

**Autores**

Stefan Schwab  
Pesquisador da Embrapa  
Agrobiologia, BR 465, km 7,  
Caixa Postal 74505,  
CEP 23851-970, Seropédica-  
RJ. E-mail:  
sschwab@cnpab.embrapa.br

Kátia Regina dos Santos  
Teixeira  
Pesquisadora da Embrapa  
Agrobiologia, BR 465, km 7,  
Caixa Postal 74505,  
CEP 23851-970, Seropédica-  
RJ. E-mail:  
katia@cnpab.embrapa.br

José Ivo Baldani  
Pesquisador da Embrapa  
Agrobiologia, BR 465, km 7,  
Caixa Postal 74505,  
CEP 23851-970, Seropédica-  
RJ. E-mail:  
ibaldani@cnpab.embrapa.br

## Construção e validação de uma biblioteca de promotores de transcrição para estudos de expressão gênica da bactéria endofítica diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*

**Introdução**

*Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria que demonstra contribuir significativamente com a nutrição de N de cana-de-açúcar em solos com escassez desse elemento (SEVILLA et al., 2001; SUMAN et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006). *G. diazotrophicus* é uma bactéria aeróbica, Gram-negativa, originalmente isolada do interior de plantas de cana-de-açúcar (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988; GILLIS et al., 1989), mas também já foi encontrada em arroz (*Oriza sativa*), batata-doce (*Ipomea batatas*), capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), café (*Coffea arabica*) e abacaxi (*Ananas comosus*) (DÖBEREINER et al., 1993; JIMENEZ-SALGADO et al., 1997; TAPIA-HERNANDEZ et al., 2000; YOUSSEF et al., 2004; MUTHUKUMARASAMY et al., 2007). Este microrganismo tem especial interesse como potencial biofertilizante porque é capaz de fixar N<sub>2</sub> na presença de nitrato e a baixos valores de pH (< 3,0), além de produzir hormônios de crescimento vegetal (STEPHAN et al., 1991; BASTIAN et al., 1998).

Por outro lado, pouco se conhece sobre a regulação gênica em *G. diazotrophicus*. A seqüência genômica completa da estirpe padrão PAL5 (ATCC 49037) foi recentemente publicada no banco de dados GenBank (BERTALAN et al., 2008), abrindo campo para estudos de regulação gênica a nível genômico através de técnicas de genômica funcional. Neste sentido, é necessário determinar quais os genes envolvidos e como ocorre sua regulação durante a interação com a planta hospedeira, o processo de fixação e transferência do nitrogênio (N) para a planta, e em outras atividades que estimulam o crescimento vegetal durante essa associação.

A regulação da transcrição gênica em procariotos é bastante variada, sendo que as seqüências de DNA específicas dos promotores são pontos-chave de diversos processos celulares. Uma tecnologia para o estudo da expressão e regulação gênica ao nível genômico, com ênfase na identificação e caracterização de promotores, é a técnica de promoter trap ou “captura de promotores”, que tem sido aplicada com sucesso em estudos envolvendo bactérias que se associam a plantas (HAAPALAINEN et al., 1996; RAMÍREZ-ROMERO et al., 2006; ZHANG e CHENG, 2006). A técnica envolve o uso de um vetor cuja característica principal é um sítio múltiplo de clonagem adjacente a um gene repórter sem promotor (DUNN e HANDELSMAN, 1999). Bibliotecas contendo fragmentos de DNA clonados em frente ao gene repórter podem ser utilizadas para estudar a atividade dos promotores em diversas condições ambientais. As triagens que utilizam ensaios cromogênicos como o da β-galactosidase (codificada pelo gene repórter lacZ) têm sua metodologia bem estabelecida (MILLER et al., 1970), e podem ser realizadas de acordo com a realidade financeira da maioria das instituições de pesquisa.

Este trabalho descreve a construção de uma biblioteca genômica da bactéria *G. diazotrophicus* utilizando um vetor de captura de promotores. Essa biblioteca foi introduzida em células do próprio microrganismo, permitindo assim monitorar sua expressão gênica a partir dos promotores nas diferentes condições de cultivo de interesse.

