



**UFAM**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM**  
**BIOTECNOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM VETOR BIFUNCIONAL PARA A**  
**BACTÉRIA ENDOFÍTICA *Enterobacter agglomerans* e**  
***Escherichia coli***

**ALESSANDRA KARIZA COSTA LIMA DO NASCIMENTO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação Multi-institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Agroflorestal.

**MANAUS-AM**

2006  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM  
BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE UM VETOR BIFUNCIONAL PARA A  
BACTÉRIA ENDOFÍTICA *Enterobacter agglomerans* e  
*Escherichia coli*

ALESSANDRA KARIZA COSTA LIMA DO NASCIMENTO

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade

MANAUS-AM  
2006

Ao meu orientador, Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho,  
pela sabedoria, estímulo e apoio dedicado a mim.

Ao meu irmão Pedro, minha fonte de  
inspiração.

Aos meus pais, Tereza e Antonio pelo  
amor, estímulo e apoio.

A minha avó Creuza, pelo exemplo de vida  
e acima de tudo pelo amor, incentivo para  
todas as horas.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir realizar este trabalho, me incentivando nos momentos difíceis e acima de tudo pelo amor a mim dedicado em todas as etapas da minha vida, e as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho:

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, pela orientação e ensinamentos tanto profissionais como pessoais, reforçando-me suas mais intensas características, a sabedoria e a humildade.

Ao meu querido co-orientador Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade, pela dedicação e sabedoria, mas principalmente pela amizade e sinceridade em momentos decisivos em minha formação profissional.

As melhores professoras da minha graduação Elen Bethleen e Lucivana Mourão, pelos ensinamentos, pelo incentivo, amizade e exemplos de profissionalismo.

A minha querida amiga Enedina Nogueira de Assunção por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida, compartilhando e somando sempre.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologias do DNA e da Bioinformática pelo incentivo e ensinamentos de coletividade e pelas horas de bom humor: Carlos Gustavo, Viviane, Kemila, Gabriela, Elza, Jonso, Andréa, Larissa, Norma, Cristina Borborema, Luciana Leomil e aos alunos de PIBIC (animadíssimos!).

Aos amigos especiais Daniel Dutra e Márcia Neiva, pelo carinho, incentivo, imenso apoio (nas horas difíceis principalmente).

As minhas queridas amigas de graduação, Maria de Nazaré Ribeiro e Sandra Alves pelo carinho e incentivo.

A secretária da Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas Ângela Neiva (anjinha!) pelo carisma e eficiência.

Aos colegas do Centro de Apoio Multidisciplinar, Roberto Lira e Herbert Souza.

A Verusca Vaz, amiga querida que mesmo longe me fortalece com seu incentivo e carinho, ajudando-me com sua confiança nas horas decisivas para finalização deste trabalho.

As amigas Francisca Holanda e Jaqueline Valim, pelas horas de descanso mental, de descontração e acima de tudo pela boa convivência em nosso lar!

Aos meus pais Maria Tereza e Antonio, pelo apoio, carinho e incentivo dedicados a mim em todas as etapas do meu desenvolvimento pessoal, profissional e espiritual.

Ao meu amado irmão Pedro pelo estímulo e pelo exemplo de dedicação a Biologia.

A todos os meus familiares pelo incentivo e carinho, em especial a minha avó Creuza simplesmente por me permitir desfrutar do seu amor.

A todas as pessoas que me incentivaram durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade Federal do Amazonas e a FAPEAM pela oportunidade de realizar este trabalho e pelo apoio financeiro.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Estratégia experimental para clonagem dos fragmentos derivados do plasmídeo nativo pEA1.....	<b>20</b>
<b>Figura 2 -</b>	Mapa do plasmídeo pUC18, mostrando o gene de resistência a ampicilina (Amp <sup>R</sup> ) e os sítios de restrição para clonagem molecular.....	<b>21</b>
<b>Figura 3 -</b>	Mapa do plasmídeo pCR2.1-TOPO, mostrando os genes de resistência a ampicilina e canamicina e os sítios de restrição para a inserção do produto amplificado.....	<b>26</b>
<b>Figura 4 -</b>	Estratégia de <i>primer walking</i> utilizada para determinar a seqüência do pEA1.....	<b>28</b>
<b>Figura 5 -</b>	Esquema da estratégia seguida para a análise dos plasmídeos recombinantes construídos a partir de um fragmento amplificado do pEA1 clonado em vetor pCR2.1-TOPO.....	<b>29</b>
<b>Figura 6 -</b>	Perfil de restrição dos plasmídeos pEA1 e pUC18 com a endonuclease <i>Pst</i> I. 1- pEA1 intacto; 2, 3 e 4- pEA1 digerido (parcialmente); 5, 6 e 7- pUC18 digerido; 8- pUC18 intacto...	<b>35</b>
<b>Figura 7 -</b>	Construção do plasmídeo recombinante pEA1.0. Fragmento <i>Pst</i> I (1000 pb) do pEA1 clonado em vetor pUC18.....	<b>36</b>
<b>Figura 8 -</b>	Perfil de restrição dos plasmídeos pUC18 e pEA1.0 com endonuclease <i>Pst</i> I. 1- 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); 2- pUC18 intacto; 3- pUC18 digerido; 4- pEA1 intacto; 5- pEA1 digerido; 6, 8, 10- pEA1.0 intacto; 7, 9, 11- pEA1.0 digerido.....	<b>37</b>
<b>Figura 9 -</b>	Estratégia seguida para amplificação de segmentos de DNA do pEA1.....	<b>39</b>
<b>Figura 10 -</b>	Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do pEA1 com os dois primeiros pares de <i>primers</i> específicos. 1- 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); 2 e 3- fragmento com 2.415 pb; 4- fragmento com 130pb.....	<b>40</b>

<b>Figura 11 -</b>	Construção do plasmídeo recombinante pEA2.4. O fragmento amplificado (2.415 pb) foi clonado em vetor linearizado pCR2.1TOPO originando um plasmídeo que codifica resistência a ampicilina e canamicina.....	<b>43</b>
<b>Figura 12 -</b>	Seqüência completa do plasmídeo pEA1 com 2.545 pb.....	<b>44</b>
<b>Figura 13 -</b>	Mapa de restrição do plasmídeo pEA1.....	<b>45</b>
<b>Figura 14 -</b>	Mapa do pEA1 mostrando as duas possíveis ORFs presentes no plasmídeo.....	<b>46</b>



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Estirpes de <i>Escherichia coli</i> .....	<b>16</b>
<b>Tabela 2 -</b>	Lista dos plasmídeos utilizados ou produzidos.....	<b>16</b>
<b>Tabela 3 -</b>	Iniciadores utilizados para seqüenciamento dos plasmídeos pEA1 e pEA2.4.....	<b>23</b>

## RESUMO

Microrganismos endofíticos podem ser utilizados de diversas formas em biotecnologia. Dentre estas, se destaca o uso como carreadores de genes heterólogos para o interior de plantas possibilitando o desenvolvimento de novos processos biotecnológicos, o que torna relevante o desenvolvimento de vetores a partir de plasmídeos nativos das próprias bactérias endofíticas para transformação genética desse tipo de bactérias. Estudos envolvendo a *Enterobacter agglomerans*, uma bactéria endofítica isolada de *Copaifera multijuga* (copaíba) demonstraram a presença de um pequeno plasmídeo críptico denominado pEA1. Com base neste plasmídeo foram desenvolvidos os plasmídeos pEA1.0 e pEA2.4. O pEA1.0 foi construído a partir do fragmento de *Pst*I (1000 pb) clonado em pUC18. O plasmídeo pEA2.4 foi desenvolvido a partir de um fragmento amplificado (2415 pb) clonado no vetor pCR2.1TOPO (INVITROGEN), o qual por “*primer walking*” permitiu a determinação da seqüência completa do plasmídeo original (2545 pb), que foi depositada no GenBank (acesso DQ659147). A análise da seqüência mostrou um índice GC de 34% e AT de 66%, e o mapa de restrição foi determinado utilizando a ferramenta NEBCutter2.0. Comparando a seqüência do pEA1 com o banco de dados, observou-se alta similaridade (62%) com a seqüência do plasmídeo pIGMS31 (2520 pb) de *Klebsiella pneumoniae*. Utilizando as ferramentas BlastX e ORF finder, o resultado demonstrou a presença de duas ORFs, sendo uma delas similar (E value = -98) à ORF2 do plasmídeo pIGMS31 (AY543072.1) isolado de *K. pneumoniae*. O plasmídeo pEA2.4 foi utilizado para transformar geneticamente bactérias *Escherichia coli* e *E. agglomerans* pelo método Tris-Cálcio/choque térmico. O pEA2.4 além de ser capaz de

transformar geneticamente células de *E. coli*, mostrou-se também capaz de transformar geneticamente a *E. agglomerans* tornando-a resistente a canamicina, evidenciando seu caráter bifuncional. A eficiência de transformação da *E. agglomerans* com pEA2.4 extraído de *E. coli* foi de  $5 \times 10^4$  T/ $\mu$ g, enquanto que a transformação desta bactéria com o pEA2.4 extraído da própria *E. agglomerans*, apresentou eficiência 1 ordem de grandeza maior ( $5,1 \times 10^5$  T/ $\mu$ g) provavelmente por ter sido, desta forma, evitado o processo de restrição da hospedeira. O plasmídeo pEA2.4 será utilizado como base para o desenvolvimento de vetores de expressão de genes heterólogos em *E. agglomerans*.

## Abstract

Endophytic microorganisms can be utilized in distinct ways in Biotechnology science. Among them, one of most interesting uses is as heterologue gene carriers into plants, allowing the development of new Biotechnologic processes, which makes relevant the development of vectors from native plasmids from the endophytic bacterias themselves for genetic transformation of this kind of bacteria. Studies involving *Enterobacter agglomerans*, a endophytic bacteria isolated from *Copaifera multijuga* (copaiba tree), demonstrated the presence of a small, cryptic plasmid named pEA1. Based on this plasmid, the pEA1.0 and pEA2.4 plasmids were developed. pEA1.0 was built from a fragment of *Pst*I (1000 bp), cloned in pUC18. pEA2.4 was developed from an amplified fragment (2415 bp), cloned in the vector pCR2.1TOPO (Invitrogen), which allowed, by primer walking, the determination of the complete sequence of the original plasmid (2545 bp), which had been previously recorded in GenBank (access DQ659147). The sequence analysis showed a GC level of 34% and an AT level of 66%. The restriction map was determined using NEBCutter2.0. Comparison between pEA1 sequence and the data bank revealed high similarity (62%) with the sequence of the pIGMS31 plasmid (2520 bp) from *Klebsiella pneumoniae*. Using the BlastX and ORF finder softwares, the result demonstrated the presence of two ORFs, one of them similar (E value=-98) to ORF2 of pIGMS31 (AY543072.1) isolated from *K. pneumoniae*. The pEA2.4 plasmid was used to genetically transform *Escherichia coli* and *E. agglomerans* by the Tris-calcium/thermal shock method. Besides the capability of pEA2.4 to genetically transform *E. coli* cells, it has showed itself capable of transforming *E. agglomerans* as well, which can

actually acquire resistance to kanamidine. This reflects the bifunctional character of pEA2.4. The transformation efficacy of *E. agglomerans* using pEA2.4 extracted from *E. coli* was about  $5 \times 10^4$  T/ $\mu\text{g}$ , while the same process with pEA2.4 extracted from *E. agglomerans* itself showed a ten times higher efficacy ( $5,1 \times 10^5$  T/ $\mu\text{g}$ ), probably because of the avoidance of host restriction. The pEA2.4 plasmid will be used as foundation for the development of heterologue gene expression vectors in *E. agglomerans*.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1. Microrganismos endofíticos	02
1.2. Endofíticos e suas aplicações biotecnológicas	04
1.3. <i>Enterobacter agglomerans</i>	06
1.4. Vetores plasmidiais utilizados em engenharia genética	07
1.4.1. Características gerais de plasmídeos	07
1.4.2. Plasmídeos como vetores de clonagem	08
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
3.1. Meios de cultura	13
3.2. Soluções tampões	14
3.3. Bactérias e plasmídeos	15
3.4. Isolamento e cultivo de <i>E. agglomerans</i>	17
3.5. Extração de DNA plasmidial	17
3.6. Clonagem dos fragmentos derivados do pEA1 no pUC18	17
3.7. Seleção de clones recombinantes	22
3.8. Determinação das seqüências nucleotídicas dos fragmentos clonados	22
3.9. Desenho de oligonucleotídeos	23
3.10. Amplificação via PCR	24
3.11. Construção de plasmídeo para transformar <i>E. coli</i> e <i>E. agglomerans</i>	25
3.12. Análise dos transformantes	27
3.13. Seqüenciamento do fragmento de pEA1 amplificado	27
3.14. Análise dos plasmídeos seqüenciados	29
3.15. Transformação genética da <i>E. agglomerans</i>	31

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
4.1. Isolamento do plasmídeo pEA1 e construção de plasmídeos recombinantes	33
4.2. Caracterização dos clones recombinantes pEA1.0	38
4.3. Amplificação das primeiras seqüências de DNA do pEA1	38
4.4. Construção de um vetor bifuncional pEA2.4	41
4.5. Análise das seqüências de pEA1	44
4.5.1. Montagem dos <i>contigs</i>	44
4.5.2. Construção de um mapa de restrição do pEA1 e análise das ORFs	45
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>47</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>49</b>

## **1. Introdução**

Os países de clima tropical e subtropical como o Brasil possuem uma rica biodiversidade. A biodiversidade consiste numa medida da variabilidade existente entre e dentro das espécies e neste contexto, existem os microrganismos (Azevedo, 1998a).

Dados sobre o número de espécies atualmente conhecidas, assim como uma estimativa das que ainda estão por ser descobertas revelam que os microrganismos representam um grupo que detém várias propriedades possivelmente ainda não classificadas, porém com interesse biotecnológico potencial. A falta de conhecimento sobre suas propriedades e suas interações, por exemplo, microrganismos-plantas, dificulta a proteção dos mesmos (Azevedo, 1999). E por sua vez, desconhecer as interações entre as espécies pode por consequência causar danos ou mesmo a extinção de uma espécie microbiana que vive em simbiose com plantas superiores e de seu hospedeiro.

