finais coesivos 5' os quais podem se ligar. Assim, os fragmentos de DNA de Bradyrhizobium de 10 a 20 Kb puderam ser clonados no vetor pUC 119. Considera-se que fragmentos de DNA de 10-20 Kb permitam eficiência de transformação e codificação de informações genéticas detectáveis.

Na construção de um banco gênico de DNA cromossômico é desejável otimizar a formação de moléculas recombinantes. Pré-tratamento do vetor de clonagem digerido, com fosfatase alcalina constitui uma tentativa desta otimização. Tal enzima converte o fosfato terminal 5' do fragmento de DNA para uma hidroxila terminal 5'. Uma vez que DNA ligase requer a presença de um fosfato terminal 5', finais coesivos podem recircularizar, mas não se ligar na ausência do mesmo. Este tratamento foi, então, utilizado antes da reação de ligação, para prevenir recirculação do DNA do plasmídeo vetor após a clivagem pela enzima de restrição. O plasmídeo finalmente ligado foi utilizado para transformação em E.coli.

4.7.- TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

O procedimento utilizado para transformação do plasmídeo híbrido, originalmente reportado por MANDEL & HIGA (1970), envolveu exposição das células a uma solução hipotônica de cloreto de cálcio a 0°C, provocando o aparecimento de grandes poros na parede celular. O DNA adicionado à mistura de transformação forma, então, um complexo de fosfato de cálcio-hidroxila que adere à superfície da célula, impedindo a ação de DNases. Este complexo foi absorvido pelas células induzidas por um breve choque térmico de 42°C. Os transformantes foram, assim obtidos a uma frequência da ordem de 10^{-6} . Se considerar que 10^8 células competentes foram expostas à solução de DNA a uma frequência de transformação de 10^6 , então, aproximadamente 100 dessas células foram transformadas em uma placa. Assim, em meio aos transformantes, grande quantidade de células não transformadas iniciaram crescimento ("CROSSFEEDING", RODRIGUEZ & TAIT, 1983). Por isso, as colônias desenvolvidas em meio seletivo foram replicadas duas vezes para o referido meio de cultura. Esta é uma questão que deve ser considerada na seleção de transformantes, principalmente em espécies de crescimento lento.

Transformação genética em Rhizobium e Bradyrhizobium seria a via mais direta de transferência intra e inter-

respecífica de DNA. Contudo pouca ou nenhuma frequência de transformação tem sido obtida nesses gêneros (BALASSA, 1963; O'GARA & DUNICAN, 1973; BULLERJAHN & BEZINGER, 1982). Assim, DNA desses gêneros tem sido clonado em E.coli apesar de tais genes ter pouca ou nenhuma expressão nesta enterobactéria.

4.7.1.- Plasmídio Vetor de Clonagem

O vetor utilizado foi o plasmídio pUC 119, com um tamanho estimado em 3,2 Kb (VIEIRA & MESSING, 1987). Tal plasmídio é uma modificação do pBR322, contendo o gene para resistência à ampicilina e um sítio de poliligação similar àquele dos vetores M13 (DAVIS et alii, 1986). Inclui-se, também, no pUC 119, o final 5' do gene lac Z de E.coli o qual é interrompido pela inserção dos fragmentos clonados no sítio polilinker (Inativação insercional). O referido plasmídio apresenta origem de replicação tipo Col E 1 do pBR322 o qual não pode se replicar em Rhizobium.

O plasmídio híbrido resultante deste trabalho foi esquematizado e ilustrado na Figura 6, onde verifica-se o local de inserção do fragmento de DNA cromossomal de Bradyrhizobium spp, de 10-20 Kb; E.coli HB101 foi utilizada como hospedeiro plasmidial, principalmente por não apresentar o sistema de restrição K-12 o qual poderia inativar fragmentos de DNA exógeno.

4.7.2.- Banco Genômico de Bradyrhizobium

Foi construído um banco genômico, plasmídico, representando o DNA total de um isolado natural de Bradyrhizobium spp, espécie capaz de nodulação em Neonotonia wightii (soja perene), e em algumas outras leguminosas forrageiras tropicais (tipo "cowpea"). O DNA celular total da referida espécie de bactéria foi clonado em pUC 119, como uma coleção de fragmentos de restrição Sau 3AI. Fragmentos de 10-20 Kb foram, então, ligados ao pUC 119. Assumindo-se que o peso molecular dos fragmentos inseridos seja, em média 19 Kb e que o peso molecular do genoma de Rhizobium seja, aproximadamente, o mesmo que o de E. coli, 4200 Kb, CLARKE & CARBON (5) citados por DITTA et alii (1980) calcularam que haveria 98% de chance que uma determinada sequência de DNA estivesse representada neste banco e o número de recombinantes, segundo os referidos autores, poderia ser calculado através da expressão: $N = \ln(1-p) / \ln(1-f)$; onde N, número de transformantes; p=probabilidade de uma certa sequência ser representada entre os recombinantes e f, tamanho médio dos fragmentos de restrição como uma fração do tamanho total do genoma. Assim calcu-

----- (5)

CLARKE, L. & CARBON, J. Cell, Cambridge, 9:91-9, 1976.

lado, à, aproximadamente, cada 10^3 recombinantes, isto é, diferentes fragmentos de restrição clonados, ter-se-ia representado, pelo menos, um fragmento da região "nod". Nesse particular, JAGADISH & SZALAY (1984) trabalhando com Bradyrhizobium spp verificaram que fragmentos de DNA de aproximadamente 12 Kb contiveram uma quantidade de genes necessários para expressão da fixação simbiótica de N_2 . Em K.pneumoniae, uma enterobactéria fixadora de nitrogênio, um grupo de 15 genes, contidos em 24 Kb de DNA, foram requeridos para fixação de N_2 (RIEDEL et alii, 1979). Mesmo em Rhizobiaceae, um maior número de genes podem ser necessários. Inserções maiores, obviamente, aumentam a probabilidade de preservação de funções gênicas intactas bem como reduzem o número absoluto de clones representantes do banco genômico, porém, pode-se diminuir grandemente a eficiência de transformação.