**Testes preliminares com as estirpes e plasmídeos**

A estirpe de *G. diazotrophicus* utilizada neste trabalho foi a do tipo selvagem PAL5, isolada originalmente de raízes de cana-de-açúcar em Alagoas (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988; GILLIS et al., 1989). A mesma foi cultivada a 30°C, a 200 rpm quando em meio líquido, e na

presença de tetraciclina 100 µg/mL quando portando os plasmídeos derivados de pMP220/pPW452 (ver adiante). Esta foi a concentração de antibiótico determinada que inibiu o crescimento da estirpe PAL5 não transformada.

Para avaliar se o plasmídeo pMP220 (SPAINK et al., 1987), bem como pPW452 (pMP220 com a região de múltipla ligação invertida, gentilmente cedido por P. WOODLEY, não publicado), poderiam ser utilizados como ferramentas de estudo da expressão gênica de *G. diazotrophicus*, foi necessário determinar se os mesmos são replicados em células desse microrganismo. Para isso, os plasmídeos foram transferidos para células de *G. diazotrophicus* pela técnica de eletroporação essencialmente como descrito (TEIXEIRA et al., 1999; ROUWS et al., 2006). A seleção dos transformantes foi feita em meio DYGS (pH 6,0) sólido (ágar 15 g/L), por 3–5 dias de cultivo, na presença de tetraciclina 100 µg/mL. Para confirmação da identidade das células transformadas como sendo de *G. diazotrophicus*, as mesmas foram cultivadas nos meios semi-específicos LGI-P semi-sólido (ágar 1,6 g/L) e sólido (ágar 25 g/L), e Batata-P, conforme descrito (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988). Além de apresentar crescimento na presença do antibiótico, os transformantes apresentaram padrões de crescimento típicos de *G. diazotrophicus* (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988): acidificação do meio (indicada pela coloração alaranjada no meio LGI-P sólido), formação de película na ausência de fonte de nitrogênio em meio LGI-P semi-sólido (crescimento suportado pela fixação de N<sub>2</sub> atmosférico) e surgimento de colônias pigmentadas em meio Batata-P.

Para confirmar que os plasmídeos pMP220/pPW452 mantêm-se como replicons estáveis em *G. diazotrophicus*, o extrato purificado dos clones transformantes foi utilizado para transformar células de *E. coli* estirpe DH10B, o que lhes conferiu resistência ao antibiótico tetraciclina. Isto indica que os plasmídeos pMP220/pPW452 são estávelmente replicados em células de *G. diazotrophicus* e podem ser utilizados como ferramentas de estudo da expressão gênica de *G. diazotrophicus*, através da construção da biblioteca de promotores.

### Obtenção dos plasmídeos recombinantes contendo fragmentos aleatórios do genoma de *G. diazotrophicus* em vetor com gene repórter

O plasmídeo pPW452 foi linearizado através de digestão com a enzima de restrição *Bgl*II (GE Healthcare), que possui um único sítio de clivagem em sua seqüência (SPAINK et al., 1987). Para evitar recircularização da molécula de DNA durante a reação posterior com a T4 DNA-ligase, o plasmídeo

linearizado foi submetido a reação de desfosforilação pela enzima fosfatase alcalina de camarão ("*Shrimp Alkaline Phosphatase*", USB).

Para o preparo de DNA total, a estirpe de *G. diazotrophicus* foi cultivada em 50 mL de meio DYGS (pH 6,0). A extração do DNA total consistiu de, resumidamente, lisar as células com solução SDS 10%, eliminar proteínas com solução de Proteinase K 20 mg/mL, extrair e precipitar o DNA através de tratamentos consecutivos com soluções de NaCl 5 M, CTAB/NaCl (CTAB 10% em NaCl 0,7M), fenol equilibrado (MANIATIS et al., 1982), fenol equilibrado:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1, clorofórmio:álcool isoamílico 24:1, isopropanol e etanol 70%. O precipitado foi seco em estufa a 37°C e ressuspenso em 900 µL de H<sub>2</sub>O em banho-maria a 50°C. O DNA foi visualizado em gel de agarose para avaliação da qualidade e quantidade (Fig. 1, coluna NC).