O desenvolvimento de estudos com bactérias e fungos albergados por diversas plantas de clima tropical, vêm mostrando sua grande variabilidade pelo uso de tecnologia de marcadores moleculares. Tais estudos têm produzido importantes informações sobre as diferenças entre linhagens patogênicas e endofíticas dentro de uma mesma espécie, bem como endofíticos e seus habitats (Longo, 1996).

Portanto, a importância destes microrganismos é notável e adquirir conhecimento sobre esta microbiota e suas interações se faz necessário para que o equilíbrio do ambiente seja mantido, evitando a redução da biodiversidade além de permitir seu uso para os mais variados fins biotecnológicos.



## 1.1. Microrganismos endofíticos

Diversos microrganismos albergam-se no interior das plantas podendo estabelecer relações simbióticas ou neutras com as hospedeiras sendo assim classificados como endofíticos. Segundo Petrini (1991), os microrganismos endofíticos colonizam o interior das plantas em alguma fase do seu ciclo vital, sendo encontrados em diferentes órgãos e tecidos vegetais como as folhas, ramos e raízes aparentemente sem causar danos a planta hospedeira. Porém, mesmo um endofítico inofensivo a uma determinada espécie ou variedade de planta, sob condições de desequilíbrio pode se apresentar como um patógeno para o hospedeiro (Di Fiori e Del Gallo, 1995).

Compondo a biodiversidade amazônica, fungos e bactérias endofíticas podem ser utilizados como vetores para a introdução de características de interesse biotecnológico em plantas (Downing *et al.*, 2000; Tomasino *et al.*, 1995). Os endófitos diferem dos epífitos que vivem na superfície dos vegetais, e dos fitopatógenos, causadores de doenças. Entre os microrganismos endofíticos, os fungos e bactérias que formam nódulos nas raízes das plantas as quais estão associados são bastante estudadas devido sua importância na agricultura, particularmente por sua participação na fixação de nitrogênio pelas plantas.

Neste aspecto, fungos e bactérias endofíticas podem ter seus genomas conhecidos e alterados geneticamente para serem utilizados no controle de patógenos, promoção de crescimento vegetal, síntese de vitaminas, aminoácidos e vacinas no interior da planta hospedeira (Azevedo *et al.*, 2000).

Os processos envolvidos nas interações entre a planta e o endofítico envolvem fatores bióticos e abióticos, que ainda não são completamente

compreendidos. Entretanto, algumas contribuições significativas para a viabilidade do vegetal foram atribuídas a estes microrganismos, que podem atuar como agentes controladores de espécies fitopatogênicas, atuar no controle de insetos, na proteção da planta contra herbívoros, na produção de fitohormônios e ainda, atuar como otimizadores de crescimento e enraizamento da planta hospedeira, assim como elevar sua resistência a estresses bióticos e abióticos (Azevedo *et al.*, 2000; Hallmann *et al.*, 1997). A comunidade endofítica exerce estes efeitos favoráveis na planta porque é capaz de produzir compostos químicos como enzimas, alcalóides, antibióticos e diferentes metabólitos, os quais favorecem a adaptação da planta perante condições adversas. A síntese destas substâncias é induzida por condições de estresse da planta hospedeira como: falta de água, presença de substâncias tóxicas ou ataque de patógenos ou insetos, que afetam a interação da planta com o meio ambiente.

Ainda, desequilíbrios no metabolismo da planta sejam eles naturais ou devido a práticas culturais inadequadas, como o uso excessivo de fertilizantes e outros produtos químicos, podem causar, conseqüentemente, um desequilíbrio na microbiota endofítica de forma que estes organismos assumam um caráter fitopatogênico (Azevedo, 1998). Estes dados indicam que existe uma estreita relação entre a planta hospedeira e o microrganismo simbiote, que quando harmônica pode ser benéfica para ambas as espécies. O potencial das bactérias endofíticas para o desenvolvimento de novos sistemas de hospedeira e vetor, para utilização em processos fermentativos ou na introdução de genes heterólogos em plantas tem sido demonstrado (Downing *et al.*, 2000).

## 1.2. Endofíticos e suas aplicações biotecnológicas

As bactérias endofíticas estabelecem uma interação biológica com os seus hospedeiros, influenciando na fisiologia das plantas por mecanismos ainda não completamente esclarecidos (Misaghi e Donndelinger, 1990). Ainda, sua capacidade de sobreviver à competição microbiana no interior de tecidos vegetais, as torna organismos de escolha para práticas biotecnológicas, sendo de grande aplicação na agricultura e nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Na biotecnologia, as aplicações práticas também se concentram na utilização desta comunidade como vetores para introdução de genes de interesse em plantas (Fahey, 1998; Murray *et al.*, 1992). Adicional pode ser utilizada em controle biológico, bem como na produção de metabólitos primários e secundários (Hallmann *et al.*, 1997).

Dados da literatura demonstram que os benefícios conferidos pelos microrganismos endofíticos, associados às novas técnicas de biologia molecular, os tornam um importante modelo para estudos que visam integrar novas características em plantas. A utilização deste grupo de organismos como vetores para a introdução de genes heterólogos em plantas hospedeiras, tem sido relatada, onde estes são alterados geneticamente e reintroduzidos na hospedeira conferindo novas características de interesse agropecuário às plantas. O primeiro relato desta aplicação foi descrito em estudos com milho, o qual foi inoculado com uma linhagem da bactéria endofítica *Clavibacter xyli* subsp. *Cynodontis*. Esta foi previamente transformada com adição do gene da endotoxina de *Bacillus thuringiensis*. Este gene expressa uma proteína na forma de cristal, que quando ingerida pela broca do colmo (*Ostrinia nubilalis*), causa à morte do inseto. A inoculação da bactéria endofítica expressando esta

proteína tornou as plantas de milho resistentes a referida praga (Tomasino *et al.*, 1995). Este gene havia sido introduzido antes em *Bradyrhizobium japonicum* e após colonização desta bactéria em raízes de *Cajanus cajan*, resultou na proteção da planta hospedeira a larvas de *Rivelia angulata* (Nambiar *et al.*, 1990).

Uma estratégia semelhante foi utilizada para o controle da broca da cana (*Eldana saccharina*) utilizando como vetores as bactérias *Pseudomonas fluorescens* e *Herbaspirillum seropedicae* epifítica e endofítica respectivamente. Neste modelo, resultados mais eficientes foram obtidos quando dois genes heterólogos foram introduzidos nas referidas bactérias vetores, codificantes para a proteína cristal de *B. thuringiensis* e para a quitinase de *Serratia marcescens*, respectivamente (Downing *et al.*, 2000).

Outra abordagem de aplicação biotecnológica foi demonstrada pela utilização do fungo endofítico *Taxomyces andreanea* (Stierle *et al.*, 1993). Este fungo é encontrado no interior da planta *Taxus brevifolia*, sendo capaz de produzir um complexo diterpenóide denominado taxol (Stierle *et al.*, 1993). Posteriormente, Strobel *et al.* (1996) demonstraram a produção de taxol por outro fungo endofítico, o *Pestalotiopsis microspora*. O taxol é um importante fármaco com atividade antitumoral. Com a descoberta de que fungos endofíticos podem produzir o taxol, visualizou-se um novo processo mais eficiente e menos dispendioso para a produção deste, que inicialmente era extraído das plantas que albergavam esses endofíticos. Desta forma o novo procedimento pode diminuir o risco de extinção de algumas espécies vegetais, as quais são utilizadas para a extração de produtos medicinais, por minimizar o impacto ambiental.

Além de uma grande aplicação em agricultura, a elaboração de estratégias fundamentadas em utilização/manipulação de endofíticos pode fazer benefícios também à medicina. Em decorrência da utilização abusiva e indiscriminada de antibióticos e fungicidas, surgiram vários microrganismos patogênicos multi-resistentes. Esse fator intensificou a busca de novas drogas com atividade antimicrobiana. Assim, a descoberta de novos antimicrobianos, principalmente em países de grande biodiversidade como o Brasil, faz com que estudos relativos aos endofíticos sejam promissores, favorecendo o combate a diversas doenças e gerando dividendos para o país (Strobel *et al.*, 1996; Mandala *et al.*, 1997; Azevedo *et al.*, 2000; Marcon, 2002; Lima de Souza, 2004).

Estudos que favoreceram um melhor entendimento das interações endofítico-planta são de grande importância, pois permitem a expressão de genes nos microrganismos endofíticos de interesse, bem como facilita a sua detecção na hospedeira. Desta forma, possibilita um monitoramento mais eficiente destes organismos na planta e no meio ambiente (Murray *et al.*, 1992; Yates *et al.*, 1999), fornecendo dados para estudos da dinâmica da colonização do microrganismo na planta. Todas essas informações reunidas serão úteis favorecendo a utilização destes microrganismos para o controle de pragas ou doenças.

### **1.3. *Enterobacter agglomerans***

A *E. agglomerans* é uma bactéria gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Inicialmente, foi classificada como *Bacillus agglomerans* (Beijerinck, 1888) e *Erwinia herbicola* (Dye 1969a; Dye 1969b; Ewing & Fife

1972; Beji *et al.* 1988). Embora tenha sido transferida para o gênero *Pantoea* (*Pantoea agglomerans*) por Gavini *et al.* (1989) o termo *E. agglomerans* prevalece principalmente na microbiologia clínica.

O gênero *Enterobacter* inclui espécies de bactérias sem motilidade com ampla distribuição. Podem ser observadas na microbiota dos tratos intestinal e urinário humano e animal, na água, no solo, ou em plantas como agentes não patogênicos, saprófitas e eventualmente como patogênicos oportunistas (Sanders & Sanders, 1997; Di Fiori & Del Gallo, 1995). Entre os microrganismos endofíticos que compõem a biodiversidade da região amazônica encontra-se a *E. agglomerans* cujo isolamento a partir de *Copaifera multijuga* (copaíba) foi realizado por Barbosa (2001). As análises preliminares deste isolado demonstraram a presença de um plasmídeo aparentemente com característica multicópia.

#### **1.4. Vetores plasmidiais utilizados em engenharia genética**

##### **1.4.1. Características gerais de plasmídeos**

Os plasmídeos são elementos genéticos extracromossomais encontrados em várias espécies de bactérias e em algumas leveduras. As moléculas de DNA plasmidial são circulares e dupla-fita, podendo variar o tamanho entre 1 e 200 kb. Frequentemente, os plasmídeos contêm genes que codificam proteínas que podem conferir vantagens para a bactéria hospedeira, embora os genes plasmidiais não codifiquem funções essenciais ao crescimento celular (Birge, 1994). Entre os diferentes fenótipos conferidos pelos plasmídeos incluem a resistência e produção de antibióticos, degradação

de componentes do complexo orgânico, produção de colicinas, produção de enterotoxinas e produção de enzimas de restrição.

Comparável ao cromossomo bacteriano, os plasmídeos tem a habilidade de replicação autônoma e possuem genes ativos. Adicional, durante a divisão celular observa-se a segregação de pelo menos uma cópia do plasmídeo para cada célula. Na natureza, alguns plasmídeos apresentam incompatibilidade funcional com outros plasmídeos similares, o que impede a residência simultânea na mesma célula (Birge, 1994). Os plasmídeos interagem com o sistema de replicação do DNA cromossomal da hospedeira de formas variadas. Em geral, os plasmídeos com tamanhos menores são mais dependentes do aparato de replicação da célula hospedeira, enquanto, os plasmídeos maiores apresentam menor dependência para a sua replicação (Miller, 2001).

#### **1.4.2. Plasmídeos como vetores de clonagem**

Os vetores são ferramentas utilizadas para introdução e manutenção de uma seqüência de DNA exógeno em um dado hospedeiro. As características mais importantes de um vetor versátil são: fácil inserção do DNA exógeno a ser clonado, devido à presença de um *polylinker* ou poliligante que consiste em uma região vetora que contém vários sítios únicos de corte para enzimas de restrição; presença de genes que atuam como marca de resistência a antibióticos; habilidade de expressar os genes exógenos inseridos na hospedeira e se necessário, apresentar propriedades que favoreçam a não proliferação ambiental do DNA exógeno (Astolfi-Filho *et al.*, 1996).

Entre os vários tipos de vetores utilizados para clonagem em células hospedeiras, destacam-se os bacteriófagos  $\lambda$ , bacteriófagos M13, cosmídeos e

plasmídeos. Embora sejam diferentes em tamanho e estrutura estes vetores compartilham algumas propriedades comuns. Segundo Birge (1994), um vetor de clonagem precisa: i) replicar em *Escherichia coli* (*E. coli*); ii) ser facilmente separado dos ácidos nucleicos da bactéria e purificado; iii) conter regiões de DNA não essenciais para a propagação em bactéria; iv) receber o DNA exógeno nestas regiões, replicá-lo e propagá-lo como um componente normal do vetor. Contudo, cada tipo de vetor tem características biológicas particulares que o tornam útil para diferentes propósitos. Os plasmídeos, em especial, possibilitam a clonagem de segmentos de DNA com tamanhos variados, tornando-os vetores de escolha para diversos procedimentos (Birge, 1994).

Os primeiros plasmídeos utilizados como vetores eram dotados de algumas características que limitavam seu desempenho das quais se destacam: deficiência quanto ao número de marcadores genéticos; baixo número de cópias; poucos sítios de clonagem e tamanhos excessivos.

O primeiro plasmídeo utilizado como vetor de clonagem molecular, ainda no início do desenvolvimento da TDR (Tecnologia do DNA Recombinante), foi o pSC101. Hopwood *et al.* (1976) identificaram este plasmídeo em cepas de *Streptomyces coelicolor*, o pSC101 (350 kb) contém apenas um marcador genético de seleção (gene de resistência à tetraciclina) classificando-o como um vetor pouco versátil. Em seguida, foram desenvolvidos vetores com características mais eficientes dos quais se destaca o pBR322 desenvolvido por Bolívar *et al.* (1977). Este vetor é pequeno (4,36 kb) com replicação sob controle relaxado, o que resulta em um alto número de cópias por célula. Contém genes de resistência a ampicilina e a tetraciclina além de um conveniente número de sítios de restrição em posições estratégicas,



imprescindíveis para a engenharia genética. O tamanho menor confere algumas vantagens para o plasmídeo, como: elevado número de cópias e maior facilidade de manipulação do DNA plasmidial (Astolfi-Filho, 1997).