Figura 5: Diagrama do plasmídeo pUC119 (VIEIRA & MESSING, 1987), indicando, entre outros, os sítios de restrição da enzima Bam HI e de inserção do fragmento de DNA Sau 3AI de Bradyrhizobium spp dentro da região lac.

Esse banco genômico foi construído para, posteriormente, proceder-se hibridização de colônia (Hibridização tipo Southern) e seleção de clones homólogos a um fragmento Hind III de 14 Kb contido no pKT240 (6), carregando uma sequência nod de R.leguminosarum biovar trifolii. Nesse particular, FISHER et alii (1985) verificaram que genes para nodulação em R.meliloti foram funcionalmente substituídos por um fragmento nod de R.leguminosarum biovar trifolii e vice-versa. Sugeriram, inclusive, que tais genes devam representar funções comuns de nodulação e especularam a existência de uma relação alélica entre genes nod em espécies de Rhizobium.

Torna-se importante salientar que através de bancos genômicos, vem sendo possível identificarem-se genes nif e nod em diversas espécies de Rhizobium (DITTA et alii, 1980; KAHN & TIMBLIN, 1984; SCHOFIELD et alii, 1987).

----- (6)

SHOHNO, K. (Department of Pure and Applied Sciences, College of Arts and Sciences, University of Tokyo-Tokyo/Japan). Comunicação Pessoal, 1987.

4.8.- CONJUGAÇÃO BACTERIANA TRIPARENTAL

Através da utilização de um sistema plasmidial binário (pSUP 5011+pRK 2013) foi obtida uma frequência de transferência do plasmídeo pSUP 5011:: Tn5 mob⁺ de *E.coli* S17 para *R.leguminosarum* biovar *phaseoli* COS met⁻ da ordem de $0,4.10^{-5}$. Os transconjugantes foram selecionados em canamicina, marca seletiva para o transposon Tn5, pois os demais plasmídios não apresentam origem de replicação em *Rhizobium*. Apesar da alta taxa de auto-transmissibilidade previamente obtida para o plasmídeo auxiliador (helper) pRK2013 em *E.coli* (DITTA et alii, 1980), este mostra relativamente baixa taxa de transferência para *Rhizobium*. Tal fato, presumivelmente, reflete a estreita amplitude hospedeira do replicon Col E1 e a incapacidade do pRK2013 estabelecer-se estavelmente em um organismo não relacionado à *E.coli*. O plasmídeo pRK2013 (helper) consiste dos genes de transferência (tra⁺) RK2 clonado no replicon Col E1, cuja única função no sistema foi trans complementar o vetor de mobilização (mob⁺) pSUP 5011. Complementação em trans bem como, incompatibilidade do plasmídeo pRK 2013 foram discutidas por FIGURSKI & HELINSKI (1979).

O plasmídeo pSUP 5011::Tn5 mob⁺ mostrou considerável frequência de transferência para *Rhizobium*. Uma im-

portante característica do sistema plasmídico binário constitui-se na não necessidade da presença dos dois plasmídios juntos na mesma célula, no início da transferência, para uma eficiente mobilização. Assim, conjugação triparental tem sido eficiente em promover transferência.

O sistema plasmídico binário pode facilitar significativamente análises genéticas de DNAs clonados em organismos nos quais sistemas de transformação não podem facilmente ser estabelecidos. Espécies de Rhizobium têm sido altamente refratárias à transformação convencional por fragmentos de DNA. Transferência conjugal de DNA clonado pode ser viabilizada em espécies de Rhizobium através da utilização desse sistema plasmídico.

5. Conclusões

- Introdução do elemento transponível Tn5 em R. leguminosarum biovar phaseoli C05, como agente de mobilização genômica, assim como radiação U.V., possibilitaram o aparecimento de mutação auxotrófica.
- Baixa frequência de obtenção de mutantes auxotróficos, física ou biologicamente induzidos, dificultou a marcação genética de células de Rhizobium e Bradyrhizobium pela referida mutação.
- Elevado nível de resistência intrínseca a antibióticos verificado para a estirpe de Bradyrhizobium utilizada, dificultou a utilização desse marcador genético em transferência com E. coli.
- Lise de parede celular em Rhizobium e Bradyrhizobium foi conseguido com sucesso através da utilização de um desestabilizador de parede (glicina) anterior à ação da enzima lítica.

- A espécie de Bradyrhizobium utilizada não apresentou megaplasmídios ou os mesmos não foram passíveis de detecção pelos diferentes métodos disponíveis.
- Através de isolamento e clonagem do DNA total de Bradyrhizobium sp no vetor pUC119, foi possível construir-se um banco genômico da referida espécie em E. coli HB101.
- Utilizando-se de um sistema plasmídico binário, onde o vetor de mobilização foi "trans" complementado por um outro de funções "tra", pode-se promover transferência genética de E. coli S17 para R. leguminosarum biovar phaseoli C05, em conjugação triparental.

6.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, T.H. & CHELM, B.K., Effects of oxygen levels on the transcription of *nif* and *gln* genes in Bradyrhizobium japonicum. J.Gen.Microbiol., London, 134:611-8, 1988.
- AHMAD, M.H.; EAGLESHAM, A.R.J.; HASSOUNA, S.; SEAMAN, B.; AYANABA, A.; MULONGOY, K.; PULVER, E.L. Examining the potencial for inoculant use with cowpeas in west african soils. Trop.Agric., Trinidad, 58: 325-35, 1981.
- ALI, H.; BÉCHET, M.; NIEL, C.; GUILAUME, J.B., Rhizobium meliloti Tn5 induced auxotrophic mutants responding to different biosynthetic intermediates. Can.J.Microbiol., Ottawa, 30:507-11, 1984