Tempos de incubação (min):

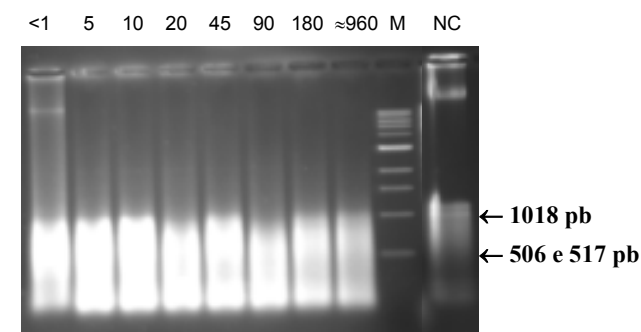


Figura 1 – DNA total de *Gluconacetobacter diazotrophicus* clivado com a enzima de restrição *Sau*3AI após diversos tempos de incubação. M = marcador de tamanho 1 kb DNA ladder; NC = DNA total de *G. diazotrophicus* não clivado

O DNA foi clivado com a enzima de restrição *Sau*3AI (GE Healthcare), conforme preconizado pelo fabricante (GE Healthcare). Com o objetivo de se determinar qual o tempo de reação ótimo para a obtenção de fragmentos *Sau*3AI do genoma de *G. diazotrophicus* entre 0,5 e 1,0 kb de tamanho, um sistema de reação com aquela enzima de restrição foi montado em banho de gelo e, após a adição da enzima, passou-se a contar o tempo simultaneamente à transferência do sistema para uma estufa a 37°C. Após períodos variados de incubação, 10 µL do sistema foram transferidos para novo microtubo em banho a 70°C, e aí se incubou por cerca de 30 min (para inativação da enzima). A Fig. 1 mostra um gel de agarose com essas amostras de 10 µL contendo o DNA total de *G. diazotrophicus* clivado com a enzima *Sau*3AI após os diversos tempos de incubação. Como se pode verificar, no tempo <1 min (que consistiu em transferir 10 µL do sistema ainda em banho de gelo para um novo microtubo em banho a

70°C), praticamente todo o DNA encontrava-se clivado em fragmentos entre 0,5 e 1,0 kb de tamanho. Desta forma, foram estabelecidas as condições para a obtenção de fragmentos entre 0,5 e 1,0 kb de tamanho para constituir o banco genômico de *G. diazotrophicus*.

Os fragmentos genômicos de *G. diazotrophicus*, resultantes da digestão de seu DNA total com a enzima de restrição *Sau3AI* (GE Healthcare), foram resolvidos em gel de agarose, em comparação com um marcador de tamanho molecular. A região entre as distâncias percorridas por 0,5 e 1,0 kb, na coluna do gel em que o DNA de *G. diazotrophicus* estava resolvido, foi coletada cortando com estilete. O DNA do pedaço de gel resultante foi extraído utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Os fragmentos com tamanho entre 0,5 e 1,0 kb obtidos por tratamento do DNA total de *G. diazotrophicus* com a enzima de restrição *Sau3AI* foram purificados a partir do gel de agarose. Estes fragmentos foram ligados no único sítio *Bgl*II do vetor pPW452, utilizando 200 U da enzima T4-DNA ligase (New England Biolabs).

### Obtenção da biblioteca de promotores de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em células de *Escherichia coli*

A estirpe DH10B de *Escherichia coli* (GRANT et al., 1990) foi utilizada para a clonagem da biblioteca de promotores de *G. diazotrophicus*. O sistema de ligação descrito acima foi introduzido em células de *E. coli* pela técnica de eletroporação, essencialmente como descrito por SEIDMAN et al. (1992). Foi utilizada uma eletrocubeta de 0,2 cm (Bio-Rad, nº catálogo 165-2082EDU) em um aparelho eletroporador Gene Pulser Xcell Total System (Bio-Rad, nº catálogo 165-2660); foi aplicado um pulso elétrico com os seguintes parâmetros: 2,5–3,0 kV, 25 µF e 200 Ω; a seleção dos transformantes foi em meio LB sólido (MANIATIS et al., 1982) adicionado de tetraciclina 10 µg/mL, cultivando-se em seguida por cerca de 16 h, a 37°C. Foram obtidas cerca de 8.100 colônias de células transformantes (Fig. 2A).