A partir do pBR322 vários vetores foram construídos conferindo a vantagem de proporcionar um maior número de cópias, quando comparados com seu antecessor. Um dos derivados é o pAT153 (Twiggs & Sherrat, 1980), que foi construído a partir de uma manipulação na região do genoma plasmidial envolvida no controle do número de cópias. Esta alteração conferiu um aumento de aproximadamente de 1,5 a 3,0 vezes o número de cópias de pAT153 presentes por células quando comparado ao pBR322.

Posteriormente aos vetores derivados diretamente do pBR322 foram desenvolvidos vetores mais elaborados, dos quais os mais importantes pertencem a série pUC desenvolvida por Messing (1991). Os plasmídeos pUCs têm como principais características o tamanho pequeno (2,69 kb), duas marcas de seleção e caráter multicópia em *E. coli*. Os vetores pUCs, permitem seleção visual direta de colônias contendo plasmídeos recombinantes. O elemento principal para a seleção direta deste vetor é a presença de uma pequena parte do gene de  $\beta$ -galactosidase de *E. coli*. Nesta região foi inserido um *polylinker* que não interfere na tradução desta enzima, ou seja, não tira a seqüência codificadora de  $\beta$ -galactosidase de fase.

O protocolo de transformação genética utiliza células hospedeiras que contêm um gene que codifica para um domínio não funcional de  $\beta$ -galactosidase. Ao receberem o vetor ocorre um tipo incomum de complementação ( $\alpha$ -complementação), na qual as proteínas parciais codificadas pelos dois genes (genômico e plasmidial) se associam para formar

uma  $\beta$ -galactosidase funcional. A partir da adição do substrato incolor X-Gal ao meio de cultura, a enzima funcional converte esta substância em um corante azul, conferindo esta cor  respectiva colônia. Contudo, a inserção de um DNA exógeno no *polylinker* interrompe o gene que codifica para o domínio da enzima presente no vetor, impedindo assim a formação da  $\beta$ -galactosidase completa resultando em colônias brancas (Birge, 1994).

Atualmente, vários estudos objetivando o desenvolvimento de vetores bifuncionais (*shuttle vector*) têm sido relatados. Este tipo de vetor é capaz de replicar e ser selecionado em duas hospedeiras distintas. Devido a maior facilidade de manipulação da *E. coli*, mesmo um vetor que tenha como propósito a utilização com hospedeiras distintas da *E. coli*, todas as etapas da manipulação e caracterização do vetor serão facilitadas se este for compatível com transformação e replicação em *E. coli*. Posteriormente então, o vetor bifuncional poderá ser utilizado para transformação na hospedeira desejada (Azevedo *et al.*, 1998b).

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Desenvolver um vetor bifuncional a partir de um plasmídeo (pEA1) derivado de uma bactéria endofítica da espécie *Enterobacter agglomerans* isolada de *Copaifera multijuga* (copaíba).

### **2.2. Objetivos específicos**

- ✓ Isolar e caracterizar o plasmídeo (pEA1);
- ✓ Construir um plasmídeo bifuncional para *E. coli* / *E. agglomerans* a partir do pEA1;
- ✓ Padronizar um protocolo para transformação de *E. agglomerans* com o plasmídeo bifuncional construído.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Bactérias e plasmídeos

As estirpes das bactérias hospedeiras e os plasmídeos que foram utilizados neste trabalho estão listados na **Tabela 1** e **Tabela 2**, respectivamente.

**Tabela 1:** Estirpes de *Escherichia coli*.

Estirpes	Características relevantes	Referências
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80d/lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA- argF)U169, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), $\lambda$ -	Hanahan, <i>et al.</i> , 1983
TOPO10 (Invitrogen)	F- mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 deoR nupG recA1 araD139 $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str <sup>R</sup> ) endA1 $\lambda$ <sup>-</sup>	Grant, <i>et al.</i> , 1990

**Tabela 2:** Lista dos plasmídeos utilizados ou produzidos.

<b>Plasmídeo</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Referência/origem</b>
pUC18	Vetor de clonagem. Amp <sup>R</sup>	Messing, <i>et al.</i> , 1985.
pCR2.1TOPO	Vetor de clonagem. Can <sup>R</sup> / Amp <sup>R</sup>	<b>Invitrogen</b>
pEA1	Plasmídeo nativo de <i>E. agglomerans</i> (2.5 kb)	<b>Este trabalho</b>
pEA1.0	Segmento 1000 pb do pEA1 clonado em pUC18 nos sítios <i>Pst</i> I	Este trabalho
pEA2.4	Segmento 2.415 pb do pEA1 clonado em pCR2.1TOPO	Este trabalho

### **3.2. Isolamento e cultivo de *E. agglomerans***

As colônias de *E. agglomerans* foram previamente isoladas por Mourão (2001), utilizando a técnica de esgotamento por estrias cruzadas, em placas contendo meio de cultura LB-ágar. A partir desta técnica obtiveram-se colônias isoladas, as quais posteriormente foram semeadas em tubos contendo o meio de crescimento LB-soft para estoque a 37° C. Colônias semeadas em meio LB-líquido destinado à extração de plasmídeos foram crescidas durante a noite, entre 12 e 18 horas, em incubadora com agitação orbital, ajustada em 180 rpm.

### **3.3. Extração de DNA plasmidial**

As colônias de *E. agglomerans* foram crescidas em 5 mL de meio LB e transferidas para microtubos de centrifuga para extração de DNA plasmidial utilizando o Kit *Flexprep* (*Amersham Bioscience- GEhealthcare*). O protocolo de lise alcalina empregado neste trabalho está descrito no

**Anexo A.** O plasmídeo nativo foi denominado pEA1 e sua concentração foi estimada por visualização em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etídeo (10 mg/mL).

### 3.4. Clonagem dos fragmentos derivados do pEA1 no pUC18

Após a extração, o pEA1 foi submetido a sistemas de restrição com as seguintes endonucleases: *Accl*, *Aval*, *Avall*, *BamHI*, *BgII*, *Eco0109*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HindIII*, *PstI*, *PvuII*, *SauI*, *Sau3AI*, *TaqI*, *Xba*, *Xho*, conforme especificações do fabricante, a fim de verificar quais destas enzimas apresentam sítio único, ou sítios duplos no plasmídeo que possibilitariam a clonagem no vetor pUC18. Os sistemas de digestão para o plasmídeo pEA1 foram preparados de acordo com os volumes citados a seguir:

DNA .....	2,0 µL
Tampão 10X (específico para cada enzima) .....	1,5 µL
Enzima .....	1,0 µL
Água Mili-Q .....	10,5 µL
<b>Volume final</b> .....	<b>15,0 µL</b>

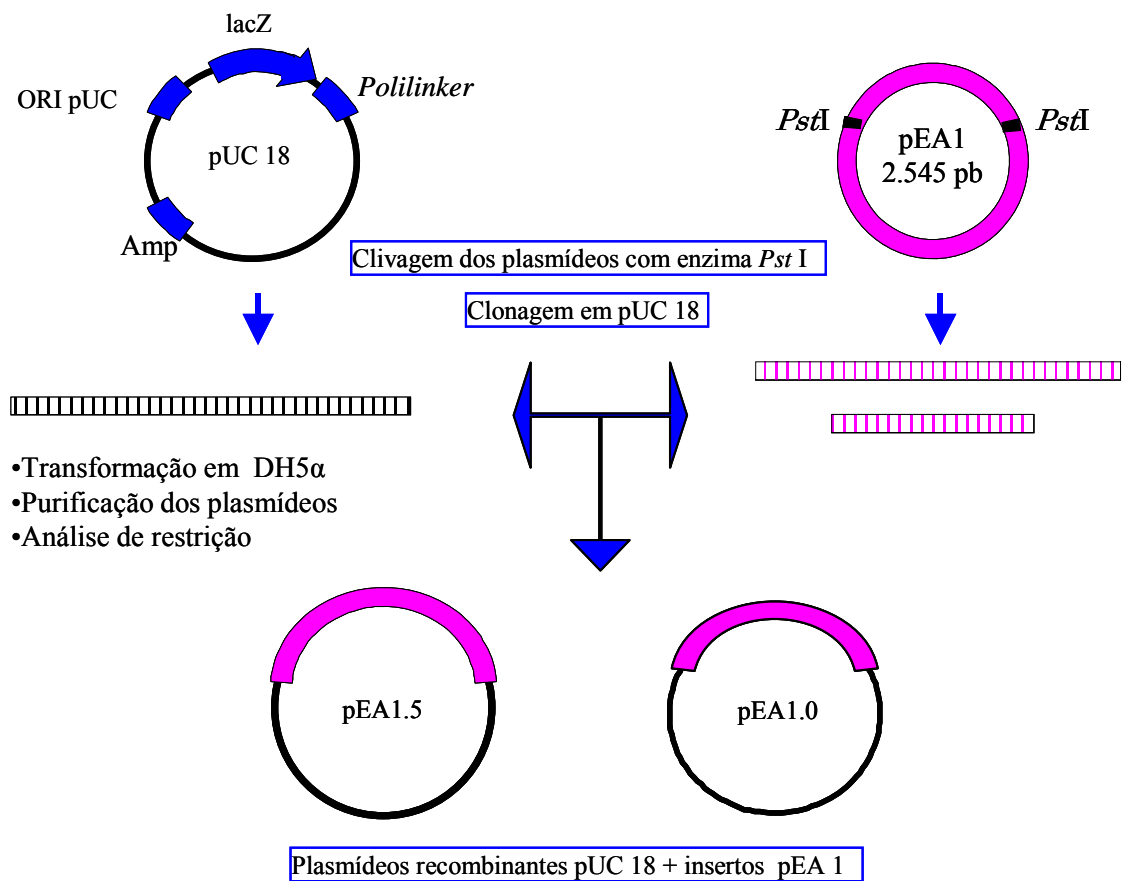
Os sistemas de digestão foram incubados por duas horas a 37° C. Para a análise do processo de digestão foram aplicados 5 µL de cada sistema em gel de agarose 0,8% correspondendo a 1/5 do volume total.

A estratégia adotada foi a digestão do pEA1 com a enzima *PstI* seguida da linearização do vetor pUC18 com a mesma enzima (**Figura 1**).

Os fragmentos obtidos foram ligados ao vetor pUC18, cujo mapa está demonstrado na **Figura 2**, o qual possui como marcador de seleção um gene que confere resistência a ampicilina e o gene que codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase (Lac-Z), cuja expressão é usada como um sistema "repórter" e no qual está presente um sítio múltiplo de clonagem.

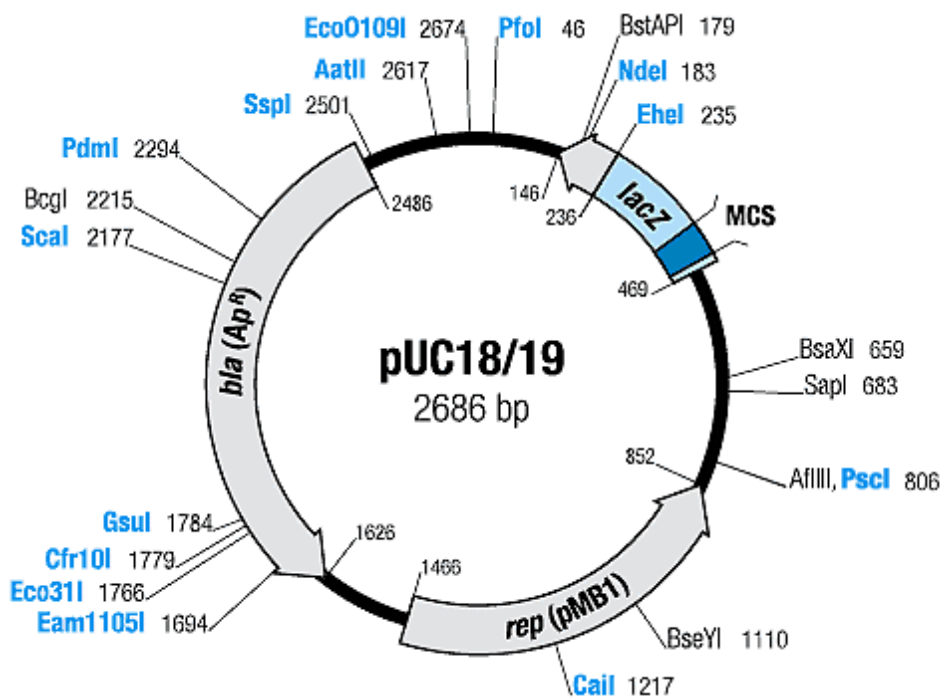
Os plasmídeos recombinantes foram inseridos na bactéria hospedeira DH5 $\alpha$  por transformação seguindo a técnica de cloreto de cálcio/choque térmico (Mandel e Higa, 1970).

Para esse processo misturou-se 100  $\mu$ L de células competentes com 5  $\mu$ L do sistema de ligação e o sistema foi mantido no gelo por uma hora. Em seguida a mistura foi submetida a um choque térmico de 37° C por cinco minutos. Ao sistema adicionou-se 1 mL de meio LB que foi então mantido a 37° C por uma hora, e posteriormente distribuiu-se alíquotas do sistema em placas contendo meio LB-ágar e ampicilina (100  $\mu$ g/mL), X-Gal (50 mg/mL) e IPTG (25 mg/mL). Para a seleção dos clones recombinantes fez-se uma análise visual com base na coloração branca a qual indica a inativação do gene Lac-Z.



**Figura 1** - Estratégia experimental para clonagem dos fragmentos derivados do pEA1.





**Figura 2** - Mapa do plasmídeo pUC18, mostrando o gene de resistência a ampicilina (amp) e os sítios de restrição para clonagem molecular.

### **3.5. Extração plasmidial dos plasmídeos recombinantes**

Catorze colônias selecionadas como descrito foram inoculadas em 5 mL de meio LB, e cultivadas durante a noite a 37° C. Para a extração dos plasmídeos utilizou-se o Kit *Flexprep* (*Amersham Bioscience*), seguida de análise por eletroforese em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etídeo (10 mg/mL).

### **3.6. Análise de restrição dos plasmídeos recombinantes**

Após a análise em gel, os plasmídeos recombinantes foram submetidos à análise de restrição com a endonuclease *Pst*I para verificar a liberação dos fragmentos de pEA1 obtidos com este sistema de digestão e assim confirmar a clonagem. Os produtos de digestão foram analisados em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo (10 mg/mL).

### **3.7. Determinação das seqüências nucleotídicas dos fragmentos clonados**

Nessa etapa, os plasmídeos recombinantes pUC18 com insertos derivados do pEA1 foram submetidos a uma reação de seqüenciamento utilizando o kit *DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing* (*Amersham Biosciences*) e iniciadores M13 *forward* e *reverse* conforme manual do fabricante. O seqüenciamento foi realizado seguindo o método dideoxi (Sanger & Coulson, 1977) por meio do seqüenciador automático para DNA *MEGABACE 1000* (GE Healthcare).

### 3.8. Desenho de oligonucleotídeos

As seqüências determinadas pelo seqüenciamento foram analisadas utilizando ferramentas de bioinformática. Inicialmente, foram conferidas quanto a sua confiabilidade no programa *Phred* (Ewing *et al.*, 1998) e *BioEdit* (Hall, 1999), em seguida foram retiradas seqüências provenientes do vetor utilizando o programa *VecScreen* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Após esse procedimento, utilizou-se o programa *Cap3* (<http://www.unb.br/ib/cel/biomol>) para montagem de *contigs*, que consiste numa seqüência continua gerada pelo alinhamento de todas as seqüências obtidas. Utilizando o produto do alinhamento (*contig*) como base foi possível desenhar um conjunto de oligonucleotídeos (iniciadores) específicos para o pEA1.

Para construção dos iniciadores foram selecionados entre 18 e 27 nucleotídeos, organizados aos pares (F e R), observando as temperaturas de anelamento, as quais foram estabelecidas próximas uma da outra. A seqüência dos iniciadores pode ser observada na **Tabela 3**.

**Tabela 3:** Iniciadores utilizados para seqüenciamento dos plasmídeos pEA1 e pEA2.4.

<b>Iniciador</b>	<b>Seqüência (5'→ 3')</b>	<b>Plasmídeos</b>
EA1	CGAGAAAATATTTAGTTTAGCTC	pEA1
EA2	CACCTCTCTTTTAGTTTAATTTG	pEA1
EA3	GAGCTAAACTAAATATTTTCTCG	pEA1
EA4	CAAATTAACTAAAAGAGAGGTG	pEA1
EA5	GGTATACTCACTATACCGAGAAATCTC	pEA2.4
EA6	GTGCAAGGTTTGTAAAGAGATC	pEA2.4
EA7	CAAACACCACATATACACGC	pEA2.4
EA8	GTTCTGACGGAGATCAGAC	pEA2.4
EA9	GTCAACCCTTCACAAGCC	pEA2.4
EA10	GAAACAGCAAAGGAAGAAGC	pEA2.4

### **3.9. Amplificação via PCR**

Os iniciadores liofilizados foram diluídos para estoque (100 pmol/ $\mu$ L) em Tris-HCl (2,5 mM; pH=8,0) e posteriormente congelados e mantidos a -20° C até sua utilização. Inicialmente foram testadas variações na temperatura de anelamento através de um gradiente (63° C a 67° C), assim como as concentrações de cloreto de magnésio e dNTPs. A amplificação consistiu dos seguintes reagentes, descrita em condições otimizadas:

DNA plasmidial.....	5,0 $\mu$ L (~30ng)
Iniciador <i>Forward</i> .....	5,0 pmoles
Iniciador <i>Reverse</i> .....	5,0 pmoles
Cloreto de magnésio.....	25 mM
Tampão.....	Tris-HCL (200 mM); KCl (500 mM)
dNTPs.....	2,5 mM
Taq DNA polimerase.....	5 U/ $\mu$ L

O volume da reação de amplificação foi completado para 25  $\mu$ L com água milli-Q.

Os pares de iniciadores (**Tabela 3**) e os demais reagentes foram amplificados em termociclador onde foram utilizadas as temperaturas de anelamento a 63° C e amplificação a 72° C, organizadas da seguinte forma:

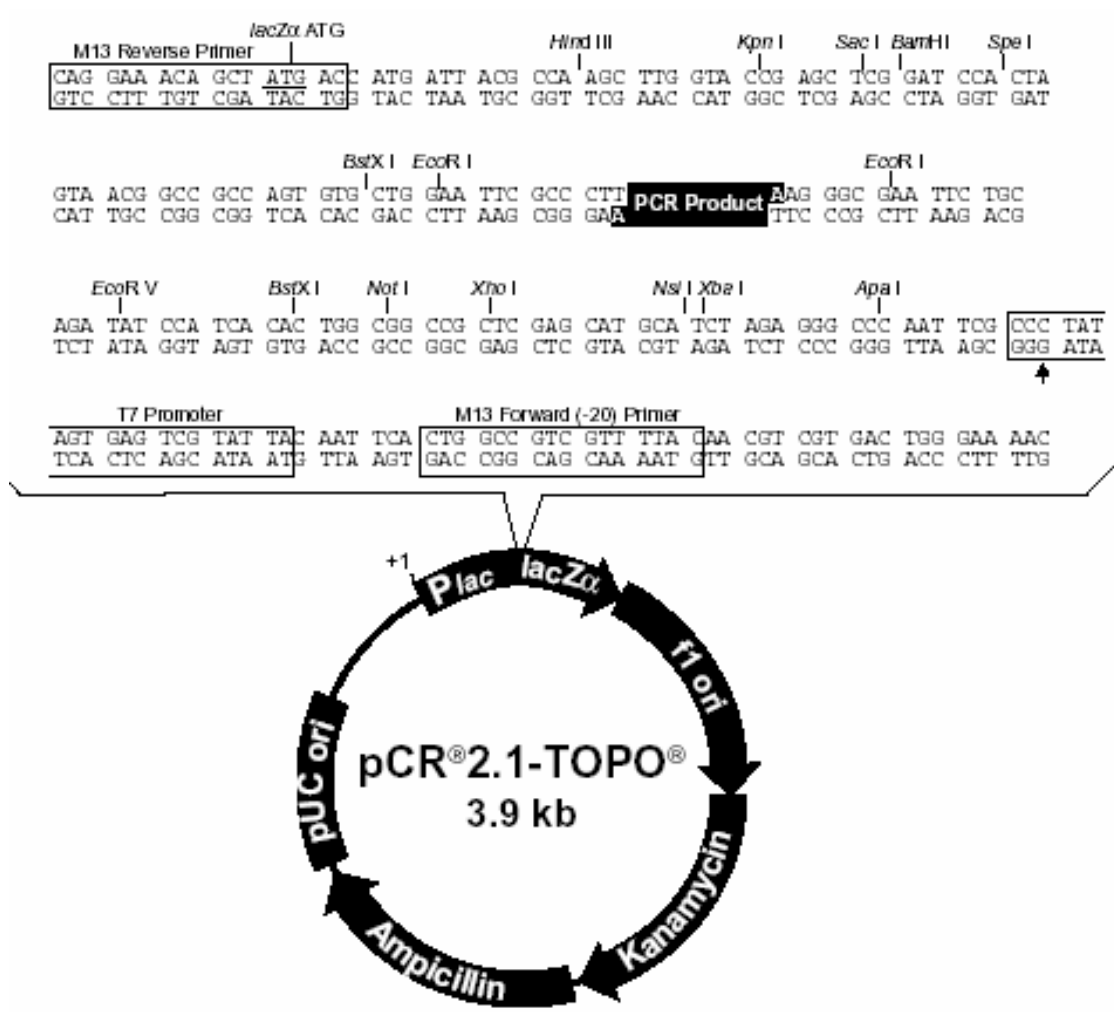
95°C	2 minutos	
95°C	2 minutos	} 35 ciclos
63°C	20 segundos	
72°C	2 minutos	
72°C	2 minutos	
4°C	$\infty$	

Foram aplicados 5  $\mu$ L de cada sistema de PCR em gel de agarose 0,8% para análise, a qual possibilitou a definição do volume de produto amplificado a ser utilizado nos procedimentos de purificação e clonagem.

### **3.10. Construção de plasmídeo para transformar *E. coli* e *E. agglomerans***

Com o conjunto de oligonucleotídeos sintetizados, como descrito no item **3.8**, segmentos de DNA foram amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir do plasmídeo pEA1. Os segmentos amplificados foram purificados com o Kit *Bandprep* (Amersham Bioscience) de acordo com o protocolo descrito no **Anexo B** e clonados no vetor comercial pCR2.1-TOPO<sup>®</sup> (INVITROGEN) demonstrado na **Figura 3**. O pCR2.1-TOPO<sup>®</sup> é um vetor plasmidial linearizado, no qual fragmentos (produtos de PCR) são ligados de forma eficiente utilizando a enzima topoisomerase I, seguindo as instruções do fabricante.

Em seguida foi realizada uma transformação genética por eletroporação utilizando células de *E. coli* linhagem TOPO<sup>®</sup> (INVITROGEN). O sistema de transformação foi semeado em meio de cultura contendo ampicilina (200 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL) (**Anexo C**).



**Figura 3** - Mapa do plasmídeo pCR2.1-TOPO, mostrando os genes de resistência a ampicilina e canamicina e os sítios de restrição para a inserção do produto amplificado.

### 3.11. Análise dos transformantes

O DNA plasmidial das colônias selecionadas foi extraído de acordo com protocolo padrão (**Anexo A**) e posteriormente digerido com a enzima *EcoRI*, uma vez que o vetor pCR2.1-TOPO possui sítios de restrição para esta endonuclease nas extremidades da região onde o fragmento amplificado foi ligado. Além do sistema com *EcoRI*, realizou-se com os plasmídeos recombinantes uma digestão com *PstI* a fim de verificar em qual direção o fragmento de interesse foi ligado ao vetor.

### 3.12. Seqüenciamento do segmento de pEA1 amplificado

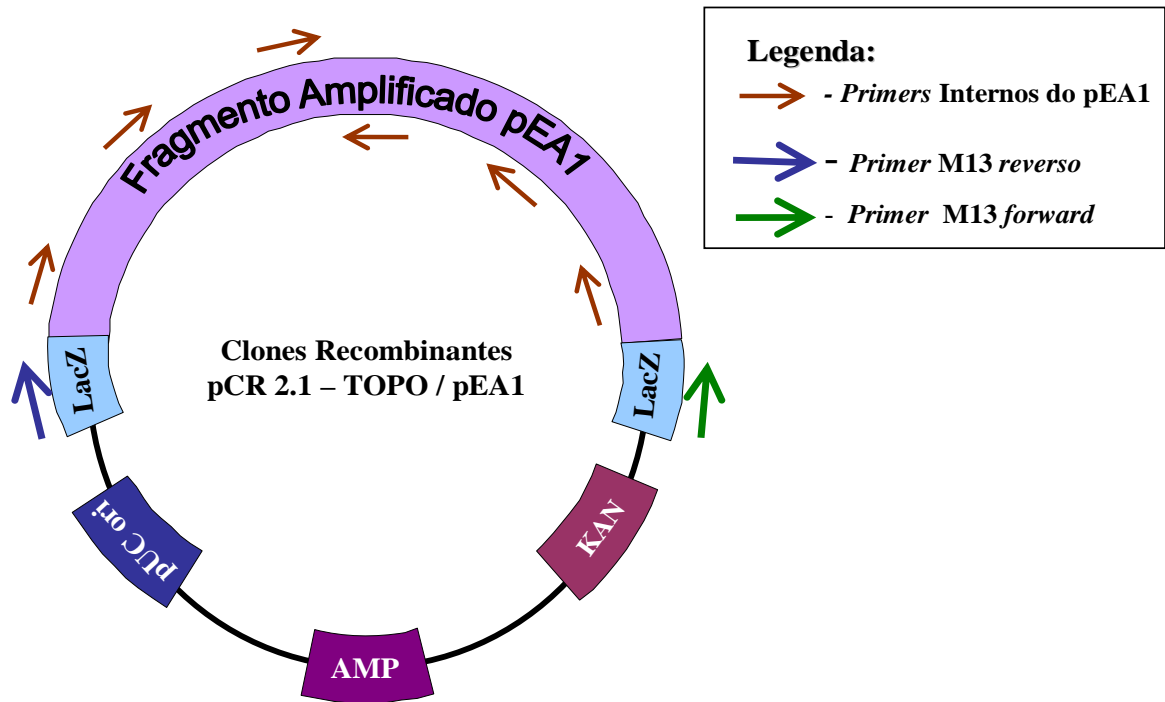
Nas reações de amplificação para seqüenciamento foram utilizados os iniciadores M13 *forward* (seqüenciamento da extremidade 5' do gene) e M13 *reverse* (seqüenciamento da extremidade 3' do gene), os quais anelam nas regiões flanqueadoras do sítio de clonagem múltipla do pCR2.1-TOPO onde foi inserido o fragmento amplificado. Também foram utilizados os iniciadores (**Tabela 3**) que anelam na porção interna do plasmídeo pEA1.

A **Figura 4** demonstra a estratégia de *primer walking* realizada para desenhar mais três pares de oligonucleotídeos internos (**Tabela 3**) para o plasmídeo pEA1 a partir do plasmídeo recombinante pEA2.4 com a finalidade de obter a seqüência completa do fragmento clonado.

Cada reação consistiu em 5 pmoles do iniciador, 100 ng de DNA plasmidial e 2 µL dos reagentes de seqüenciamento (kit *DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing -Amersham Biosciences*). O volume final foi de 10 µL completado com água ultrapura esterilizada.



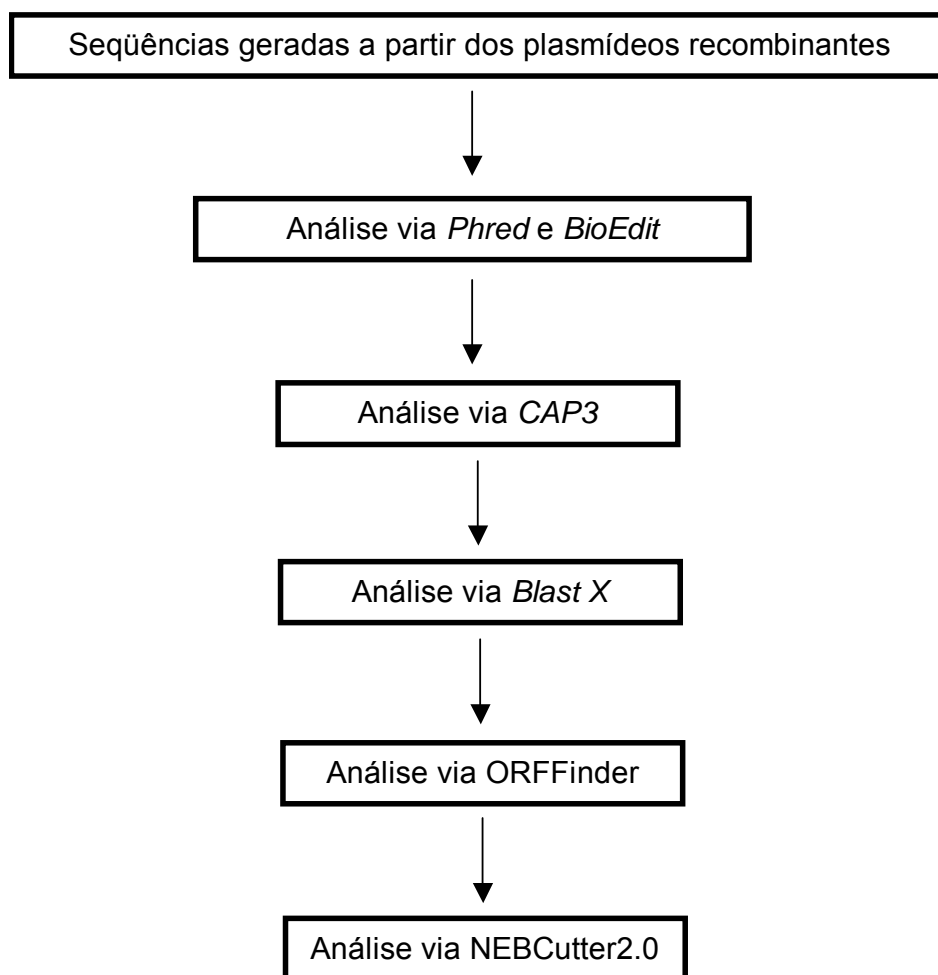
As seqüências geradas foram analisadas por ferramentas de bioinformática como descrito, a fim de determinar a qualidade das mesmas.



**Figura 4** – Estratégia de *primer walking* proposta para determinar a seqüência do pEA1.

### 3.13. Análise dos plasmídeos seqüenciados

A **Figura 5** demonstra a estratégia seguida para analisar os plasmídeos seqüenciados utilizando as ferramentas de bioinformática:



**Figura 5** – Esquema da estratégia seguida para a análise dos plasmídeos recombinantes construídos a partir de um fragmento amplificado do pEA1 clonado em vetor pCR2.1-TOPO.

Os plasmídeos recombinantes foram submetidos a programas de coleta e análise de dados gerados pelo seqüenciador automático, os quais fornecem dois tipos de arquivos, um contendo a seqüência na forma textual e outro compreendendo o cromatograma ou eletroferograma, o qual indica dados qualitativos da seqüência formada.

Para os plasmídeos seqüenciados foram efetuadas no mínimo três reações de amplificação com cada de iniciador (**Tabela 3**). As seqüências geradas desta maneira precisam ser ordenadas para formarem um conjunto de seqüências que cobre todo o fragmento clonado.

Inicialmente, as seqüências geradas foram submetidas ao programa Phred e BioEdit, os quais analisam a qualidade do cromatograma, ou seja, da seqüência obtida a partir do seqüenciador. Posteriormente, no programa CAP3 fez-se a montagem dos *contigs* pelo alinhamento das regiões sobrepostas nas seqüências analisadas obedecendo aos sentidos *Forward* ou *Reverse* designados pelos iniciadores internos. Os sentidos dos iniciadores foram estabelecidos de acordo com os *primers* M13 (F e R). E finalmente a visualização dos dados gerados pelo CAP3 foi efetuada pelo programa BioEdit, o qual além de verificar a qualidade de cada base, transforma uma seqüência em seu reverso complementar, ou seja, gera a partir dos *contigs* obtidos em ambos os sentidos (F e R) um *contig* em única direção revelando a seqüência completa do plasmídeo em estudo.

De posse da seqüência completa do segmento clonado foi realizada uma busca de todas as possíveis ORFs (*open reading frame*), ou seja, a parte do gene que é decodificada em proteína, em todas as fases possíveis, através do programa ORFFinder e a construção do mapa do plasmídeo pelo programa

NEBCutter2.0. Todas as análises foram realizadas utilizando a estrutura disponível no laboratório de bioinformática – CAM (Centro de Apoio Multidisciplinar) da Universidade Federal do Amazonas.

### **3.14. Transformação genética da *E. agglomerans***

Para a transformação genética da *E. agglomerans* com o vetor construído, foi testado o método de transformação química utilizando solução de  $\text{CaCl}_2$  e choque térmico a  $37^\circ\text{C}$  por cinco minutos, foram utilizados como agentes seletivos ampicilina e canamicina.

Inicialmente foi estabelecida a curva de crescimento da *E. agglomerans* medindo a absorbância a 600 nm. No preparo de células competentes, uma colônia isolada de *E. agglomerans* foi pré-inoculada em 5 mL de LB e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  durante 16 horas. Posteriormente foram inoculados 0,5 mL desta cultura em 50 mL de LB e o cultivo foi processado sob forte agitação (150 rpm). Foram testadas as seguintes O.Ds:  $0,25U_{\text{ABS600/mL}}$ ,  $0,85U_{\text{ABS600/mL}}$ ,  $1,3 U_{\text{ABS600/mL}}$  e  $2,0U_{\text{ABS600/mL}}$ . Para cada amostra foram coletados 30 mL da cultura e centrifugados por 15 minutos a 2.500 g ( $4^\circ\text{C}$ ). O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspensão em 15 mL de solução Tris-cálcio estéril (mantida a  $4^\circ\text{C}$ ). As células foram mantidas no gelo durante 20 minutos e em seguida centrifugadas por 15 minutos a 2.000 g ( $4^\circ\text{C}$ ). O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas com 1 mL de Tris-cálcio e incubadas por 45 minutos no gelo. O processo de transformação ocorreu adicionando-se 5  $\mu\text{L}$  (50  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) do plasmídeo construído ao microtubo contendo 100  $\mu\text{L}$  de células competentes. O sistema foi mantido no gelo por 45 minutos e submetido a um choque térmico de  $37^\circ\text{C}$  por 5 minutos. Em seguida foi

adicionado 1 mL de LB e o sistema foi incubado por 1 hora a 37° C sem agitação para recuperar as células. Foram utilizados 50 µL (50 ng/µL) do sistema para semear em meio LB-ágar sem NaCl contendo ampicilina (100 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL).

### **3.15. Meios de cultura**

#### **3.15.1- LB-ágar (Luria e Bertani)**

Peptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
Água Mili-Q	1000 mL
(pH=7,5)	

Para a esterilização, o meio foi autoclavado a 120 °C por 20 minutos.

#### **3.15.2 - LB-líquido**

Ao meio LB-líquido foi suprimido o ágar. Em seguida foi autoclavado por 20 minutos a 120 °C.

#### **3.15.3 - LB-Soft**

Peptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
NaCl	10 g
Agar	8 g

Água Mili-Q	1000 mL
(pH=7,5)	

Para a esterilização, o meio foi autoclavado a 120 °C por 20 minutos.

### **3.16 - Soluções e tampões (v/v)**

#### **3.16.1- Álcool 70 %**

Álcool (100 %)	700 mL
Água Mili-Q	300 mL

#### **3.16.2 - Tampão de amostra 5X**

TEB 10X	50 mL
Azul de bromofenol	10 mg
Glicerol	20 mL
Água destilada	30 mL

#### **3.16.3 - Tampão R (TR)**

Tris HCl 1 M (pH=8,0)	1 mL
EDTA 0,1mM	20 µL

Após a mistura a solução foi fervida em forno de microondas e armazenada a 4°C.

#### **3.16.4 - Tris-cálcio**

Tris-HCl 10mM pH 7,5; CaCl<sub>2</sub> 70 mM.

A solução foi esterilizada por fervura em forno de microondas.

### **3.16.5 - Gel de agarose 0,8 %**

Agarose 0,8 g

Tampão TEB (1X) 100 mL

A suspensão foi fervida em forno microondas, resfriada e só então vertida na “cama” para gelificar.

### **3.16.6 – Tampão TEB 10X (1 litro)**

Trisma Base 0,89 mM

Ácido bórico 0,89 mM

EDTA 0,0089 mM

pH= 8,0 – 8,4

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Isolamento do plasmídeo pEA1 e construção de plasmídeos recombinantes

Em estudos realizados por Mourão (2001) verificou-se que a *Enterobacter agglomerans* dentre 10 isolados bacterianos endofíticos foi à única que apresentou um pequeno plasmídeo natural, sendo este provavelmente multicópia (pEA1).

O plasmídeo pEA1, foi submetido à análise de restrição com 16 endonucleases diferentes. Essa análise mostrou que das enzimas testadas apenas *Accl*, *PstI* e *HaeIII* clivaram o referido plasmídeo, contudo, o melhor padrão de clivagem foi obtido através da enzima *PstI*, a qual cliva o DNA em apenas dois sítios específicos para esta enzima facilitando a manipulação dos fragmentos obtidos. A enzima *Accl* lineariza o pEA1, porém seria difícil clonar o fragmento linearizado uma vez que se trata de uma enzima que pode cortar em duas opções no sítio específico para esta endonuclease, além de seu sítio não estar disponível em *polylinkers* dos vetores usuais de clonagem como o pUC18. Com a enzima *HaeIII*, o pEA1 foi praticamente todo fragmentado.

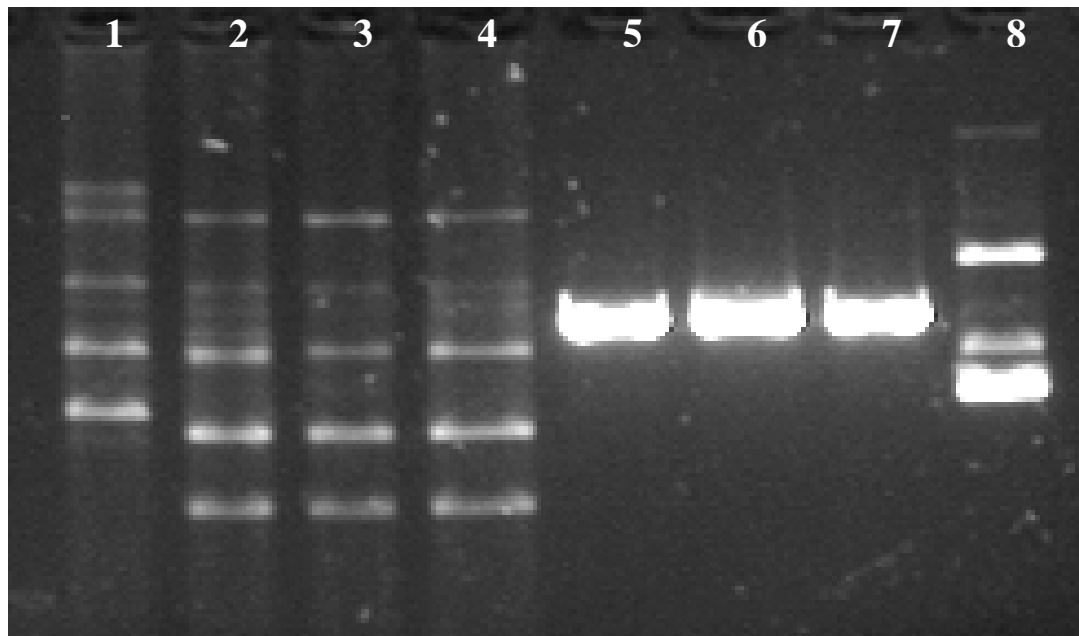
No perfil de restrição, demonstrado na **Figura 6**, observa-se a digestão parcial do plasmídeo pEA1 com *PstI*, onde dois fragmentos foram liberados, com cerca de 1.000 pb e 1.500 pb respectivamente. O pUC18, como o esperado, apresentou um único fragmento resultante da linearização, pois este apresenta apenas um sítio de restrição para esta enzima.

O plasmídeo recombinante pEA1.0 foi construído pela clonagem do fragmento de 1.000 pb no vetor pUC18 como demonstrado na **Figura 7**. Por

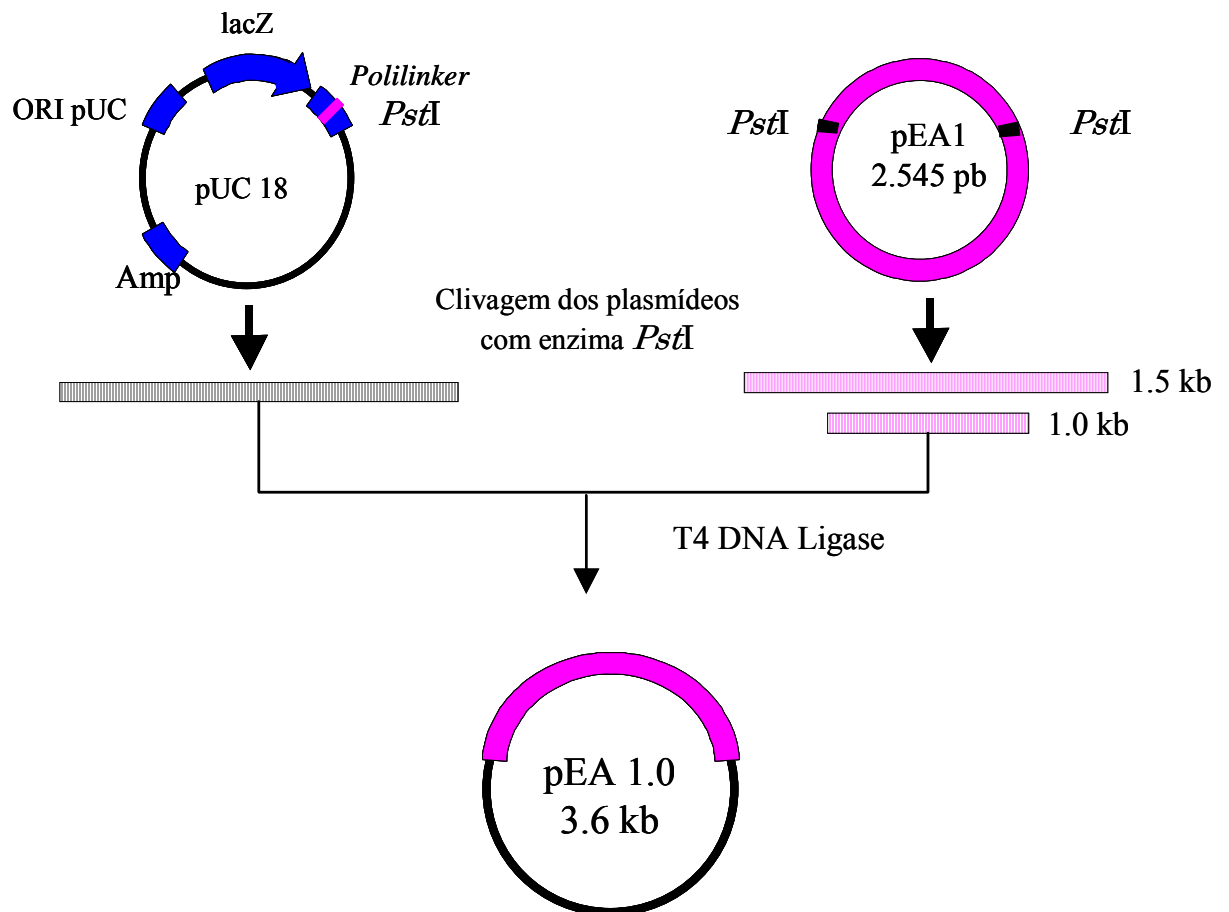


análises eletroforéticas observou-se o tamanho deste plasmídeo em cerca de 3.6 kb conforme esperado, uma vez que o inserto foi ligado ao vetor de clonagem de 2.686 pb.

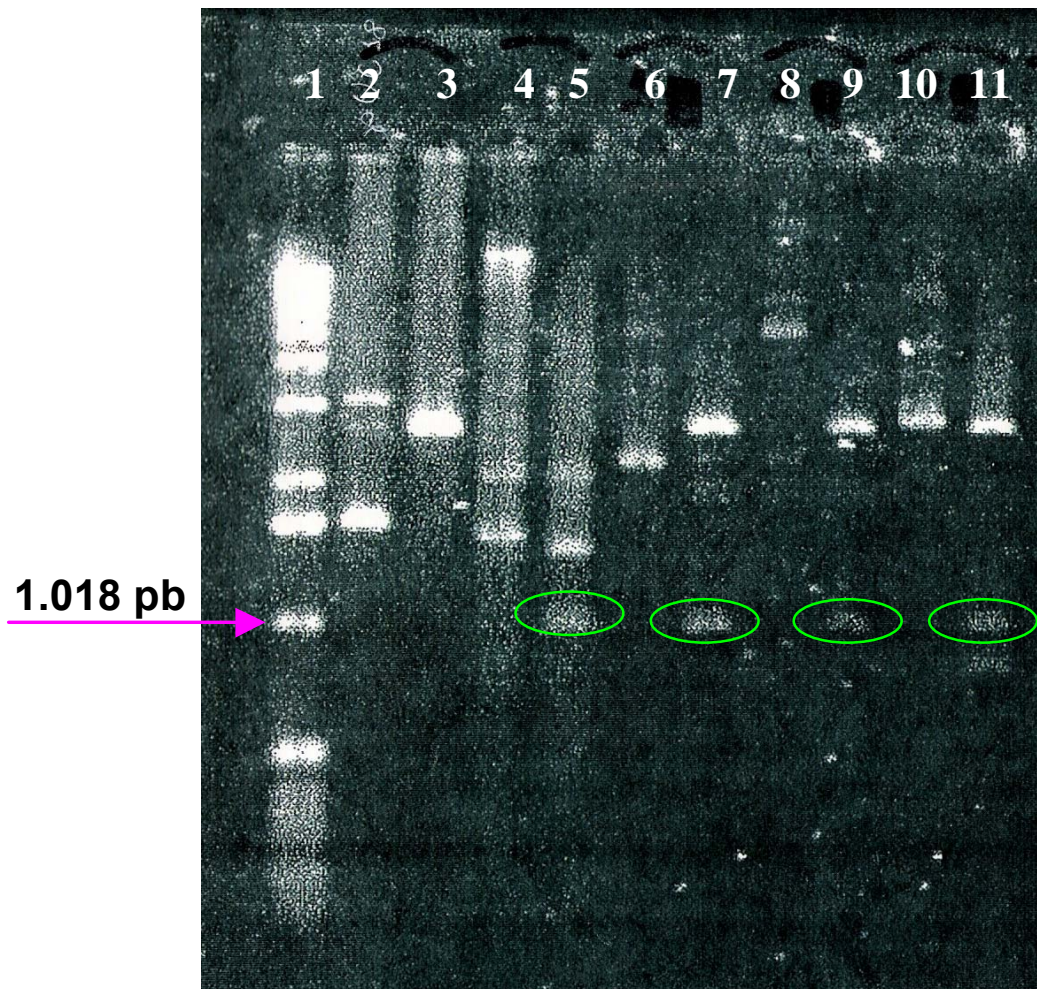
Para confirmar a obtenção do plasmídeo recombinante pEA1/pUC18 denominado pEA1.0, realizou-se análise de restrição com *Pst*I destes plasmídeos a fim de verificar a liberação dos fragmentos correspondentes a 1.000 pb (**Figura 8**).



**Figura 6** – Perfil de restrição com *PstI* dos plasmídeos pEA1 e pUC18 com a enzima de restrição *PstI*. 1- pEA1 intacto; 2, 3 e 4- pEA1 digerido (parcialmente); 5, 6 e 7- pUC18 digerido; 8- pUC18 intacto.



**Figura 7** - Construção do plasmídeo recombinante pEA1.0. Fragmento *PstI* (1000 pb) do pEA1 clonado em vetor pUC18.



**Figura 8** - Perfil de restrição de *Pst*I dos plasmídeos pUC18 e pEA1.0. 1- 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); 2- pUC18 intacto; 3- pUC18 digerido; 4- pEA1 intacto; 5- pEA1 digerido; 6, 8, 10- pEA1.0 (pEA1/pUC18) intacto; 7, 9, 11- pEA1.0 (pEA1/pUC18) digerido.

#### 4.2. Caracterização dos clones recombinantes pEA1.0

A partir da confirmação dos clones recombinantes com enzimas de restrição, iniciou-se a etapa de análise da seqüência nucleotídica do plasmídeo pEA1.

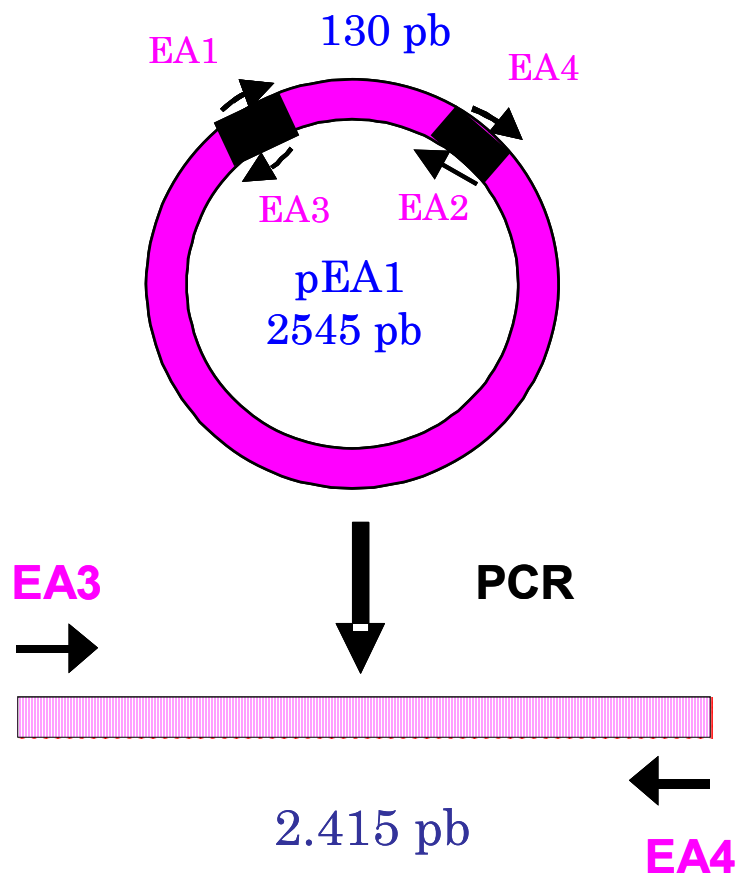
Os fragmentos de pEA1 clonados no vetor pUC18 foram parcialmente seqüenciados pelo Método de Sanger *et al.* (1975) utilizando os iniciadores M13 *forward* e *reverse* conforme descrito na estratégia experimental.

Doze clones recombinantes com inserto de 1,0 kb foram seqüenciados utilizando os *primers* M13 *Forward* e *Reverse*, porém as melhores seqüências obtidas foram as produzidas com o *primer* M13 *Forward*. Essas seqüências apresentaram tamanho entre 100 e 600 pb com 98% de confiabilidade, foram alinhadas com o programa BioEdit, e gerou-se um *contig* que serviu para desenhar dois pares de *primers* específicos para o referido plasmídeo.

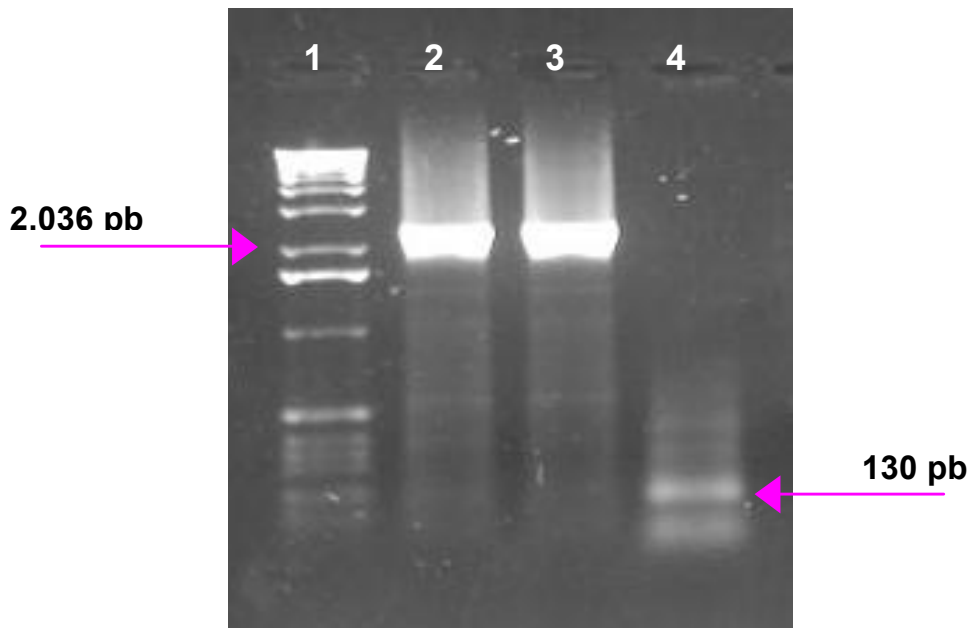
#### 4.3. Amplificação das primeiras seqüências de DNA do pEA1

A partir do *contig* formado com as seqüências nucleotídicas obtidas do pEA1.0 foram sintetizados dois pares de iniciadores internos demonstrados na **Tabela 3**. Com estes pares de iniciadores foram amplificados dois segmentos a partir do plasmídeo natural pEA1, um de 130 pb (par EA1/EA2) e outro de 2.415 pb (par EA3/EA4) respectivamente (**Figura 9**).

A otimização das reações de amplificação (PCR) com estes iniciadores permitiu a obtenção dos fragmentos esperados demonstrados na **Figura 10** e assim foi possível clonar praticamente todo pEA1 em vetor de clonagem.



**Figura 9** - Estratégia seguida para amplificação de segmentos de DNA do pEA1.



**Figura 10** – Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do pEA1 com os dois primeiros pares de *primers* específicos. 1- 1Kb DNA Ladder (Invitrogen); 2 e 3- fragmento com 2.415 pb; 4- fragmento com 130pb.

#### 4.4. Construção de um vetor bifuncional pEA2.4

O plasmídeo pEA2.4 construído a partir de um fragmento amplificado de 2.415 pb (pEA1) clonado em pCR2.1TOPO (**Figura 11**) foi utilizado para transformar geneticamente as bactérias *E. coli* e *E. agglomerans* pelo método Tris-Cálcio/choque térmico. Este método consiste em induzir o estado de competência genética da bactéria hospedeira por tratamento com cloreto de cálcio e em seguida incubar o sistema de transformação a 42° C por três minutos ou a 37° C por 5 minutos.

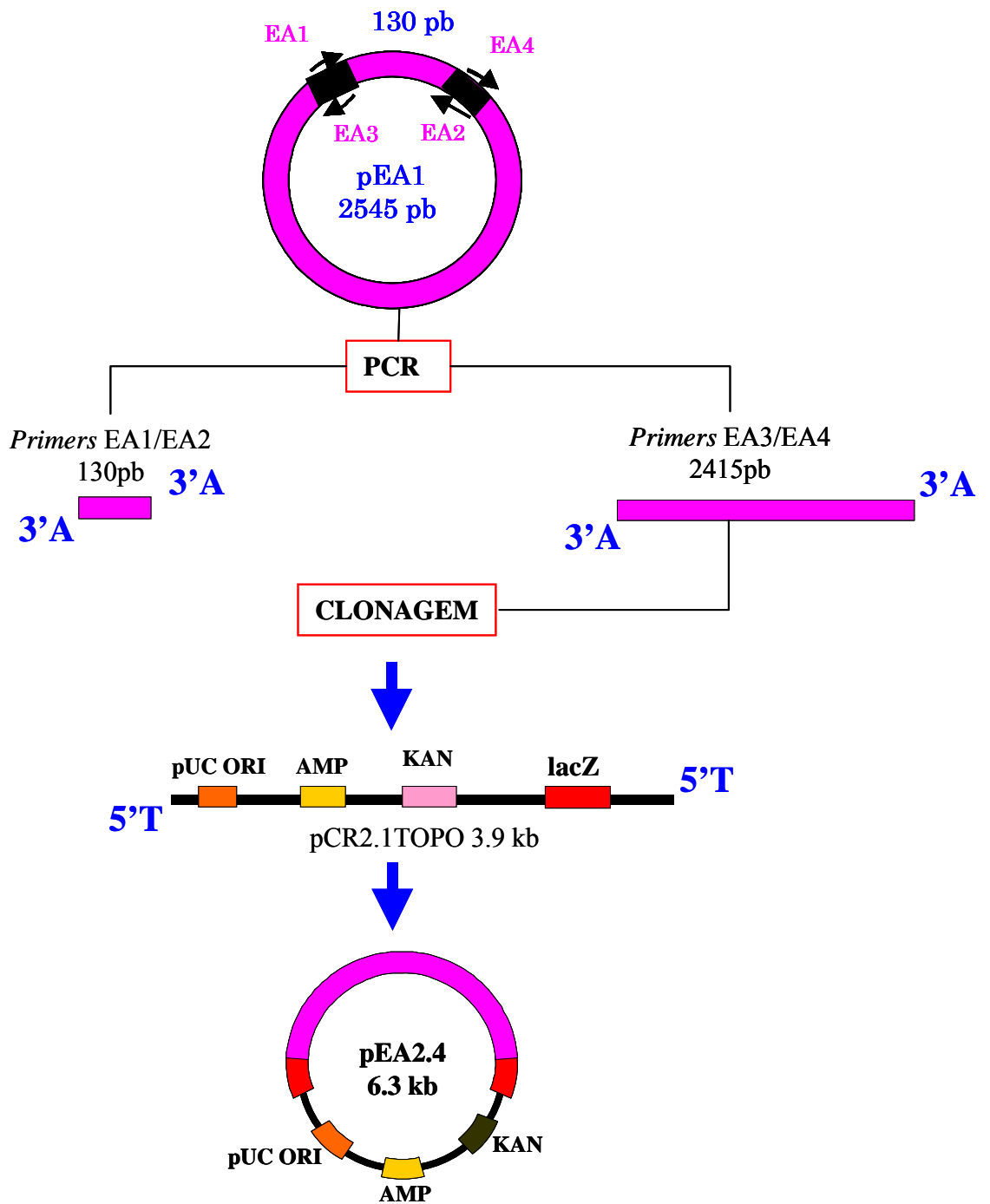
Para preparo células competentes de *E. agglomerans*, verificou-se que das ODs testadas a 600 nm: 0,25; 0,85; 1,3 e 2,0 apenas com esta última ocorreu diminuição na eficiência de transformação, isto deve ter ocorrido devido as células estarem iniciando nesta densidade ótica a fase estacionária.

A partir da transformação genética, foi possível introduzir o pEA2.4 em células de *E. agglomerans* tornando-a resistente a canamicina. Como controle, para verificar se a transformação de *E. agglomerans* era garantida pelo fragmento de 2.415 pb do plasmídeo pEA1 utilizou-se um plasmídeo construído a partir de um fragmento amplificado (2 kb) do genoma de HPV (Papilomavírus Humano) clonado no vetor pCR2.1TOPO (Santos, 2006). Este plasmídeo não foi capaz de transformar *E. agglomerans*, evidenciando o caráter bifuncional de pEA2.4, uma vez que a origem de replicação derivada de pUC18 presente em pCR2.1TOPO não funcionou na bactéria no presente estudo.

A eficiência da transformação da *E. agglomerans* com pEA2.4 extraído de *E. coli* foi de  $5 \times 10^4$  T/ $\mu$ g, enquanto que a transformação desta bactéria com o pEA2.4 extraído da própria *E. agglomerans*, apresentou eficiência 1 ordem de grandeza maior ( $5,1 \times 10^5$  T/ $\mu$ g). Esse resultado sugere que ocorreu alguma



modificação no plasmídeo durante a sua passagem por *E. agglomerans*, melhorando a sua capacidade de transformação, o que lembra o sistema de restrição/metilação e sugere a existência de um sistema de enzima de restrição neste isolado de *E. agglomerans*. De fato, observa-se na literatura científica a existência da enzima *Eagl* isolada de *E. agglomerans* ATCC (Tribioli *et al.*, 1992).



**Figura 11** - Construção do plasmídeo recombinante pEA2.4. O fragmento amplificado (2.415 pb) foi clonado em vetor linearizado pCR2.1TOPO originando um plasmídeo que codifica resistência a ampicilina e canamicina.

## 4.5. Análise das seqüências de pEA1

### 4.5.1. Montagem dos *contigs*

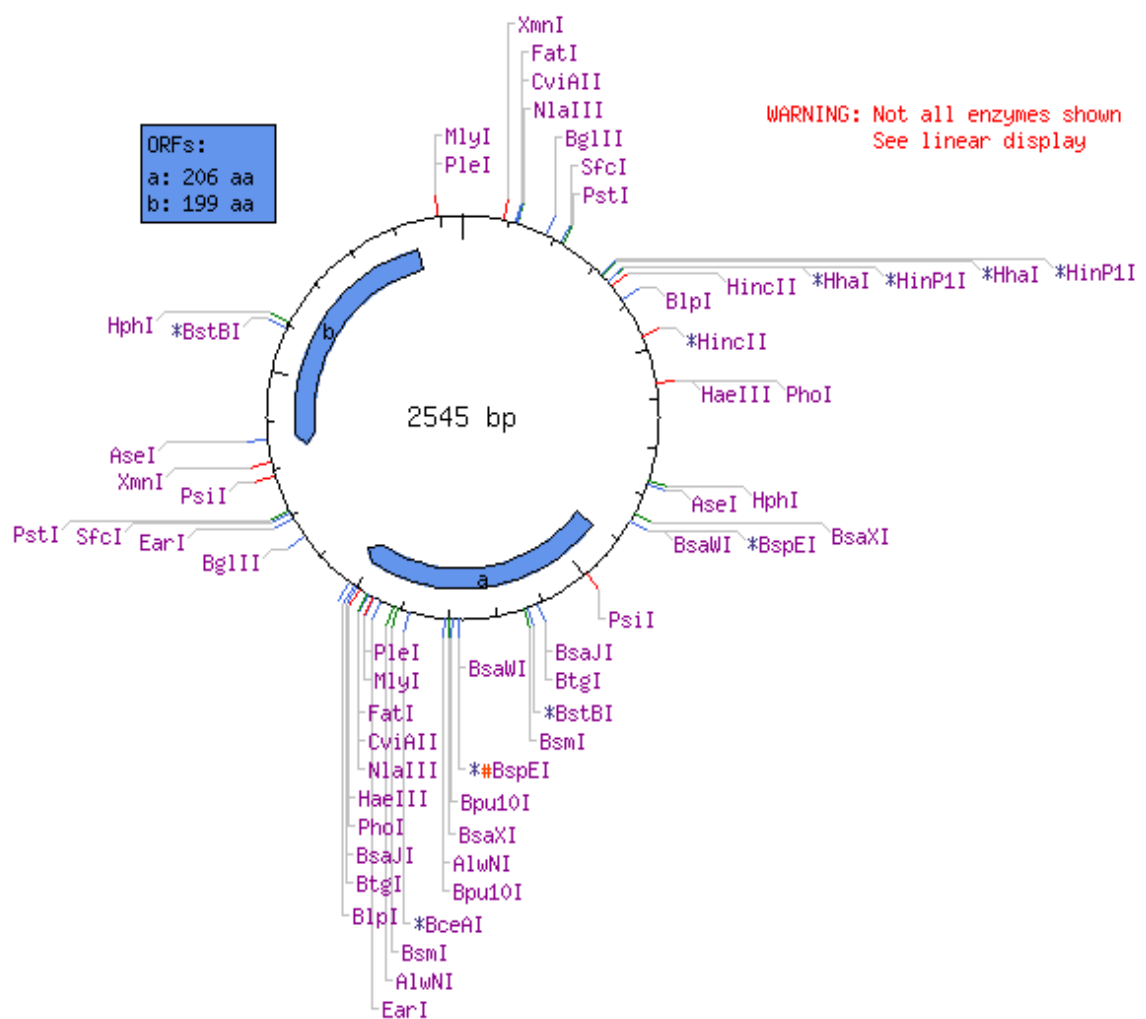
O fragmento amplificado de pEA1 clonado no vetor pCR2.1-TOPO foi totalmente seqüenciado. As seqüências obtidas utilizando os cinco pares de iniciadores internos para o pEA1 formaram dois *contigs*, um no sentido *Forward* e outro no sentido *Reverse*. A partir destes *contigs* e utilizando a ferramenta BioEdit foi possível montar no sentido 5' → 3' um único *contig* revelando a seqüência completa do plasmídeo pEA1 (**Figura 12**).

```
GAGCTAAACTAAATATTTTTCTCGTTTTTTTCAAAAAAACGATACGAATAGTAACTCAGGAGAGACTATTAGTAACTC
AGGAGAGAAAAAATTCTCTCAGGAGAGAAATTTTTTACATGTGAGAGACTAGACCGTTAGGTTTTACGGGGGTACAG
ACCCCTTAAGAATATAAGAAATATAAGATCTAAGAGGATTC AACCTAGTCCCAGCCCTATCTGCAGAACTTGCCAGGC
TACGCAAAAGAAAACCCCTTCCGGGAGATGTGTTTTTCGCTACCGCTACAACAGACGTTTTCCCGTTCCGGGCAATACA
TAAGCAATCTGCGCAGATTTCCCTACCGCGCTTCGCTTGGTCAACCCTTCAAGCCAAAAATAAAAATTTTGACTTGC
TCAGCGTTCTGTCTTTTTTTCTTTTTATTGGTAATCGTGAGTAAGGGGGAATTTAATTTCCCTTGCAGGGGATTGATC
CGTTGACTTTTTGTTTTTTTTATTGTAGATGTATTTATAGATTTTTCAATTTTGCAGAAAGGTATACTCACTATACCGAG
AAATCTCGTGTGAGCCTGGCAGGGGCCAAAAAGAAAAAACTTACTGCTTTTACGGGAGGTTTTCAAATATGGCTT
ATGCAATTTAAGAGTGGAAAAACAAAAATACTTCAATAGCTGGTAAAAATTTCTCACAATATGCGATTGAGAAAA
CACATAATGCAGATCCTAACCTTAAATCCCAAAACCGAATTTAATCGGTTCTGGTGATTTAAGGACTGATATTAATG
CAAGGTTTCAAGCAACCAATGTTAAAGCTCGTAATTTCTACTTCTGTTATTTGTAATGAATTAGTTTTAACAGCTTCTC
CGGAATTTTTTGCAAATAGCAAAAAATTTAGAGGATTGGATTAAGGTTCAAATGGAATATTTGCATAATGAATATGGA
GAAAATGCAATAAATGCAGTTTTTACATTTAGACGAGCAAACACCACATATACACGCTTTTTATAACTCCAATCGAAAA
AAAAACGGAATATATAAACTAAACAATAAATCGTATATGAAAAATACGAAACAATGCAGGATATATATTTTTAAATAC
AATAAGCCATTGGGTTTTAATCCCGTGGGATTA AAAAAGAGGTTTCGAATGCAGAAATATAAGGAAGTTAAAGAATTTTAC
AGCGATATTA AAAACATTA AAAATGAAACCGAATTAGAAATAGAAAATAACAAAATTGAAAAATTAGAGTTGTTGAA
ACAGAAGAAAAGAAAAAATATTTAGAGATCCGGAGGTAGTGCCTAAGCACTACACAGGAGCTGAGGTTAATCGTTAC
ATACGAAAAGCTCTAAAACCTTACAAGAACGAACGAAAGCCCTTATAGCTCGTCTAAACGGGTTAAGAGCCGTTTA
GAGCATTCAGAGGCTGAGTTGTCTGATCTCCGTGAGA ACTTCAACAGAAGAGTCCAGGAACGGGTACAACATGAGCAA
AAGTTAGCAGTGGCCAGAGCCACGGCTGAGCAAGAACAATCATTTAAAATAAAAACAGAAAAATAAAAGATATGGAG
TTGGAATAATAGAATACAAAAGGCAGTTAAAGGAAAATGCTTCAATTTCTCAGAGATATGAAAAATATAAAATTAAC
AGTGATGTTTTAGATCTAATACAAGAGCATAAACCGGCAGAAATTTAAACA ACTTCAATGC TGCTATTGCTGCAGCA
GATGCCGAATATTCACAGAAAACAGCAAAAATAA ACTACACACCCCGAATAAGCCAAAGGCTTTAAAATTTATAAAGC
CCGGAACGGGAAACAGTGAAAAATTTCCCGTTGGGTTTTGGTTTTTTAAGCATATCGATCCAATCTTTCATTAATGCT
TTTTAAATCTGCTTCTCTTTGTTTTTCTTCTCCTTAATTCGGATCTCTTTAACAAAACCTTGCACGATCGCCATTA
TACAATTGCAGGATTTATATAAAAATATGTATTTCTTAAACAGACTTTGCGATCATTTTTCTTTTCTAATAGTTCTTTTAA
TCCACGATAATAAACAGCTTTTGAAATAGTATAATCATATTTTTTCAGCTTCTCCTTTGCTGTTTCGAAATTTAAGTA
AATTTGCTCACC GCCGATTGCTTTTTGGTAAATACCATAATCAAGAAAAATAATTTAAACCTGTTTGAGTTAAATC
GAAATAGAATTTAATTTGACCAGTAAACAGCTTTAAAAATTCCTCTTTATCTACTTCTTGGATTTGTGAAATTTGTTGT
AGTAAAAACTCCTTCTCGGTTTCTAATTCGAACTCGATCAACAGTTAGCTTTTTCTTTTTTAGTATCAATTTCCAT
ATTGAACACGAAAGGATTTTCTTGTGTTCAATATCAAAATCCTCAGTATTTTTCAGCATTGTTTAACTGTAATACTC
TATATTTATTTTTCTTTTTTCAAAAACCTCTCTTTTAGTTTTAATTTGTATATTTTTTGAACGGGTTTTTTCTCACTCG
ATGAGACTCGTTTTCTCATTTTTTAAACAGATTTTTGAAACTAGTCAAGA
```

**Figura 12** – Seqüência completa do plasmídeo pEA1 com 2.545 pb.

#### 4.5.2. Construção de um mapa de restrição do pEA1 e análise das ORFs

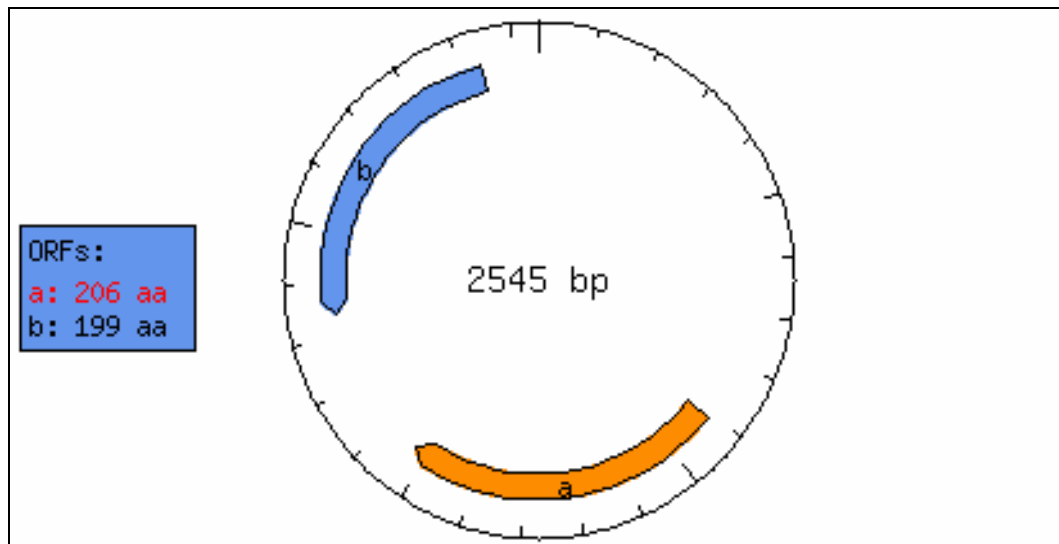
A **Figura 13** mostra o mapa de restrição do pEA1 elaborado pela ferramenta NEBcutter2.0, ratificando a presença dos dois sítios de *Pst*I neste plasmídeo.



**Figura 13** - Mapa de restrição do plasmídeo pEA1.

A análise das seqüências mostrou que o plasmídeo pEA1 tem 2.545 pb, com índice GC de 34% e AT de 66%. Comparando a seqüência do pEA1 com o banco de dados, observou-se alta similaridade (62%) com a seqüência do plasmídeo pIGMS31 (2520 pb) de *Klebsiella pneumoniae*. Utilizando as ferramentas BlastX e ORF finder, o resultado demonstrou a presença de duas ORFs (**Figura 14**).

A ORF1 com comprimento de 206 aa, apresentou homologia ( $E = e^{-98}$ ) com a ORF2 do plasmídeo pIGMS31 (AY543072.1) isolado de *Klebsiella pneumoniae*, enquanto que a ORF2, com 199 aa teve homologia ( $E = e^{-38}$ ) com uma proteína hipotética ECA1645 (NC004547.2) de *Erwinia carotovora*, uma enterobactéria patogênica tanto para humanos como para plantas. Bell *et al.* (2004) relatam a determinação da seqüência genômica deste patógeno (linhagem SCRI1043), agente causador de doenças em batatas.



**Figura 14** - Mapa do pEA1 mostrando as duas possíveis ORFs presentes no plasmídeo.

## 5. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

- O plasmídeo pEA1, nativo de *E. agglomerans* foi totalmente seqüenciado;
- O plasmídeo pEA1.0 mostrou 62% de similaridade com o plasmídeo pIGMS31 de *Klebsiella pneumoniae*;
- Foi possível demonstrar o caráter bifuncional do pEA2.4 pois este plasmídeo foi capaz de transformar tanto *E. coli* como *E. agglomerans*
- O plasmídeo bifuncional *E. agglomerans/E. coli* contém sítios de restrição que facilitam as técnicas de clonagem, possui duas marcas de seleção que são funcionais para ambas as bactérias e é estável nas mesmas na presença de antibióticos;
- O fato de ter sido possível transformar geneticamente a bactéria *E. agglomerans* e pelas características de sensibilidade e crescimento vigoroso em meios de cultivo usuais, abre a perspectiva do uso deste microrganismo como hospedeiro para expressão de genes heterólogos;
- Como a linhagem de *E. agglomerans* do presente estudo é endofítica, o sistema pEA2.4/*E. agglomerans* poderá ser então utilizado para expressar genes heterólogos em plantas, especialmente em *Copaifera multijuga* (copaíba).

## 6. Referências bibliográficas

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Biologia Molecular da Célula*. 3 Ed. Porto Alegre, 1997.

ARAÚJO, W.L. A comunidade bacteriana endofítica de citros e sua interação com *Xylella fastidiosa*, agente causal da Clorose Variegada dos Citros (CVC). Piracicaba: ESALQ/USP, 131p. Tese de Doutorado, 2000.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; MACCHERONI, JR. W.; FUNGARO, M.H.P.; ANDREOTE, F.D.; SOUZA, L. A.; LACAVA, P.T.; AZEVEDO J.L. Biological control of plant diseases by endophytic bacteria expressing a heterologous protein from *Bacillus* sp. In: R. Sheves & J. Macke (Eds.), IUPAC Chemrawn XIV Conference in Green Chemistry, Univ. Colorado, Boulder, 2001a.

ARNOLD, W.; RUMP, A.; KLIPP, W.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. Nucleotide sequence of a 24, 206-base pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* 203, 715-738, 1988.

ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J.O.; XAVIER, M. A. S.; SANQUINO, E. C. B.; SANTOS, E. B. P.; BORGES, L. S. *Noções básicas de tecnologia do DNA recombinante*. Universidade do Amazonas, 1996.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR.W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *EJB: Electronic Journal of Biotechnology* [on line]. 3: 40-65, 2000.

AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: *Ecologia Microbiana*. Eds. MELO, I. S. e AZEVEDO, J. L. Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, p.445-461, 1998a.

AZEVEDO, J. L. *Genética de microrganismos*. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1998b.

AZEVEDO, J. L. *Microrganismos endofíticos*. In: *Ecologia Microbiana*. Eds. MELO, I.S. e AZEVEDO, J.L. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p.117-137, 1998c.

BARY, A. Morphologie Physiologie der Pilze. Flechten, und Myxomyceten. Vol. II. Holmeister's Handbook of Physiological Botany, Leipzig, 1866.

BEJI, A.; MARGAERT, J.; GAVINI, F.; IZARD, D.; KERSTERS, K.; LECLERC, H.; DE LEY J. Subjective synonymy of *Erwinia herbicola*, *Erwinia mitleiae* and *Enterobacter agglomerans* and redefinition of the taxon by genotypic and phenotypic data. Int. J. Syst. Bacteriol. 38, 77-88. 1988.

BIRGE, E. A. Bacterial and Bacteriophage Genetics. Springer-Verlag. New York. 45 pp. 1994.

BOLIVAR, F.; RODRIGUEZ, R. L.; BETLACH, M. C.; BOYER, H. W. Construction and characterization of new cloning vehicles I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. Gene, 2 (2); 75-93. 1977a.

DI FIORI, S.; DEL GALLO, M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plants. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; DE ZAMAROCZY, M. Ed. Azospirillum VI and related microorganisms. Berlin: Springer-Verlag, p. 169-187, 1995.

DOWNING, K. J.; LESLIE, G.; THOMSON, J. A. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac7 and *Serratia marcescens* chiA gene in sugarcane-associated bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 66: 2804-2810, 2000.

DYE, D. W. A taxonomic study of the genus *Erwinia* II. The "Corotovora" group. N Z J Sci. 12, 81-97. 1969a.

DYE, D. W. A taxonomic study of the genus *Erwinia* III. The "Herbicola" group. N Z J Sci. 12, 223-236. 1969b.

EWING, W. H.; FIFE, M. A. *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck) comb. Nov. (the herbicola-lathyri bacteria). Int. J. Syst. Bacteriol, 22:4-11. 1972.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. Genome Res, 8:186-194, 1998.



FAHEY, J. W. Endophytic bacteria for delivery of agrochemicals to plants. In: Biologically active natural products. American Chemical Society, 120-128.1998.

GAVINI, F.; MERGAERT, J.; BEJI, A.; MIELCARECK, C.; IZARD, D.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) EWING & FIFE 1972 to *Pantoea dispersa* sp.nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39, 337-345. 1989.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Bioedit (Biological Sequence Alignment Editor). Nucleic Acids Symposium. 41:95–98, 1999.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agriculture crops. Canadian Journal of Microbiology, 43: 895-914, 1997.

HOPWOOD, D. A.; WRIGHT, H. M. Genetic studies on SCP1-prime strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Gen Microbiol 95:107–120, 1976.

KLEEBERGER, A.; CASTORPH, H.; KLINGMÜLLER, W. The rhizosphere microflora of wheat and barley with special reference to gram-negative bacteria. Arch. Microbiol. 136, 306-311, 1983.

KLINGMÜLLER, W.; HERTERICK, S.; MIN, B.W. Selftransmissible nif-plasmids in *Enterobacter*. In “Nitrogen Fixation with Non-legumes” (SKINNER, F. A.; BODDEY, R. M.; FENDRIK, J. Eds.), pp. 173-178. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 1989.

KREUTZER, R.; SIDDAVATTAM, D.; KLINGMÜLLER, W. Contrascripton of electron transport protein genes nifJ and nifF in *Enterobacter agglomerans* 333. J.Bacteriol. 173, 3252-3256, 1991.

LONGO, A. C. Transformação genética e variabilidade detectada por RAPD em isolados endofíticos de *Colletotrichum musae*. Piracicaba. ESALQ/USP. Tese de doutorado, 1996.

MANDALA, S. M.; THORNTON, R. A.; ROSENBACH, M.; MILLIGAN, J.; GARCIA-CALVO, M.; BULL, H. G.; KURTZ, M. B. Khafrefungin, a novel

inhibitor of sphingolipid synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 32709-32714, 1997.

MANDEL, M.; HIGA, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Biotechnology*, 24:198-201. 1970.

MARCON, J. Isolamento e caracterização genética de actinomicetos endofíticos de *Citrus* spp. e interação com *Xylella fastidiosa*. Piracicaba, ESALQ/USP, 91p. Dissertação de Mestrado, 2002.

MESSING, J. Cloning in M13 phage or how to use biology at its best. *Gene*, 100:3-12. 1991.

MISAGHI, K.; DONNEDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*. 80:808-811. 1990.

MOURÃO, L. P. Seleção de células hospedeiras alternativas para a Engenharia Genética procedentes da flora bacteriana endofítica brasileira. Manaus, UFAM/UFSCAR, 136 p. Dissertação de Mestrado, 2001.

MURRAY, F. R.; LATCH, G. C. M.; SCOTT, D. B. Surrogate transformation of perennial ryegrass *Lolium perenne* using genetically modified *Acremonium* endophyte. *Molecular and General Genetics*, 233: 1-9, 1992.

NAMBIAR, P. T. C. Limiting and insect infestation of nitrogen-fixing root nodules of the *Pigeon pea* (*Cajanus cajan*) by engineering the expression of the entomocidal gene in its root nodules. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2866-2869, 1990.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. (Ed) *Microbial ecology of leaves*. Springer Verlag. 179-197. 1991.

PITOUT, J. D. D.; MOLAND, E. S.; THOMSON, K. S.; SANDERS, C. C.; FITZSIMMONS, S. R.  $\beta$ -Lactamases and detection of  $\beta$ -lactam resistance in *Enterobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 35-39, 1997.

RODRIGUES, A. A. C. Fungos endofíticos de sementes de caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. E diferenciação morfológica, patogênica e enzimática de espécies de *Fusarium*. Recife, UFRPe, 87p. Dissertação de Mestrado, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, USA.1989.

SANDRES, W. E.; SANDRES, C. C. Pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clinical Microbiology Reviews*, Apr. 10: 220-241, 1997.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467, 1977.

SANTOS, C. M. B.; CASTRO, M. M.; SANTOS, P. J. B.; TALHARI, S.; ASTOLFI-FILHO, S. Oral Focal Epithelial Hyperplasia: Report of Five Cases.. *Brazilian Dental Journal*, 17(1): 79-82, 2006.

SINGH, M.; KLEEBERGER, A.; KLINGMÜLLER, W. Location of nitrogen fixation (nif) genes on indigenous plasmids of *Enterobacter agglomerans*. *Mol. Gen.Genet.*190, 373-378, 1983.

SINGH, M.; KREUTZER, R.; ACKER, G.; KLINGMÜLLER, W. Localization and physical mapping of a plasmid-born 23-Kb nif gene cluster from *Enterobacter agglomerans* showing homology to the entire nif cluster of *Klebsiella pneumoniae* M5a1. *Plasmid* 19, 1-12, 1988.

STEIBL, R.; STEIBL, H. D.; SIDDAVATTAM, D.; KLINGMÜLLER, W. Identification of a new nif in the nifUSVWZM-operon of *Enterobacter agglomerans* 333. In "New Horizons in Nitrogen Fixation" (R. Palacios and J. Mora, Eds.), pp. 496. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht), 1992.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260: 214-216, 1993.

STROBEL, G.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R. S.; HESS, W. M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology-UK*, 142: 435-440, 1996.

TOMASINO, S. F.; LEISTER, R. T.; DIMOCK, R. M.; BEACH, R. M.; KELLY, J. L. Field Performance of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* Expressing the Insecticidal Protein Gene cryIA (c) of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in field corn. *Biological Control*, 3: 442-448, 1995.

TRIBIOLI, C.; TAMANINI, F.; PATROSO, C.; MILANESI, L.; PERGOLIZZI, R.; VILLA, A.; MAESTRINI, E.; RIVELLA, S.; BIONE, S.; MANCINI, M.; VEZZONI, P.; TONIOLO, D. Methylation and sequence analysis around EagI sites: identification of 28 new CpG island in XQ24-XQ28. *Nucleic Acids Research*, 20: 727-733, 1992.

TWIGG, A. J.; SHERRAT, D. Trans-complementable copy number mutants of plasmid ColE1. *Nature*, 283: 216-218. 1980.

YATES, I. E.; HIETT, K. L.; KAPCZYNSKI, D. R.; SMART, W.; GLENN, A. E.; HINTON, D. M.; BACON, C. W.; MEINERSMANN, R.; LIU, S.; JAWORSKI, A. J. GUS transformation of the maize fungal endophyte *Fusarium moniliforme*. *Mycological Research*, 103: 129-136, 1999.