- BALASSA, G. Genetic transformation of Rhizobium. Bacteriol. Rev., Baltimore, 27:228-41, 1963.
- BANFALVI, Z.; SAKANYAN, V.; KONCZ, C.; KISS, A.; DUSHA, L.; KONDOROSI, A. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of P.meliloti. Mol.Gen.Genet., Berlin, 194:318-25, 1981.
- BARBOUR, W.M.; MATHIS, J.N.; ELKAN, G.H., Evidence for plasmid-and chromosome - borne multiple nif genes in Rhizobium fredii. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 50:41-4, 1985.
- BERG, D.E.; WEISS, A.; CROSSLAND, L., Polarity of Tn5 insertion mutations in Escherichia coli. J.Bacteriol., Baltimore,, 142: 439-46, 1980.
- BERINGER, J.E. R factor transfer in Rhizobium leguminosarum. J.Gen.Microbiol., London, 84:188-98, 1974.
- BERINGER, J.E.; BEYNON, J. L.; BUCHANAN-WOLLASTON, A. V.; JOHNSTON, A.W.B. Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to Rhizobium. Nature, London, 276:633-4, 1978.

- BERRY, J.O. & ATHERLY, A.G. Spheroplasts of Rhizobium japonicum. Can.J.Microbiol., Ottawa, 30:415-9, 1984.
- BEYNON, J.L.; BERINGER, J.E.; JOHNSTON, A.W.B. Plasmid and host range in Rhizobium leguminosarum and Rhizobium phaseoli. J.Gen.Microbiol., London, 120: 421-9, 1980.
- BOLIVAR, F. & BACKMAN, K. Plasmids of Escherichia coli as cloning vectors. Methods Enzymol., New York, 68:245-55, 1979.
- BOUCHER, C.; BERGERON, B.; BERTALMIO, M.B.; DNARIE, J. Introduction of bacteriophage Mu into Pseudomonas solanacearum and Rhizobium meliloti using the R factor RP4. J.Gen Microbiol., 98: 253-63, 1977.
- BREWIN, N. J.; BERINGER, J.C.; BUCHAMAN-WOLLASTON, A. V.; JOHNSTON, A.W.B.; HIRSCH, P.R. Transfer to symbiotic genes with bacteriocinogenic plasmid in Rhizobium leguminosarum. J.Gen.Microbiol., London, 116:216-70, 1980b.
- BREWIN, N.J.; JOHNSTON, A.W.B.; BERINGER, J.E. The genetics of Rhizobium. In: STEWART, W.D.P. & GALLON, J.R., ed. Nitrogen fixation. New York, Academic Press, 1980a. p.365-75.

- BREWIN, N.J.; WOOD, E.A.; JOHNSTON, A.W.B.; DIBB, N.J.; HOMBRECHER, G. Recombinant nodulation plasmid in Rhizobium leguminosarum. J.Gen Microbiol., London, 128: 1817-27, 1982.
- BREWIN, N.H.; WOOD, E.A.; YOUNG, J.P.W. Contribution of the symbiotic plasmid to the competitiveness of Rhizobium leguminosarum. J.Gen.Microbiol., London, 129:2973-7, 1983.
- BROUGHTON, W.J.; HEYCKE, N.; HEINER-MEYER, Z.A.; PSNKHURST, C.E. Plasmid-linked nif and nod genes in fast growing rhizobia that nodulate Glycine max Psophocarpus tetragonolobus, and Vigna unguiculata. Proc.Natl. Acad. Sci., Washington, 81:3093-7, 1984.
- BRUSSEL, A.A.N. van; ZAAT, S.A.J.; CANTER-CREMERS, H.C.J.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E.; TAK, T.; LUGTENBERG, B.J.J. Role of plant exudate and "sym" plasmid-localized nodulation genes in the synthesis by Rhizobium leguminosarum of Tsr factor, which causes thick and short roots on common vetch. J. Bacteriol., Baltimore, 165: 517-22, 1986.

- BUCHANAN-WOLLASTON, A.V.; BERINGER, J.E.; BREWIN, N.J.; HIRSCH, P.R.; JOHNSTON, A.W.B. Isolation of symbiotically defective mutants in Rhizobium leguminosarum by insertion of the transposon Tn5 into a transmissible plasmid. Mol. Gen. Genet., New York, 178:185-90, 1980.
- BULLERJAHN, G.S.; & BENZINGER, R.H. Genetic transformation of Rhizobium leguminosarum by plasmid DNA. J. Bacteriol., Baltimore, 150:421-4, 1982.
- CASADABAN, M.J.; CHOU, J.; COHEN, S.N. In vitro, gene fusions that join an enzymatically active B-galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: Escherichia coli plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. J. Bacteriol., Baltimore, 143:971-80, 1980.
- CASSE, F.; BOUCHER, C.; JULLIOT, J.S.; MICHEL, m.; DENARIE, J. Isolation and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis. J. Gen. Microbiol., London, 113:229-42, 1979.

- CEN, Y.; BENDER, G.L.; TRINICK, M.J.; MORRISON, N.A.; SCOTT, K.F.; GRESSHOFF, P.M.; SHINE, J.; ROFE, B.G. Transposon mutagenesis in rhizobia which can nodulate both legumes and the nonlegume Parasponia. Appl. Environ Microbiol., Baltimore, 43: 233-6, 1982.
- CHRISTENSEN, A.J. & SCHUBERT, K.R. Identification of a Rhizobium trifolii plasmid coding for nitrogen fixation and nodulation genes and its interaction with pJB5JI, a Rhizobium leguminosarum plasmid. J. Bacteriol., Baltimore, 156: 592-9, 1983.
- COETZEE, J. N.; SIRGEL, F. A.; LECATSAS, G. Genetic recombination in fused spheroplasts of Providencia alcalifaciens. J.Gen.Microbiol., London, 114: 313-22, 1979.
- COHEN, S.N. The Manipulation of genes. Sci. Am., New York, 233:24-33, 1975.
- COOPER, T.G. Protein purification. In_____. The tools of Biochemistry. New York, J.Willey & Sons, 1977. p. 355-404.
- CORBIN, D.; BARRAN, L.; DITTA, G. Organization and expression of Rhizobium meliloti nitrogen fixation genes. Proc. Natl. Acad. Sci., WASHINGTON, 80: 3005-9, 1983.

- CORBIN, D.; DITTA, G.; HELINSKI, D.R. Clustering of nitrogen fixation ("nif") genes in Rhizobium meliloti. J.Bacteriol. Baltimore, 149:221-8, 1982.
- DATTA, N. & HEDGES, R.W. Host range of R factors. J.Gen. Microbiol., London 70:453-60, 1972.
- DAVIS, J.G.; DIBNER, M.D.; BATTEY, J.F. Methods in molecular biology. New York, Elsevier, 1986.
- De JONG, T.M.; BREWIN, N.J.; JOHNSTON, A.W.B., PHILLIPS, D.A. Improvement of symbiotic properties in Rhizobium leguminosarum by plasmid transfer. J.Gen.Microbiol., London, 128:1829-38, 1982.
- DIRIENZO, J.M.; NAKAMURA, K.; INOUE, M. The outer membrane proteins: biosynthesis, assembly, and functions. Ann. Rev. Biochem., Palo Alto, 47:481-532, 1978.
- DITTA, G.; STANFIELD, S.; CORBIN, D.; HELINSKI, D.R. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of Rhizobium meliloti. Proc. Natl. Acad. Sci., WASHINGTON, 77:7347-51, 1980.

- DITTA, G.; VIRTIS, E.; PALOMARES, A. & KIM, C.H. The "nif" A gene of Rhizobium meliloti is oxygen regulated. J.Bacteriol., Baltimore, 169:3217-23, 1987.
- DIXON, R.; KENNEDY, C.; MERRICK, M. Genetic control of nitrogen fixation. In: GLOVER, S.W. & HOPWOOD, D.A. ed Genetic as a tool in microbiology. Cambridge, Cambridge University Press, 1981. p. 161-85.
- DJORDJEVIC, M.A.; ZURKOWSKI, W. & ROLFE, B. Plasmids and stability of symbiotic properties of Rhizobium trifolii. J.Bacteriol., Baltimore, 151:560-8, 1982.
- DJORDJEVIC, M.A.; ZURKOWSKI, W.; SHINE, J.; ROLFE, B.G. Sym plasmids transfer to various symbiotic mutants of Rhizobium trifolii, R.leguminosarum and R.meliloti. J.Bacteriol., Baltimore, 156:1035-45, 1983.
- DOWNIE, J.A.; HOMBRECHER, G.; MA, Q.S.; KNIGHT, C.D.; WELLS, B; JOHNSTON, W.B. Cloned nodulation genes of Rhizobium leguminosarum determine Host-Range Specificity. Mol.Gen. Genet., Berlin, 190:359-65, 1983.

- EBELING, S.; HAHN, M.; FISCHER, H.M.; HENNECKE, H.
Identification of "nif"E-, "nif"N- and "nif"S-like genes
in Bradyrhizobium japonicum. Mol.Gen.Genet., Berlin,
207:503-8, 1987.
- ECKAHADT, T. A rapid method for the identification of plasmid
deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid, New York,
1:584-8, 1978.
- ELY, B. & CROFT, R.H. Transposon mutagenesis in Caulobacter
crescentus. J. Bacteriol., Baltimore, 149:620-5, 1982.
- EMERICH, D. W.; RUIZ-ARGUESO, T.; CHING, TT.M.; EVANS, H.J.
Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation
in Rhizobium japonicum bacteroids. J.Bacteriol.,
Baltimore, 137:153-60, 1979.
- FIGURSKI, D.H. & HELINSKI, D.R. Replication of an origin-
containing derivative of plasmid RK2 dependent on a
plasmid function provided in "trans". Proc.Natl.Acad.Sci.
Washington, 76:1648-52, 1979.
- FISHER, R.F.; TU, J.K.; LONG, S.R. Conserved nodulation genes
in Rhizobium trifolii. Appl. Environ. Microbiol.,
Baltimore, 49:1402-5, 1985.

FORRAI, T.; VINCZE, E.; BANFALVI, Z.; KISS, G.B.; RANDHAWA, G.S.; KONDOROSI, A. Localization of symbiotic mutations in Rhizobium meliloti, J. Bacteriol., Baltimore, 153:635-43, 1983.

FUHRMANN, M.; FISCHER, H.M.; HENNECKE, H. Mapping of Rhizobium japonicum "nif" B-, "fix" BC- and "fix" A-like genes and identification of the "fix" A promoter. Mol. Gen. Genet., Berlin, 199:315-22, 1985.

GRINDLEY, N.D.F. & REED, R.R. Transpositional recombination in prokaryotes. Ann. Rev. Biochem., Palo Alto, 54:863-96, 1985.

GROSS, D.C.; VIDAVER, A.K.; KLUGAS, R.V. Plasmids, biological properties and efficacy on nitrogen fixation in Rhizobium japonicum strains indigenous to alkaline soils. J. Gen. Microbiol., London, 114:257-66, 1979.

HAHN, M. & HENNECKE, H. Localized mutagenesis in Rhizobium japonicum. Mol. Gen. Genet., Berlin, 192:46-52, 1984.

HAHN, M. & HENNECKE, H. Mapping of a Bradyrhizobium japonicum DNA region carrying genes for symbiosis and an asymmetric accumulation of reiterated sequences. App. Environ. Microbiol., Baltimore, 53:2247-52, 1987a.

- HAHN, M. & HENNECKE H. Conservation of a symbiotic DNA region in soybean root nodule bacteria. Appl. Environ. Microbiol. Baltimore, 53:2253-5, 1987b.
- HAHN, M. & HENNECKE H. Cloning and mapping of a novel nodulation region from Bradyrhizobium japonicum by genetic complementation of a deletion mutant. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 54:55-61, 1988.
- HENNECKE, H.; ALVAREZ-MORALES, A.; BETANCOURT-ALVAREZ, M.; EBELING, S.; FILSER, M.; FISCHER, H.M.; GLUBER, M.; HAHN, M.; KALUZA, K.; LAMB, J.W.; MEYER, L.; REGENSBURGER, B.; STUDER, D.; WEBER, J. Organization and regulation of symbiotic nitrogen fixation genes from Bradyrhizobium japonicum. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.J. & NEWTON, W.E, eds. Nitrogen fixation research progress, Dordrecht, Nijhoff Publishers, 1985, p:157-163.
- HILL, S. & KAVANAGH, E.P. Roles of "nif" F and "nif" J gene products in electron transport to nitrogenase in K.pneumoniae. J.Bacteriol., Baltimore, 141:470-5, 1980.
- HIRSCH, P.R. Plasmid-determined bacteriocin production by Rhizobium leguminosarum. J.Gen.Microbiol., London, 113:219-28, 1979.

HIRSCH, A.M.; BANG, A.; AUSUBEL, F.M. Ultra-structural analysis of infective alfalfa nodules formed by "nif" Tn5 mutants of Rhizobium meliloti. J.Bacteriol., Baltimore, 155:367-80, 1983.

HIRSCH; VAN MONTAGU, M.; JOHNSTON, A.W.B.; BREWIN, N.J.; SCHELL, J. Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmid in strains of Rhizobium leguminosarum. J.Gen.Microbiol., London, 120:403-12, 1980.

HOM, S.S.M.; NOVAK, P.D.; MAIER, R.J. Transposon Tn5-generated Bradyrhizobium japonicum mutants unable to grow chemoautotrophically with H₂. Appl.Environ Microbiol., Baltimore, 54:358-63, 1988.

HOMBRECKER, G.; BREWIN, N.J.; JOHNSTON, A.W.B. Linkage of genes for nitrogenase and nodulation ability on plasmid in Rhizobium leguminosarum and R.plaseoli. Mol.Gen.Genet., Berlin, 182:133-6, 1981.

HOOPYKAAS, P. J. J.; BRUSSEL, A.A.N. van; DULKRAS, H.den; SLOGTEREN, G.M.S.van; SCHILPEROORT, R.A. Sym plasmid of Rhizobium trifolii expressed in different rhizobial species and Agrobacterium tumefasciens. Nature, London, 291:351-3, 1981.

INNES, R.W.; KUEMPEL, P.L.; PLAZINSKI, J.; CANTER-CREMERS, H.; ROLFE, B.G.; DJORDJEVIC, M.A. Plant factors induce expressions of nodulation and host-range genes in Rhizobium trifolii. Mol.Gen.Genet., Berlin, 201:426-32, 1985.

JAGADISH, M.N. & SZALAY, A.A. Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation in slow-growing, broad host range, cowpea Rhizobium. Mol.Gen.Genet. Berlin, 196:290-300, 1984.

JARVIS, W.L.; SCOTT, K.F.; HUGHES, J.E.; DJORDJEVIC, M.; ROLFE, B.G.; SHINE, J. Conservation of genetic information between different Rhizobium species Can.J. Microbiol., Ottawa, 29:200-9, 1983.

JOCELYN, P.C. Biochemistry of the SH group. New York, Academic Press, 1972. 396p.

JOHNSTON, A.W.B. & BERINGER, J.E. Chromosomal recombination between Rhizobium species. Nature, London, 267:611-3, 1977.

- LONG, S.R.; MEAD, H. M.; AUSUBEL, F.M. Use of transposon mutagenesis in the molecular genetic analysis of symbiotic nitrogen fixation. Microbiol., New York, 50: 89-92, 1981.
- JOHNSTON; BEYNON, J.C.; BUCHANAN-WOLLASTON, A.V.; SETCHELL, S.N.; HIRSCH, P.R.; BERINGER, J.E. High frequency transfer of nodulation ability between strains and species of Rhizobium. Nature, London, 276:635-6, 1978.
- JORDAN,D.C. On the cytology and synthetic capabilities of natural and artificially produced bacteroids of Rhizobium leguminosarum. Can.J.Microbiol., Ottawa, 11:709-20, 1965.
- JORDAN,D.C. Rhizobiaceae. In: KRIEG, N.R., ed. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. v.1, p.234-56.
- KADO, C.L. & LIU, S.T. Rapid procedure for detection of large and small plasmids. J.Bacteriol., Baltimore, 145:1365-73, 1981.
- KAHN, M.L. & TIMBLIN, C.R. Gene fusion vehicles for the analysis of gene expression in Rhizobium meliloti. J.Bacteriol., Baltimore, 158:1070-7, 1984.

- KALUZA, H.; HAHN, M.; HENNECKE, H. Repeated sequences similar to insertion elements clustered around the "nif" region of the Rhizobium japonicum genome. J.Bacteriol., Baltimore, 162:535-42, 1985.
- KENNEDY, C. Linkage map of the nitrogen fixation (nif) genes in Klebsiella pneumoniae. Mol.Gen.Genet., Berlin, 157:199-204, 1977.
- KERPPOLA, T.K. & KAHN, M.L. Symbiotic phenotypes of auxotrophic mutants of Rhizobium meliloti 104A14. J.Gen.Microbiol., London., 134:913-9, 1988.
- KISS, G.B. & KALMAN, Z. Transformation of Rhizobium meliloti 41 with plasmid DNA. J.Bacteriol., Baltimore, 150:465-70, 1982.
- KONDOROSI, E.; BANFALVI, Z.; KONDOROSI, A. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of Rhizobium meliloti; identification of nodulation genes. Mol.Gen.Genet. Berlin, 193:445-52, 1984a.
- KONDOROSI, A; KISS, G.B; DUSHA, D. Plasmids governing symbiotic nitrogen fixation. In: SUBBA RAO, N.S., ed. Current developments in biological nitrogen fixation. New Delhi, I.B.H. Publishing, 1984b. p.135-71.

KONDOROSI, A.; KONDOROSI, E.; PANKHURST, C.E., BROUGHTON, W.J.; BANFALVI, Z. Mobilization of Rhizobium meliloti megaplasmid carrying nodulation and nitrogen fixation genes into other rhizobia and Agrobacterium. Mol. Gen. Genet., Berlin, 188:433-9, 1982.

KROL, A.J.M.; MONTELEZ, J.G.L.; VAN KAMNEN, A. Only one of the large plasmids in Rhizobium leguminosarum strains PRE is strongly expressed in the endosymbiotic state. J.Gen. Microbiol., London, 128:1839-47, 1982.

LAMB, J.W. & HENNECKE, H. In Bradyrhizobium japonicum the common nodulation genes "nod"ABC, are linked to "nif"A and "fix"A. Mol.Gen.Genet., Berlin, 202:512-7, 1986.

LANG-UNNASCH, N. & AUSUBEL, F.M. Nodule-specific polypeptides from effective alfalfa root nodules and from ineffective nodules lacking nitrogenase. Plant Physiol., Lancaster, 77:803-9, 1985.

LEHNINGER, A.L. Biochemistry, the molecular basis of cell structure and function. New York, Worth Publishers, 1975. 312p.

LEONG, S.A.; DITTA, G.S.; HELINSKI, D.R. Heme biosynthesis in Rhizobium; identification of a cloned gene coding for aminolevulinic acid synthetase from Rhizobium meliloti. J.Biol.Chem., Baltimore, 257:8724-30, 1982.

LONG, S.R. Genetic advances in the study of Rhizobium nodulation. In: J.K. SETLOW & A. HOLLAENDER, ed Genetic engineering; principles methods., New York, Plenum, 1986, v.8, p.135-50.

MACKENZIE, C.R.; VAIL, W.J.; JORDAN, D. C. Ultrastructure of free living forms of Rhizobium meliloti as reveled by free-etching. J. Bacteriol., Baltimore, 113:387-93, 1973.

MacNEIL, T.; MacNEIL, D.; ROBERTS, G.R.; SUPIANO, M.A.; BRILL, W.J. Fine-structure mapping and complementation analysis of "nif" (nitrogen-fixation) gene in Klebsiella pneumoniae. J.Bacteriol. Baltimore, 136:253-66, 1978.

MANDEL, M. & HIGA, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J.Mol.Biol., London, 53:159-62, 1970.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. Molecular cloning;
a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor
Laboratory, 1982. 545p.

MARVEL, D.J.; KULDAU, G.; HIRSCH, A.; RICHARDS, E.; TORREY,
J.G.; AUSUBEL, F.M. Conservation of nodulation genes
between Rhizobium meliloti and a slow-growing Rhizobium
strain that nodulates a nonlegume, host. Proc. Natl. Acad.
Sci, Washington, 82:5841-5, 1985.

MASTERSON, R.V.; PRAKASH, R.K.; ATHERLY, A.G. Conservation of
symbiotic nitrogen fixation genes sequences in Rhizobium
japonicum and Bradyrhizobium japonicum. J. Bacteriol.,
Baltimore, 163: 21-6, 1985.

MASTERSON, R.V.; RUSSELL, P.R.; ATHERLY, A.G. Nitrogen-
fixation (nif) genes and large plasmids of Rhizobium
japonicum. J. Bacteriol., Baltimore, 152:928-31, 1982.

MEADE, H.M.; LONG, S.R.; RUVKUN, G.B.; BROWN, S.E.; AUSUBEL,
F.M. Physical and genetic characterization of symbiotic
and auxotrophic mutants of Rhizobium meliloti induced by
transposon Tn-5 mutagenesis. J. Bacteriol., Baltimore,
149:114-22, 1982.

- MULLIGAN, J.T. & LONG, S.R. Induction of Rhizobium meliloti "nod" C. Proc.Natl.Acad.Sci., Washington, 28:6609-13, 1985.
- MUNNS, D.H. & KEYSER, H.H. Response of Rhizobium strains to acid and aluminium stress. Soil Biol.Biochemistry, Oxford, 13:115-8, 1981.
- NAUTIYAL, C.S.; HEGDE, S.V.; BERKUM, P.van. Nodulation, nitrogen fixation and hydrogen oxidation by pigeon pea Bradyrhizobium spp in symbiotic association with pigeon pea, cowpea, and soybean. Appl.Environ.Microbiol., Baltimore, 54:94-7, 1988.
- NIEUWKOOP, A.J.; BANFALVI, Z.; DESHMANE, N.; DESHMANE, D.; GERHOLD, D.; SCHELL, M.G.; SIROTKIN, K.M.; STACEY, G. A locus encoding host range is linked to the common nodulation genes of Bradyrhizobium japonicum. J.Bacteriol., Baltimore, 169:2631-8, 1987.
- NORRIS, D.O. & DATE, R.A. Legume bacteriology. In: TROPICAL pasture research principles and methods. Slough, Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, 1976. p. 134-74. (CAB Bulletin, 51).

NUTTI, M.P. The large plasmids of Rhizobia; current status of their involvement in the expression of symbiotic functions. In: GIBSON, A.A. & NEWTON, W., ed. Current perspectives in nitrogen fixation. Canberra, Australian Academy of Sciences, 1981. p.167-8

NUTTI, M.P.; LEDEBOER, A.M.; LEPIDI, A.A. & SCHILPEROORT, R.J. Large plasmid in different Rhizobium species. J.Gen. Microbiol., London, 100:241-8, 1977.

NUTTI, M.P.; LEPIDI, A.A.; PRAKASH, R.K.; SCHILPEROORT, R.A.; CANNON, F.C. Evidence for nitrogen fixation ("nif") genes on indigenous Rhizobium plasmids. Nature, London, 282:533-5, 1979.

O'GARA, F. & DUNICAN, L.K. Transformation and physical properties of R-factor RP4 transferred from Escherichia coli to Rhizobium trifolii. J.Bacteriol., Baltimore, 116:1177-80, 1973.

PAAU, A. S.; BLOCH, C. B.; BRILL, W.J. Developmental fate of Rhizobium meliloti bacteroids in alfalfa nodule. J. Bacteriol., Baltimore, 143: 1480-90, 1980.

- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C. Manual de técnicas eletroforéticas em microorganismos, Piracicaba, FEALQ, 1988. 54p.
- PANKHURST, C.E.; MacDONALD, P.E.; REEVES, J.M. Enhanced nitrogen fixation and competitiveness for nodulação of Lotus pedunculatus by a plasmid-cured derivative of Rhizobium loti. J.Gen.Microbiol., London, 132:2321-8, 1986.
- PEBERDY, J.F. Protoplast fusion a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms Enzyme Microb.Technol., Guildford, 2:23-9, 1980.
- PETERS, N.K.; FROST, J.W.; LONG, S.R. A plant flavone, luteolin, induces expression of Rhizobium meliloti nodulation genes. Science, Lancaster, 233:917-1008, 1986.
- PRAKASH, R.K. & ATHERLY, A.G. Reiteration of genes involved in symbiotic nitrogen fixation by fast-growing Rhizobium japonicum. J.Bacteriol., Baltimore, 160:785-7, 1984.
- PRAKASH, R.K. & ATHERLY, A.R. Plasmids of Rhizobium and their role in symbiotic nitrogen fixation. Int.Rev.Cytol., New York, 104:1-24, 1986.

PRAKASH, R.K. & SCHILPEROORT, R.A. Relationship between "nif" plasmid of fast-growing Rhizobium species and Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens. J. Bacteriol., Baltimore, 149: 1129-37, 1982.

PRAKASH, R.K.; SCHILPEROORT, R.A.; NUTTI, M.D. Large plasmids of fast-growing Rhizobia; homology studies and location of structural nitrogen fixation (nif) genes. J. Bacteriol., Baltimore, 145:1129-36, 1981.

PUHLER, A.; BURKARDT, H.J.; KLIPP, W. Cloning of the entire region for nitrogen fixation from Klebsiella pneumoniae on a multicopy plasmid vehicle in Escherichia coli. Mol. Gen. Genet., Berlin, 176:17-24, 1979.

QUINTO, C.; DE LA VEGA, H.; FLORES, M.; FERNANDEZ, L.; BALLADO, T.; SOBERON, G.; PALACIOS, R. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in Rhizobium phaseoli. Nature, London, 299:724-6, 1982.

REIDEL, G.E.; AUSUBEL, F.M.; CANNON, F.C. Physical map of chromosomal nitrogen fixation (nif) genes of Klebsiella pneumoniae. Proc. natl. Acad. Sci., Washington, 76:2866-70, 1979.

- ROBERTS, G.P.; MacNEIL, T.; MacNEIL, D.; BRILL, W.J.
Regulation and characterization of protein products coded
by "nif" (nitrogen-fixation) genes of Klebsiella
pneumoniae. J.Bacteriol., Baltimore, 136:267-79, 1978.
- RODRIGUEZ, R.L. & TAIT, R.C. Recombinant DNA techniques; an
introduction. London, Addison-Wesley, 1983, 236p.
- ROLFE, R.G.; DJORDJEVIC, M.; SCOTT, K.F.; HUGHES, J.E.;
BADENOCH-JONES, J.; GRESSHOFF, P.M.; CEN, Y.; DUDMAN, W.F.
ZURKOWSKI, W.; SHINE, J. Analysis of the nodule forming
ability of fast-growing Rhizobium strains. In: GIBSON,
A.A. & NEWTON, W.E., ed. Current perspectives in nitrogen
fixation. Canberra, Australian Academy of Sciences, 1981.
p.142-5.
- ROLFE, B.G.; GRESSHOFF, P.M.; SHINE, J. Rapid screening for
symbiotic mutants of Rhizobium and white clover. Plant Sci.
Letters., Amsterdam, 19:277-84, 1980.
- RONSON, C.W.; ASTWOOD, P.M.; DOWNIE, J.A. Molecular cloning
and genetic organization of C₄-dicarboxylate transport
genes from Rhizobium leguminosarum. J.Bacteriol.,
Baltimore, 160:903-9, 1984.

ROSEMBERG, C.; BOISTARD, P.; DENARIE, J. & CASSE-DELBART, F.
Genes controlling early and late functions in symbiosis
are located on a megaplasmid in Rhizobium meliloti. Mol.
Gen.Genet., Berlin, 184:325-33, 1981.

ROSEMBERG, C.; CASSE-DELBART, F.; DUSHA, I.; DAVID, M.;
BOUCHER, C. Megaplasms in the plant-associated bacteria
Rhizobium meliloti and Pseudomonas solanacearum.
J.Bacteriol., Baltimore, 150:402-6, 1982.

ROSTAS, K.; SISTA, P.R.; STANLEY, J.; VERMA, D.P.S.
Transposon mutagenesis of Rhizobium japonicum, Mol.Gen.
Genet., Berlin, 197:230-5, 1984.

RUIZ-SAINZ, J.E.; CHANDLER, M.R.; JIMENEZ-DIAS, R.; BERINGER,
J.E. Transfer of a host range plasmid from R.leguminosarum
to fast-growing bacteria that nodulate soybeans. J.Appl.
Bacteriol., Reading, 57:309-15, 1984.

RUVKUN, G.B. & AUSUBEL, F.M. Interspecific homology of
nitrogenase genes. Proc. Nat.Acad.Sci., Washington,
77:191-5, 1980.

RUVKUN, G.B. & AUSUBEL, F.M. A general method for site-
directed mutagenesis in prokaryotes. Nature, London,
289:85-9, 1981.

SCHOFIELD, P.R.; DJORDJEVIC, M.A.; ROLFE, B.G.; SHINE, J. A.
Molecular linkage map of nitrogenase and nodulation genes
in Rhizobium trifolii. Mol.Gen.Genet., Berlin,
192:459-65, 1983.

SCHOFIELD, P.R.; GIBSON, A.H.; DUDMAN, W.F.; WATSON, J.M.
Evidence for genetic exchange and recombination of
Rhizobium symbiotic plasmids in a soil population. App.
Environ.Microbiol., Baltimore, 53:2942-7, 1987.

SCOLNIK, P.A. & HASELKORN, R. Activation of extra copies of
genes coding for nitrogenase in Rhodopseudomonas
capsulata. Nature., London, 307:289-92, 1984.

SCOTT, B.D. & RONSON, C.W. Identification and mobilization by
cointegrate formation of a nodulation plasmid in
R.trifolli, J.Bacteriol., Baltimore, 151:36-43, 1982.

SELVARAJ, G.; HOOPER, I.; SHANTHARAN, S.; IYER, V. N.
Derivation and molecular characterization of symbiotically
deficient mutants of Rhizobium meliloti. Can. J.
Microbiol., Ottawa, 33: 739-47, 1987.

SELVARAJ, G. & IYER, V.N. Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in Rhizobium meliloti and related bacteria. J.Bacteriol., Baltimore, 156:1292-300, 1983.

SHAW, K.J. & BERG, C.M. Escherichia coli K-12 auxotrophs induced by insertion of the transposable element Tn5. Genetics, Princeton, 92:741-7, 1979.

SHERWOOD, M.T. Inhibition of Rhizobium trifolii by yeast extracts or glycine is prevented by calcium. J.Gen. Microbiol., London, 712:351-8, 1972.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PUHLER, A. Vector plasmids for in vivo and in vitro manipulation of gram-negative bacteria. In: PUHLER, A., ed. Molecular genetic of bacteria-plant intervection. New York, Springer Verlag, 1983. p. 98-106.

SINDHU, S.S. & DADARWAL, K.R. Protoplast formation and regeneration in Rhizobium and Azospirillum. Current Science, Bangalore, 54:344-6, 1985

SODA, K. Microbial sulfur amino acids; an overview. Methods Enzymol., New York, 143: 453-9, 1987.

SOUTHERN, E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., London, 98:503-17, 1975.

STROMINGER, J.L. & BIRGE, C.H. Nucleotide accumulation induced in Staphylococcus aureus by glycine. J. Bacteriol., Baltimore, 89:1124-7, 1965.

SUNDARESAN, V.; AUSUBEL, F.M. Activation of Klebsiella pneumoniae and Rhizobium meliloti nitrogenase promoters by "gln" ("ntr") regulatory proteins. Proc. Natl. Acad. Sci., Washington, 80:4030-4, 1983.

THOMAS, P.M.; KUYKENDALL, L.D.; ANGLE, J.S. Mobilization of Tn5 insertions from Rhizobium fredii by pJB3JI. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 52:206-8, 1986.

THURMAN, N.P.; LEWIS, D.M.; JONES, D.G. The relationship of plasmid number to growth, acid tolerance and symbiotic efficiency in isolates of Rhizobium trifolii. J. Appl. Bacteriol., Reading, 58:1-6, 1985.

TIMMIS, K.N. Gene manipulation in vitro. In: GLOVER, S.W. & HOPWOOD, D.A., ed. Genetic as a tool in Microbiology. Cambridge, Cambridge University Press, 1981. p. 49-109.

- VALARINI, M.J. Aspectos genéticos e ecológicos em espécies de Rhizobium. Piracicaba, 1981. 93p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- VESPER, S.J.; MALIK, N.S.A.; BAUER, W.D. Transposon mutants of Bradyrhizobium japonicum altered in attachment to host roots. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 53:1959-61, 1987.
- VIDOLI, R.; YAMAZAKI, H.; NASIM, A.; VELIKY, I.A. A novel procedure for the recovery of hybrid products from protoplast fusion. Biotechnology Letters., Kew, 4:781-4, 1982.
- VIEIRA, J. & MESSING, J. Production of single-stranded plasmid DNA. Methods Enzymol., New York, 153: 3-11, 1987.
- VINCENT, J. M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford, Blackwell, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15).
- YAKOBSON, E.A. & GUINEY Jr, D.G. Conjugal transfer of bacterial chromosomes mediated by the RK2 plasmid transfer origin cloned into transposon Tn5. J. Bacteriol., Baltimore, 160:451-3, 1984.

YELTON, M.M.; MULLIGAN, J.T.; LONG, S.R. Expression of Rhizobium meliloti "nod" genes in Rhizobium and Agrobacterium backgrounds. J. Bacteriol., Baltimore, 169: 3094-8, 1987.

YELTON, M.M.; YANG, S.S.; EDIE, S.A.; LIM, S.T. Characterization of an effective salt-tolerant, fast-growing strain of Rhizobium japonicum. J. Gen. Microbiol., London, 129:1537-47, 1983.

WALTON, D.A. & MOSELEY, J.E. Induced mutagenesis in Rhizobium trifolii J.Gen Microbiol., London, 124:191-5, 1981.

WANG, C.L.; BERINGER, J.E.; HIRSCH, P.R. Host plant effects on hybrids of Rhizobium leguminosarum biovar viceae and trifolii. J.Gen.Microbiol., London, 132:2063-70, 1986.

WATSON, J. D. Molecular biology of the gene. California, W.A. Benjamin, Inc., 1977, 739p.

WATSON, J.M. & SCHOFIELD, P.R. Species-specific symbiotic plasmid-located repeated DNA sequences in Rhizobium trifolii. Mol.Gen.Genet., Berlin, 199:279-89, 1985.

WEISS, R.L. Protoplast formation in Escherichia coli. J. Bacteriol., Baltimore, 128: 668-70, 1976.

- WHEATCROFT, R. & WATSON, R.J. Identification and characterization of insertion sequence ISRm1 in Rhizobium meliloti JJ1c10. Can.J.Microbiol., Ottawa, 33:314-21, 1987.
- ZIMMERMANN, U. & VIENKEN, J. Electric field-induced cell-to-cell fusion. J.Membrane Biol., New York, 6:165-82, 1982.
- ZURKOWSKI, W. Molecular mechanism for loss nodulation properties of Rhizobium trifolii. J.Bacteriol., Baltimore, 150:999-1007, 1982.