Para checagem da presença de inserto no vetor, e avaliação da eficiência do processo de clonagem da biblioteca de promotores, uma amostragem de 44 colônias de transformantes tiveram seu DNA plasmidial preparado pela técnica da lise alcalina essencialmente como descrito (MANIATIS et al., 1982), porém com modificações para o formato de placas de 96 poços. Para confirmar a presença dos insertos de clonagem no vetor pPW452, o DNA plasmidial foi analisado através de clivagem pela enzima de restrição *Hind*III, o que promove a liberação da região de ligação múltipla do vetor pPW452, onde os fragmentos

genômicos de *G. diazotrophicus* foram ligados. A Fig. 2B mostra o perfil de restrição *Hind*III do DNA plasmidial dessa amostragem, com a presença de insertos de clonagem entre 0,5 e 1,0 kb liberados para a maior parte dos clones.

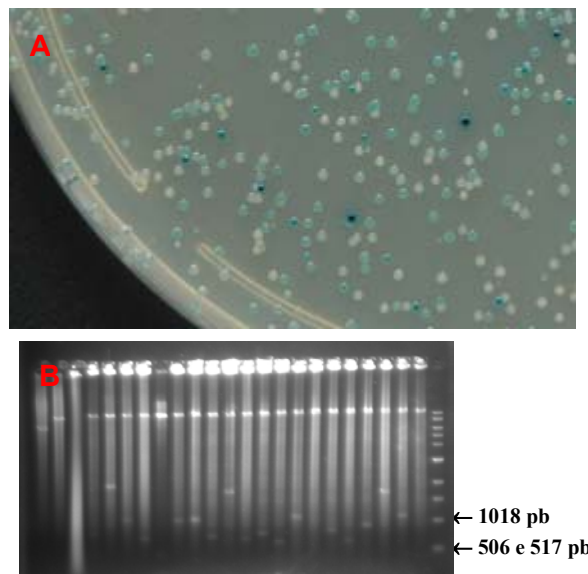


Figura 2 – Clones de *Escherichia coli* portando a biblioteca de promotores de *Gluconacetobacter diazotrophicus* no vetor pPW452.

Em A), clones de *E. coli* transformados com a biblioteca de promotores, cultivados na presença do indicador de atividade de  $\beta$ -galactosidase, X-GAL. Em B), DNA plasmidial de clones aleatórios da biblioteca de promotores digerido com *Hind*III (exceto nas duas primeiras colunas, o vetor pPW452 não digerido e digerido com *Hind*III, respectivamente, e na última coluna, o marcador de tamanho 1 kb DNA ladder), mostrando a liberação de fragmentos genômicos aleatórios de *G. diazotrophicus* com cerca de 0,5–1,0 kb.

A eficiência de clonagem da biblioteca foi estimada por amostragem, dividindo o número de clones contendo inserto pelo total de clones analisados, ou seja,  $33 \div 44 = 75\%$ ; extrapolando para toda a biblioteca, esta continha  $8.100 \times 75\% \cong 6.100$  clones contendo inserto.

### Obtenção da biblioteca de promotores em células de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

O DNA plasmidial de todos os clones da biblioteca de promotores de *G. diazotrophicus* obtidos em *E. coli* foi preparado utilizando o kit *CONCERT™ Rapid Plasmid Miniprep System* (Gibco BRL®/Life Technologies™), ressuspensando, inicialmente, todas as colônias em uma única alíquota do tampão *Cell Suspension Buffer (G1)* do kit.

A biblioteca de promotores foi introduzida em células de *G. diazotrophicus* pela técnica de eletroporação, essencialmente como descrito (TEIXEIRA et al., 1999; ROUWS et al., 2006). Foram obtidas cerca de 83.000 colônias de células transformantes de *G. diazotrophicus* contendo os plasmídeos da biblioteca de promotores. Porém, devido à limitação de

espaço físico e equipamentos, foram armazenados apenas cerca de 7.400 clones para as análises subsequentes. As colônias desses clones foram coletadas e inoculadas para cultivo a 200 rpm, em poço de uma placa de 96 poços contendo 150  $\mu\text{L}$  de meio DYGS. Após cerca de 5 dias de cultivo, em cada poço foram misturados 75  $\mu\text{L}$  de glicerol. As placas foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A avaliação da expressão de *lacZ* (através do indicador X-GAL), utilizando uma amostragem de 96 clones (ou uma placa de 96 poços da biblioteca), consistiu de cultivar os clones primeiramente em meio sólido na presença de tetraciclina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por cerca de 5 dias, depois em meio líquido com tetraciclina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 3 dias a 200 rpm, e finalmente em meio sólido na presença de tetraciclina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e X-GAL 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por aproximadamente 4 dias, em meio DYGS pH 6,0 (Fig. 3).

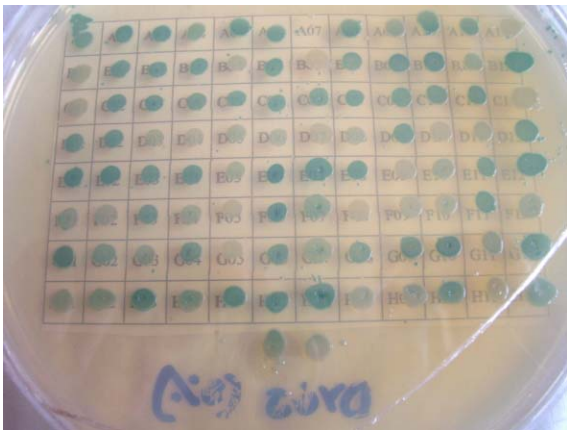


Figura 3 – Colônias de *Gluconacetobacter diazotrophicus* portando a biblioteca de promotores no vetor pPW452. As células foram cultivadas na presença do indicador de atividade de  $\beta$ -galactosidase, X-GAL.

### PCR e seqüenciamento de DNA de um fragmento da biblioteca de promotores de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 disponível no endereço eletrônico <http://frodo.wi.mit.edu/>, utilizando a seqüência do vetor pPW452 (não publicada, gentilmente cedida por Dra. Roseli Wassem, da Universidade Federal do Paraná). Os oligonucleotídeos desenhados, PPWleft e PPWright, foram encomendados da RW Genes (Rio de Janeiro).

As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit de Taq-DNA polimerase da Invitrogen (n° catálogo 11615-010) e continham (volume final de 20  $\mu\text{L}$ ): 2  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR 10 $\times$ ,  $\text{MgCl}_2$  1,25 mM, dNTP 0,2 mM cada, oligonucleotídeo 0,4  $\mu\text{M}$  cada, Taq-DNA polimerase 1 U, e como DNA molde 0,2  $\mu\text{L}$  de cultura de um clone LacZ<sup>+</sup> cultivado em meio DYGS modificado líquido diluída 1:10 em H<sub>2</sub>O e fervida por 10 min. Os ciclos foram: (95°C, 5 min)  $\times$  1; [95°C, 45 s;

53,2°C, 45 s; 72°C, 1 min]  $\times$  30; (72°C, 10 min)  $\times$  1. A Fig. 4 mostra os fragmentos de amplificação que foram obtidos com essas condições. Estes fragmentos foram purificados por precipitação com solução de polietilenoglicol, que consistiu de adicionar, à solução de DNA (32  $\mu\text{L}$ ), 8  $\mu\text{L}$  de NaCl 8 mol/L e 40  $\mu\text{L}$  de PEG8000 (polietilenoglicol com peso molecular médio 8000) 22%; incubar a 4°C durante a noite; centrifugar a  $>10.000 \times g$ , 4°C, por 30 min; lavar o precipitado com etanol 70%, centrifugando por 5 min; secar o precipitado; e ressuspender em 10  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O.

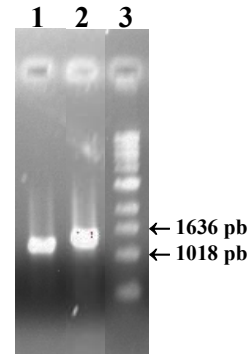


Figura 4 – Inseto de clone da biblioteca de promotores de *G. diazotrophicus* amplificado por PCR. As reações de PCR foram realizadas e 10  $\mu\text{L}$  de cada sistema resultante foi aplicado no gel de agarose 1,0% na seguinte disposição: 1 e 2 = Clone amplificado com os pares de oligonucleotídeos PPWright + PPWleft e PPWright + LACZ5' (SCHWAB et al., 2007) respectivamente; 3 = Marcador de tamanho 1 kb DNA ladder.

As reações de seqüenciamento de DNA para identificação do fragmento contendo um suposto promotor consistiram de 4  $\mu\text{L}$  do kit DYEnamic ET terminator reagent premix (GE Healthcare), 5 pmol de oligonucleotídeo iniciador (PPWleft, PPWright ou LACZ5'), 500 ng de DNA e H<sub>2</sub>O em quantidade suficiente para 10  $\mu\text{L}$ . Os ciclos foram: (95°C, 20 s; 50°C, 15 s; 60°C, 60 s)  $\times$  30. Após precipitação por acetato de amônio 7,5 mol/L e etanol 96%, e redissolução em "loading buffer for MegaBACE" (GE Healthcare), o sistema foi aplicado no seqüenciador automático MegaBACE (GE Healthcare). A seqüência de DNA obtida foi comparada com seqüências depositadas no banco de dados público GenBank, utilizando o programa Blastn (ALTSCHUL et al., 1997). O resultado da comparação pelo programa mostrou que a seqüência submetida era de *G. diazotrophicus*; além disso, um provável promotor do tipo -35/-10 foi identificado. Estes dados sugerem que a biblioteca de promotores de *G. diazotrophicus* foi eficientemente construída, e que o procedimento de identificação desses promotores foi eficientemente estabelecido.

## Exemplos de aplicação

Não existem relatos na literatura de qualquer seqüência de promotor de bactérias do gênero *Gluconacetobacter*. Devido ao estilo de vida endofítico de *G. diazotrophicus*, seria interessante desenvolver sistemas na bactéria para expressar genes de interesse agrônômico (conforme o trabalho pioneiro de SALLES et al., 2000), o que requer promotores fortes para promover sua expressão. A biblioteca de promotores construída já forneceu regiões reguladoras de DNA com potencial para essa aplicação.

Atualmente, a biblioteca de promotores está sendo utilizada para caracterizar promotores de transcrição de *G. diazotrophicus* regulados pela presença de caldo de dois genótipos de cana-de-açúcar, sendo uma variedade comercial e uma cultivar silvestre. O caldo é esterilizado e, em seguida, adicionado ao meio de cultura junto com o indicador de atividade de  $\beta$ -galactosidase, X-GAL. Esta estratégia tem permitido identificar clones responsivos que terão seus promotores caracterizados por seqüenciamento de DNA, o que indicará quais genes de *G. diazotrophicus* são ativados/inibidos durante associação endofítica com a cana-de-açúcar, ao nível de variedade. Além disso, a biblioteca pode ser explorada para caracterizar promotores de *G. diazotrophicus* envolvidos com qualquer outro tipo de variável ambiental, como estresse osmótico, pH, presença de compostos de carbono ou nitrogênio, etc. Desta forma, constitui uma ferramenta útil em estudos de expressão gênica, provendo uma rica fonte para a possível descoberta de novas funções nesse modelo biológico de diazotrofo endofítico.

## Referências Bibliográficas

- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.
- BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regul.**, v. 24, p. 7–11, 1998.
- BERTALAN, M.; BALDANI, J.I.; FERREIRA, P.; AND RIOGENE CONSORTIUM. *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 complete genome. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list\\_uids=377](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=377). Acesso em 25 de novembro de 2008.
- CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J.. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 23–31, 1988.
- DÖBEREINER J, REIS VM, PAULA MA AND OLIVARES FL. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E. (eds). **New horizons in nitrogen fixation. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture**, 17. Dordrecht: Kluwer, 1993. p. 671–676.
- DUNN, A.K.; HANDELSMAN, J. A vector for promoter trapping in *Bacillus cereus*. **Gene**, v. 226, p. 297–305, 1999.
- GILLIS, K.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R.M.; STEPHAN, M.P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, J.; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. Nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v. 39, p. 361–364, 1989.
- GRANT, S.G.N.; JESSEE, J.; BLOOM, F.R.; HANAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 97, p. 4645–4649, 1990.
- HAAPALAINEN, M.; KARP, M.; METZLER, M.C. Isolation of strong promoters from *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* using a promoter probe plasmid. **Biochim Biophys Acta**, v. 1305, p. 130–134, 1996.
- JIMENEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L.E.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; MASCARUA-ESPARZA, M.A.; MARTINEZ-ROMERO, E.; JESUS CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing Acetobacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 3676–3683, 1997.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- MILLER, J.H.; REZNIKOFF, W.S.; SILVERSTONE, A.E.; IPPEN, K.; SIGNER, E.R.; BECKWITH, J.R. Fusions of the *lac* and *trp* regions of the *Escherichia coli* chromosome. **J. Bacteriol.**, v. 104, p. 1273–1279, 1970.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; KANG, U.G.; PARK, K.D.; JEON, W.-T.; PARK, C.Y.; CHO, Y.S.; KWON, S.-W.; SONG, J.; ROH, D.-H.; REVATHI, G. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, p. 981–991, 2007.

OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant Soil**, v. 284, p. 23-32, 2006.

RAMÍREZ-ROMERO, M.A.; MASULIS, I.; CEVALLOS, M.A.; GONZÁLEZ, V.; DÁVILA, G. The *Rhizobium etli*  $\sigma^{70}$  (SigA) factor recognizes a lax consensus promoter. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, p. 1470-1480, 2006.

ROUWS, L.F.M.; HEMERLY, A.S.; BALDANI, J.I. **Transformação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAI5 pela técnica de eletroporação.** Comunicado Técnico 84, Embrapa Agrobiologia. Seropédica, 2006.

SALLES, J.F.; GITAHY, P.M.; SKOT, L.; BALDANI, J.I. Use of endophytic bacteria as a vector to express the *cry3A* gene from *Bacillus thuringiensis*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, p. 155-161, 2000.

SCHWAB, S.; RAMOS, H.J.; SOUZA, E.M.; CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O.; RIGO, L.U. Identification of  $\text{NH}_4^+$ -regulated genes of *Herbaspirillum seropedicae* by random insertional mutagenesis. **Arch. Microbiol.**, v. 187, 379-386, 2007.

SEIDMAN, C.E.; STRUHL, K.; SHEEN, J. Escherichia coli, plasmids and bacteriophages. In: AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. (eds.). **Short protocols in molecular biology.** New York: John Wiley & Sons, Inc., 1992. p. 1-30.

SEVILLA, M.; BURRIS, R.H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif<sup>-</sup> mutant strains. **Mol. Plant Microbe Interact.**, Amsterdam, v. 14, p. 358-366, 2001.

SPAINK, H.P.; OKKER, R.J.H.; WIJFFELMAN, C.A.; PEES, E.; LUGTENBERG, B.J.J. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. **Plant Mol. Biol.**, Holanda, v. 9, p. 27-39, 1987.

STEPHAN, M.P.; OLIVIERA, M.; TEIXEIRA, K.R.S.; MARTINEZ-DRETS, G.; DÖBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 77, p. 67-72, 1991.

SUMAN, A.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A.K.; YADAV, R.L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regul.**, v. 47, p. 155-162, 2005.

TAPIA-HERNANDEZ, A.; BUSTILIOS-CRISTALES, M.R.; JIMENEZ-SALGADO, T.; CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L.E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. **Microbial Ecol.**, v. 39, p. 49-55, 2000.

TEIXEIRA, K.R.S.; WÜLLING, M.; MORGAN, T.; GALLER, R.; ZELLERMANN, E.M.; BALDANI, J.I.; KENNEDY, C.; MELETZUS, D. Molecular analysis of the chromosomal region encoding the *nifA* and *nifB* genes of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 176, p. 301-309, 1999.

YOUSSEF, H.H.; FAYEZ, M.; MONIB, M.; HEGAZI, N. *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a natural endophytic diazotroph of Nile Delta sugarcane capable of establishing an endophytic association with wheat. **Biol. Fertil. Soils**, v. 39, p. 391-397, 2004.

ZHANG, X.S.; CHENG, H.P. Identification of *Sinorhizobium meliloti* early symbiotic genes by use of a positive functional screen. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 2738-2748, 2006.

## Circular Técnica, 24

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

### Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 7  
Caixa Postal 74505  
23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil  
Telefone: (0xx21) 2682-1500  
Fax: (0xx21) 2682-1230  
Home page: [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)  
e-mail: [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)

1ª impressão (2008): 50 exemplares



Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



## Comitê de publicações

Eduardo F. C. Campello (Presidente)  
José Guilherme Marinho Guerra  
Maria Cristina Prata Neves  
Verônica Massena Reis  
Robert Michael Boddey  
Maria Elizabeth Fernandes Correia  
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

## Expediente

Revisor e/ou ad hoc: Luis Henrique Barros Soares e Gustavo Ribeiro Xavier  
Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix.  
Edição eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia.