UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PLASMÍDEO pLK39 EXTRAÍDO DE UMA BACTÉRIA ENDOFÍTICA ISOLADA DE *Solanum Lycocarpum*

VERA LÚCIA CARDOSO DE OLIVEIRA

Dissertação desenvolvida no laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia. Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

GOIÂNIA-2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PLASMÍDEO pLK39 EXTRAÍDO DE UMA BACTÉRIA ENDOFÍTICA ISOLADA DE *Solanum Lycocarpum*

VERA LÚCIA CARDOSO DE OLIVEIRA
ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ ARTUR MENDES BATAUS

Dissertação desenvolvida no laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia. Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

GOIÂNIA-2002

À minha filhinha Kimberly Kathelen, por tornar a minha vida muito mais bonita, amenizando os momentos difíceis e fortalecendo-me diante de cada batalha.

Aos meus pais, Alírio e Geracina, pelo amor e carinho dedicados em todos os dias da minha vida.

Aos meus irmãos Leonam e Orívam, pelo amor e amizade. As minhas grandes sobrinhas: Adriana, Adrielle e Elorah Danna.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha existência, e por todas as bênçãos concedidas.

Agradeço em especial ao Prof. Dr. Luiz Artur, pela orientação recebida e pela amizade e confiança.

Agradeço ao Prof. Dr. Cirano, pelo apoio e colaboração, ao ceder equipamentos e reagentes do laboratório de Enzimologia

Agradeço a equipe do laboratório de biologia Molecular na pessoa da Profª. Drª Célia, pelo apoio e colaboração ao ceder equipamentos e reagentes.

Aos professores Kátia e Claudinei, do laboratório de Química de Proteínas, pela amizade.

Ao professor Carlos e Professora Silvana da enzimologia, pelo apoio e amizade.

Expresso a minha gratidão ao Carlos, a Juliana e a Renata, pela colaboração com o seqüenciamento do pLK39.

Agradeço ao Prof. Elson (xico) e ao Rodrigo pela amizade e presteza.

Aos meus amigos do laboratório de Enzimologia Val, Kênia, Roberto, Marta, Luciana, Kasuê, Gaúcho, Iderval, Sueli, Ulisses, Tereza, pelo companheirismo e pelo carinho.

Em especial agradeço aos amigos do laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética: Karlla, Flávia, Cinthia, Claude, Daniel, Jaqueline, Karen, Christian, Pedro, Stephania, Hugo e Bruno pelos momentos maravilhosos que me proporcionaram.

Agradeço ao André Kipnis, pela amizade e presteza.

A toda a equipe do colégio de aplicação "Dr. Cézar Toledo", pelo apoio e incentivo.

Aos amigos do proformação (Aninha, Elaine, Margarete, Marilene, Nilda, Sandra, Tânia, Vânia e Vilma) pelo companheirismo, amizade, incentivo, e pelos grandes momentos de alegria na nossa convivência.

A amiga Christina, por sempre acreditar em mim, me apoiando nos momentos de dificuldades.

Ao amigo Márcio, pelo companheirismo, apoio, auxílio nos momentos difíceis e comemoração nos momentos de alegria.

A amiga Valéria, pelo companheirismo e incentivo.

Ao Jean por toda presteza e colaboração na digitação da dissertação.

A Renata e Maria pela amizade e torcida.

“Foi no nosso tempo que a Biologia perdeu a sua inocência multicelular. Dantes ela contava os segmentos dos artrópodes e as inflorescências das fanerogâmicas, descrevia a anatomia e a fisiologia dos corpos, mas estava inocente da maldade dos espíritos. Mas, um dia, começou a entrar na pele dos seres vivos, a estudar a química das sensações e a dissecar as moléculas da hereditariedade. Descobriu que desde o primeiro átomo de hidrogênio até a mente humana, toda a universal diversidade é transpassada por um fio de unidade elementar. Através dele, foi penetrando no mundo do pensamento, e acabou por se ver envolvida nos problemas sociais, filosóficos, religiosos e político dos homens. De inocente, a Biologia passou a ser considerada responsável por boa parte dos caminhos que trilha a nossa civilização”.

(Luís J. Archer)

ABREVIATURA E SIGLAS

Λ: Lambda

aa: Aminoácidos

^{o}C: Grau Celsius

amp: Ampicilina

Da: Dalton

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DMSO: Dimetil sulfoxido

DO: Densidade óptica (Absorbância)

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

g: Aceleração da gravidade

g: Grama

IPTG: Isopropil β D tiogalactopiranosídeo

kb: Kilobases

kDa: Kilodalton

L: Litro

M: Molar

mA: Miliampere

mg: Miligrana

MSC: Múltiplos sítios de clonagem

µg: Micrograma

mL: Mililitro

µL: Microlitro

mM: Milimolar

nm: Nanômetros

ORF: Seqüência aberta de leitura

p/v: Peso por volume

PB: Pares de bases

PCR: Reação de polimerização em cadeia

rep: Proteína de replicação

rep-mRNA: RNA Mensageiro ligado a proteína rep

RNAI: Ácido Ribonucléico I

rpm: Rotações por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

TDR: Tecnologia do DNA recombinante

U: Unidade de enzima

v/v: Volume por volume

v: Volts

VSD: Vetor de seleção direta

VSP: Vetor de seleção positiva

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosídeo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do plasmídeo pUC18

Figura 2. Esquema do plasmídeo pUC4K

Figura 3. Análise da estabilidade do plasmídeo pLK39, em células de Escherichia coli, através da comparação do número de células obtidas em meio sólido com e sem antibiótico.

Figura 4. Comparação do número de cópias do pLK39 com os plasmídeos pUC18 e pBR32. (1) Marcador lambda HindIII, (2) e (3) pKL39, (4) e (5) pUC18, (6) e (7) pBR322.

Figura 5. Seqüência de nucleotídeos do pLK39 (1637). Em vermelho, o sítio PstI, onde foi inserido o gene de resistência a Kanamicina.

Figura 6. Comparação das seqüências de nucleotídeos dos plasmídeos: pLK39, pSW200, pSW100, pEC3, pUCD5000 e pBERT.

Figura 7. Clandograma mostrando a inferência filogenética entre o pLK39 e os plasmídeos pSW100, pEC3, pUCD5000 e pBERT.

Figura 8.A Comparação entre as seqüências de nucleotídeos dos genes da ORF I do pLK39 e dos genes mob B dos plasmídeos pSW200, pSW100, pEC3, pUCD5000 e pBERT.

Figura 8 B Comparação entre as seqüências dos genes da ORFIII do pKL39, com os genes mob D dos plasmídeos pSW200, pSW100, pEC3 e pUCD5000.

Figura 9 Clandograma mostrando a referência filogenética entre as seqüências mob B do pLK39 com os plasmídeos pSW200, pSW100, pUCD5000 e pBERT.

Figura 10. Cladograma mostrando a referência filogenética das seqüências de genes do mob D do pLK39 e os plasmídeos pSW200, pSW100, pEC3 e pUCD5000.

Figura 11 A Mapa físico do plasmídeo pSW200.

Figura 11 B Mapa físico do plasmídeo pSW100.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Enzimas de restrição que apresentam sítios no plasmídeo pKL39 e suas respectivas seqüências de reconhecimento.

Tabela 2. Teste de incompatibilidade do plasmídeo pLK39.

Tabela 3. Quantificação dos plasmídeos pLK39, pBR322 e pUC18.

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO 15
I.1 Microorganismos endofíticos 15
I. 1.1 Conceito 15
I. 1.2 Importância da Associação entre Endofíticos e Plantas Hospedeiras 16
I.1.3 Importância e utilização Biotecnológica de microorganismos endofiticos 17
I.2 Plasmídeos 17
I.2.1 Conceitos de plasmídeos 17
I.2.2 Ocorrência e detecção de um plasmídeo bacteriano 17
I.2.3 Utilização de plasmídeos na tecnologia do DNA Recombinante 18
I.2.4 Trabalhos realizados com plasmídeos crípticos 22
I.2.5 O Plasmídeo pLK39 24
II. Justificativa 27
III.Objetivo 28
IV.Material e método 29
IV.1 Manutenção de microorganismos 29
IV.2 Meios de cultura 29
IV.3 Tampões 31
IV.4 Soluções 33
IV.5 Antibióticos 35
IV.6 Extração de DNA 37
IV.6.1 Extração de DNA total 37
IV.6.2 Extração de DNA Plasmidial 37
IV.6.3 Extração de DNA Plasmidial do pUC18 e pLK39 38
IV.7 Digestão de DNA com enzimas de restrição 38
IV.8 Purificação dos fragmentos de DNA Plamidial (pLK39) 39
IV.9 Clonagem dos fragmentos de DNA do pLK39 39
IV.10 Preparo e transformação de células competentes 40
IV.11 Minipreparação de Plasmídeos 40
IV.12 Eletroforese em gel de Agarose 41
IV.13 Ensaio de estabilidade do plasmídeo 41
IV.14 Ensaio da incompatibilidade do plasmídeo 41

IV.15 Determinação do número de cópias do plasmídeo 42
IV.16 Seqüenciamento do pLK39 42
IV.17 Análise das seqüências 42
V. Resultados 43
V.1 Análise da Estabilidade do plasmídeo pLK39 43
V.2 Análise da incompatibilidade do plasmídeo pLK39 44
V.3 Determinação do número de cópias do plasmídeo pLK39 45
V.4 Clonagem dos fragmentos de DNA do pLK39 digerido com Sau3AI 46
V.5 Resultados do seqüenciamento 47
V.5.1 Alinhamento do pLK39 com os plasmídeos que apresentaram maior homologia 48
V.5.2 Análise de genes contidos no fragmento de pLK39 seqüenciado 52
IV Discussão 56
VI.1 Estabilidade do plasmídeo pLK39 57
VI.2 Incompatibilidade do plasmídeo pLK39 58
VI.3 Determinação do número de cópias do plasmídeo pLK39 59
VI.4 Estratégias utilizadas nas subclonagens do plasmídeo pLK39 no vetor pUC18 59
VI.5 Análise da seqüência do plasmídeo pLK39 61
VII. Perspectivas 64
VII. Referências Bibliográficas 65

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o plasmídeo pLK39. Este plasmídeo foi extraído de uma bactéria endofítica Gram-negativa, isolada da folha de *Solanum Lycocarpum* (Lobeira). Este plasmídeo apresenta um tamanho de aproximadamente 4,5 kb. Visando obter uma marca de seleção para permitir sua caracterização em células de *Escherichia coli*, foi introduzido o gene de resistência à Kanamicina, extraído do plasmídeo pUC4K. A caracterização do pLK39 foi realizada através de estudos de estabilidade, incompatibilidade, estimativa do número de cópias e através de seqüenciamento de parte do plasmídeo. A estabilidade foi testada em células de *Escherichia coli* XL10. Células transformadas com pLK39 foram cultivadas em meio Lúria suplementado com Kanamicina (50 µg/mL) durante 24 horas uma amostra da cultura era plaqueada em meio seletivo e em meio sem pressão seletiva parte dessa amostra foi inoculada em meio Lúria sem pressão seletiva e incubado por 24 até atingir 240 gerações. Após 240 gerações 81.5% das células mantiveram o plasmídeo, mostrando que o pLK39 é bastante estável em células de *Escherichia coli*. Para realização do teste de incompatibilidade, células de *Escherichia coli* XL10 foram co-transformadas com os plasmídeos pLK39/pUC18, pLK39/pBR322 e pLK39/pACYC184. Após 240 gerações, foi detectada a presença do plasmídeo pLK39 em todos os sistemas testados, demonstrando a compatibilidade do pLK39 com os plasmídeos testados. O número de cópias do pLK39 foi estimado através da comparação da intensidade das bandas plasmidiais, obtidas através de eletroforese em gel de agarose, realizada a partir de uma extração de plasmídeos de células de *Escherichia coli* XL10 transformadas com pUC18, pBR322 e pLK39. A quantificação de cada banda foi realizada utilizando o sistema de fotodocumentação e analise (KODAK EDAS). O número de cópias do pLK39 foi estimado em 25 cópias por células. O plasmídeo pLK39 foi digerido com enzima de restrição **Sau**3AI e sub-clonado no sítio de **Bam**HI do plasmídeo pUC18. Os clones recombinantes foram seqüenciados. Foi obtido um fragmento com 1.637 pb. Essa seqüência apresentou uma grande homologia com os plasmídeos pSW200, pSW100, pEC3, pUCD5000 e pBERT, os quais foram isolados de diferentes bactérias Gram-negativas. A seqüência apresentou dois possíveis genes. A ORF I apresentou grande homologia com o gene mobB dos plasmídeos pSW200 (96%), pSW100 (96%), pEC3 (94%), pUCD5000 (94%) e pBERT (87%). A ORF II apresentou homologia com o gene mobD dos plasmídeos pSW200 (92%), pSW100 (90%), pEC3 (90%) e PUCD5000 (89%).

ABSTRACT

The characterization of the plasmid pLK39.was the aim of work.pLK39 was isolated from a endophytic Gram-negative, bactéria isolated from leaves form *Solanum lycocarpum* (Lobeira). In order to obtain a selection marker which would characterization in Escherichia coli the kanamycin, resistence gene from pUC4K. was subcloned into the PstIsite of pLK39. The characterization of PLK39 was basedon studies of stability, incompatibility, determination of the copy number and through DNA sequencing. The stability was carried out in *Escherichia coli* XL10 cells. Cells transformed with pLK39 were inoculated in Lúria broth containing Kanamycin (50µg/ml) during24 hours. After 24 hours of incubation one sample of the culture was in medim with and without selective pressure, and inoculated in Lúria broth without pressure médium, for 240 generations. After 240 generations 81,5% of cells maintained the plasmid, showing that pLK39is highly stable in *Escherichia coli* to make the incompatibility test, cells of *Escherichia coli* XL10 were co-transformed with pLK39/pUC18; pBR322 and pLK39/pACYC184. After 240 generations, the plasmid pLK39 iof detected in all systems used, showing the compatibility of pLK39 with the plasmids tested. The copý number pLK39 was estimated by the intensity of plasmidial bands in agarose gel, electrophoresis using a photodocumentation and analysis system (KODAK EDAS). The copý number of pLK39 was estimated as 25 copies per cell. PLK39 was digested with **Sau3AI** restriction and subcloned into the **Bam**HI site of plasmid pUC18. The recombinant clones were sequenced and 1637 pb reading fragment was obtained. This sequence showed high homology with pSW200, pSW100, pEC3, pUCD5000 and pBERT, which were isolated from Gram-negative bacteria. This sequence possesses two possible genes. The ORF I showed high homology with mobB gene from plasmid pSW200 (96%), pSW100 (96%), pEC3 (94%), pUCD5000 (94%) and pBERT (87%). The ORF II showed homology with mobD gene from plasmids pSW200 (92%), pSW100 (90%), pEC3 (90%) and PUCD5000 (89%).

I. INTRODUÇÃO

I. 1. Microrganismos Endofíticos

I.1.1 Conceitos

Microrganismos que vivem no interior de plantas são estudados há muito tempo, desde a descoberta da micorriza, e da fixação simbiótica do nitrogênio, realizada por bactérias do gênero *Rhizobium* (Pelczar *et al*., 1981). Com exceção da associação entre fungos micorrízicos, plantas e organismos diazotróficos das rizosfera, acreditava-se que esta interação levava à formação de lesões nos tecidos vegetais, as quais poderiam causar a morte da planta. Entretanto, vem sendo registrada a presença de microrganismo no interior de vegetais assintomáticos, abrindo novas perspectivas para o estudo da interação planta/microrganismos.

Segundo Petrini & Muller (1986), todo tipo de graduação pode ser encontrada na interação hospedeiro/endofítico, e eles ainda propuseram a definição de endofítico, como organismo que "vive completa ou parcialmente dentro do tecido da planta" em oposição aos epifíticos que "colonizam a superfície da planta".

Desta forma, podem-se definir microrganismos endofíticos como sendo aqueles que vivem no interior de tecidos ou células da planta hospedeira, freqüentemente sem causar sinal visível de infecção, podendo ocorrer em parte ou em todo o ciclo de vida da planta (Isaac, S. 1992).

Estes microrganismos vivem dentro da planta como um não-patógeno, ainda que um grau moderado de patogenicidade possa ser observado, ocupando os espaços interceculares das plantas e utilizando-se dos nutrientes apoplásticos (Bacon & Hinton, 1997).

Algumas das bactérias endofíticas estudadas são conhecidas como fitopatógenos, apesar de produzir poucos sintomas no hospedeiro, ou nas plantas não hospedeiras (Misaghi & Donndelinger, 1990), de forma que a identificação deve ser vista com cautela. Segundo Sinclair (1991), a colonização de plantas por microrganismos endofíticos pode ser semelhante em muitas coisas, às infecções latentes por fitopatógenos. Além disso, esta interação entre endofíticos e seus hospedeiros pode ser alterada por meio de mudanças ambientais e microbiológicas drásticas que ativam o crescimento e patogenicidade de microrganismos endofíticos ou presentes no fitoplano (Araújo, 1996).

Misaghi & Dondelinger (1990) sugeriram que as bactérias endofíticas provavelmente estiveram envolvidas intimamente numa relação com as plantas hospedeiras através de processos co-evolucionários podendo assim influenciar nos mecanismos fisiológicos da planta. Os processos de co-evolução entre bactérias endofíticas e seus hospedeiros provavelmente levou à seleção de genes nestes microrganismos, os quais codificam proteínas que aumentam o vigor da associação, bem como genes da planta regulados pela presença do endofítico, que também beneficiam a associação, de forma que além de processos fisiológicos, inúmeros mecanismos genéticos podem estar associados nesta interação planta/endofítico (Araújo, 1996).

I.1.2 Importância da Associação entre Endofíticos e Plantas Hospedeiras

Microrganismos endofíticos têm sido estudados em cascas de árvore e xilema, em amostras de plantas (Petrini, 1986). Misaghi & Donndelinger (1990) relatam a presença de bactérias endofíticas no fruto, raiz da beterraba doce, caroço do amendoim, raiz de leguminosas, tubérculo de batata, sugerindo a grande diversidade das associações endofíticas.

Endofíticas parassimbióticos também foram detectados em línquens (Petrini *et al*., 1991). Os endofíticos incluem, portanto microrganismos comensais, os quais têm efeito direto na planta hospedeira e simbiônticos mutualísticos que podem ser usados no controle biológico de patógenos, uma vez quer as bactérias endofíticas colonizam nichos ecológicos similares aos de fitopatógenos, especialmente de patógenos vasculares, o que tornam candidatos favoritos como agentes para o biocontrole de micróbios patógenos, insetos e nematóides (Araújo *et al*., 1996), ou para a promoção do cultivo de plantas. Neste caso, alguns endofíticos podem acelerar a emersão de sementes e promover o estabelecimento das plantas sob condições adversas de cultivo (Sun *et al*., 1995; Chanway, 1997).

O papel dos endofíticos na comunidade em que há associação entre endofíticos e plantas têm sido intensamente discutidos (Hallmann *et al*., 1997; Sturz *et al*., 2000). As associações endofíticas não levam ao desenvolvimento de sintomas de doença, mas podem resultar em mudanças morfológicas e fisiológicas no tecido da planta hospedeira, podendo assim aumentar a capacidade de sobrevivência e também o vigor das plantas, ocasionando o aumento da resistência dessas plantas a doenças. Outra forma de interação entre plantas e endofíticos é observada entre bactérias diazotróficas e plantas hospedeiras. Nessa associação a bactéria fixa uma grande quantidade N_2 que é parcialmente excretado para o meio intercelular da planta hospedeira, a qual poderá então utilizar este nitrogênio orgânico (Araújo, 1996).

I.1.3 Importância e Utilização Biotecnológica de Microrganismos Endofíticos

O entendimento dos mecanismos genéticos da associação entre plantas e microrganismos endofíticos poderá contribuir em programas de melhoramento vegetal que envolvam microrganismos manipulados geneticamente. Após esta manipulação, esses microrganismos poderiam ser reintroduzidos no hospedeiro, conferindo novas características às plantas de interesse como resistência a pragas, produção de proteínas e vitaminas (Araújo, 1996).

Fahey (1988) fez o primeiro relato da utilização de um microrganismo endofítico manipulado geneticamente, onde a bactéria *Clavibacter xily susbsp cynodontis* foi utilizada com o gene da *delta endotoxina* de *B.thuringiensis* para o controle da broca do colmo de milho.

Fungos endofíticos também estão sendo utilizados como vetores para a introdução de características novas em plantas de interesse, como *Pestalotiopis microspora* que ocorre como uma seleção de variedades em *Taxodium distichum* (cipreste simples). Os organismos vivem como endofíticos na casca, floema e silema, sendo que muitos desses fungos fazem taxol por reatividade de extratos de purificados com anticorpos monoclonais específicos contra taxol (Strobel, 1996).

I. 2 Plasmídeos

I.2.1 Conceito de Plasmídeos

Plasmídeos são moléculas de DNA extracromossomais, circulares, que se duplicam de forma autônoma na célula hospedeira (replicons) e podem ser encontradas em grande número e diversas formas em uma mesma célula. Segundo Azevedo (1998) os plasmídeos não são essenciais, o que equivale a dizer que eles podem estar presentes ou ausentes em uma determinada célula, e sua ausência não implica na inviabilidade da mesma, pelo menos em certas condições. Esta propriedade contrasta em parte, com a do material genético cromossômico, pois embora possam existir células com perda de fragmentos cromossômicos, a perda de genes essenciais é letal. Uma vez ausentes, os plasmídeos só podem ser recuperados por infecção, o que valer dizer que tais elementos não podem ser formados “de novo”, portanto um plasmídeo só pode ser gerado de outro já existente.

I.2.2 Ocorrência e Detecção de um Plasmídeo Bacteriano

Os plasmídeos ocorrem naturalmente em bactérias e alguns organismos eucarióticos unicelulares (Zaha, 1996), entretanto a detecção de plasmídeos torna-se fácil quando feita em bactérias conhecidas e geneticamente bem estudadas, como no caso da *E. coli*. Em bactérias pouco estudadas geneticamente há uma dificuldade maior, uma vez que uma bactéria exibindo certas características fenotípicas pode deixar de exibi-las de forma absoluta. Como os Plasmídeos não são essenciais para a viabilidade das células, eles podem ser perdidos sem causar a morte das mesmas. (Azevedo,1998).

Os plasmídeos são observados também em bactérias fitopatogênicas de importância econômica, sugerindo a sua ocorrência com a patogenicidade conferida a célula hospedeira, uma vez que os mesmos conferem grande variedade de características próprias na bactéria que os alojam e também porque são capazes de promover troca de informação genética através de limites taxonômicos (Araújo,1996). Segundo Coplin (1989), os plasmídeos ou seqüências altamente conservadas em bactérias coevoluiram com o hospedeiro, e por esse motivo se mantiveram estáveis nesse procariotos. Em isolados de *Erwinia stewartii* foram observadas oito classes de plasmídeos altamente conservados (Coplin *et al*.,1981).

I.2.3. Utilização de Plasmídeos na Tecnologia do DNA Recombinante.

Pode-se definir como vetor, um agente que facilitará um ou mais passos em todo o progresso de colocar um material exógeno dentro de uma célula hospedeira, de forma que um bom vetor necessita apresentar propriedades que facilitem a sua ligação ao DNA a ser clonado, podendo duplicar na célula hospedeira e com isso duplicar também o DNA exógeno. Deve apresentar propriedades (marcadores genéticos) que permitam a seleção de hospedeiros que contenha DNA recombinantes, possibilitando a expressão da mensagem exógena inserida no hospedeiro, e ainda colaborar para a não proliferação ambiental do DNA clonado (Astolfi-Filho *et al*.1985).

De acordo com essas propriedades, existem várias possibilidades de uso de vetores na tecnologia do DNA recombinante, e com isso, o desenvolvimento de vários tipos se torna cada vez mais interessante. Existem vetores que são destinados a transportar um inserto de DNA para dentro de uma célula hospedeira, sendo chamados de vetores de clonagem (Zaha,1996). Estes podem ser plasmídeos ou bacteriófagos e devem conter seqüencias que permitam a sua replicação autônoma dentro da célula hospedeira. A clonagem de fragmentos

de DNA em plasmídeos vetores são procedimentos de rotina ma genética de bactérias (Gabant *et al.*,1999). Os vetores de expressão são veículos que, além de conter origens de duplicação e marca de seleção, contêm promotor, região codificadora do sítio de ligação do ribossomo e códon de iniciação de tradução, justoposto a um sítio de restrição para a inserção de uma mensagem. Nesse caso, a seqüencia inserida é expressa, podendo resultar em uma proteína híbrida ou não.

Vetores de expressão híbridos têm sido criados a fim de maximizar a eficiência da transcrição e da tradução do gene de interesse. Por exemplo, existem vetores que contêm a seqüencia promotora – 35 do operom do triptofano, a seqüencia promotora – 10 do promotor do gene lacUV5 e um forte sítio sintético de ligação ao ribossomo. Como o espaçamento entre o sítio de ligação ao ribossomo e o códon de início da tradução também é crítico, muitos vetores possuem os sítios de clonagem, localizados "*downstream*" ao códon de início de tradução. Em alguns casos, se faz necessário regular a produção da proteína pelo vetor de expressão. Vários dos vetores de expressão procarióticos possuem promotores induzíveis. Nesses sistemas, uma seqüencia operadora é clonada em uma região apropriada do vetor de expressão, enquanto um gene repressor é clonado em algum outro sitio. A inativação do repressor é clonado em algum outro sítio. A inativação do repressor permite a transcrição. Por exemplo, genes sob o controle do promotor lac são induzidos pela adição de isopropril-tio-β-D-galactosídeo (IPTG), enquanto que os genes controlados pelo repressor sensível a temperatura do bacteriófago λ são induzidos por uma mudança na temperatura. Promotores induzíveis permitem a produção de proteínas que são tóxicos para E.coli, uma vez que a produção dessas proteínas pode ser reprimida até as células terem atingido uma etapa próxima a fase final de multiplicação. Uma outra vantagem de sistemas de expressão induzíveis é que eles protegem a proteína recém-sintetizada da degradação pelas proteases da bactéria hospedeira (Zaha,1996).

Os vetores de seleção de promotores são utilizados para se clonar seqüencias de DNA com atividade promotora. Este tipo de vetor tem sido importante para a clonagem de promotores de organismos onde a engenharia genética ainda não está completamente desenvolvida, e na clonagem de promotores que modulem altos níveis de expressão de proteínas heterólogas em organismos de interesse individual (Bataus, 1991).

Os vetores de seleção direta de recombinantes (VSD) apresentam um gene que codifica uma característica de fácil detecção, permitindo discriminar os hospedeiros, portanto, o gene normal, daqueles que apresenta o gene interrompido pela inserção do fragmento de interesse.

Com o desenvolvimento desta metodologia, vários VSD foram construídos, sendo que vários genes indicadores foram utilizados para a seleção dos recombinantes, cada um utilizando uma estratégia com características um pouco diferentes. Assim, VSD podem ser divididos em dois grupos, de acordo com a metodologia utilizada para a seleção dos recombinantes, Vetores de Seleção Direta propriamente ditos (VSD) e os Vetores de Seleção Positiva (VSP).

O grupo dos VSD utiliza um gene indicador que codifica uma característica que não é essencial para o organismo hospedeiro. Assim, após o processo de transformação são obtidos clones que apresentam aquela característica especifica, bem como clones onde a clonagem insercional do fragmento de interesse aboliu a característica em questão. Geralmente são utilizados genes que codificam enzimas, cujo produto é de fácil detecção.

O gene indicador mais amplamente utilizado para a construção de VSD é o gene lacZα. Algumas linhagens de E.coli apresentam uma mutação no gene lacZα, este faz a α-complementação dessas mutações, tornando as células capazes de metabolizar a lactose e seu análogos. Os plasmídeos da série pUC utilizam essa estratégia. O plasmídeo pUC18 (figura 1), apresenta o gene lacZα, contendo uma sequência de múltiplos sítios de clonagem (MSC) no seu interior, sob controle de promotor lac. Quando células de E.coli são transformadas com este vetor, ocorre a α-complementação, elas adquirem a capacidade de metabolizar o composto X-gal, um análogo da lactose. A clivagem do X-gal pela β-galactosidade forma um precipitado azul. Quando o gene lacZα é inativado pela inserção de um fragmento de DNAna região de MSC, ele perde a capacidade de hidrolisar o X-gal abolindo a formação do precipitado azul. Assim, clones portando vetores recombinantes permanecem brancos, sendo facilmente distinguidos dos clones portando vetores religados (Yanisch-Peron e cols.,1985).

Na série de plasmídeos pBluescript, o gene lacZa apresenta os promotores T7 e T3, orientados de forma invertida, um em relação ao outro, flanqueando a região de MSC e a origem de replicação do flago fl. Além de permitir a seleção de recombinantes no sistema azul/branco, esta série permite fazer a transição e tradução "*in vitro*" do inserto clonado, utilizando os promotores T7 e T3. A origem de replicação do fago fl permite a obtenção de DNA fita simples, o que é bastante interessantes etapas de seqüenciamento e mutagênese do inserto (Bataus,1999).

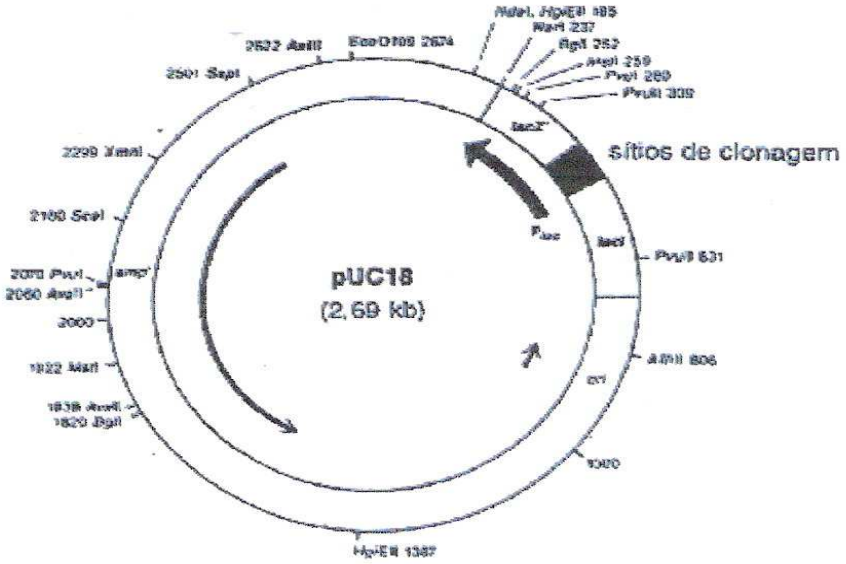
Vetores de expressão-secreção são veículos de expressão que contém, antes do sitio de clonagem, a seqüência codificadora de peptídio sinal, o que garantirá a secreção do produto da mensagem a ser clonada (Astolfi-Filho *et al*., 1987, Barros *et.al*.,1996).

Os vetores mais utilizados na tecnologia do DNA recombinante (TDR), são do tipo plasmídeo, sendo muito utilizados devido a sua facilidade de manipulação, e principalmente, a grande variabilidade de aplicações. A construção do plasmídeo pBR322 foi um marco no desenvolvimento de clonagem molecular. O plasmídeo pBR322 apresenta 4.362 pares de bases, sendo portador de genes que conferem resistência a ampicilina e a tetraciclina. A inativação de um destes genes, pela inserção de um DNA exógeno em um dos vários sítios únicos de clonagem do plasmídeo é uma excelente forma de selecionar clones recombinantes através do método de inativação insercional (Zaha,1996).

O pBR322 deu origem à maioria dos plasmídeos hoje existentes. Dentre as suas principais características, podemos destacar: vários sítios únicos, para enzimas de restrição, grande estabilidade, número elevado de cópias por célula, não ser mobilizado, apresentar seleção fácil dos clones portando plasmídeos recombinantes (Bataus,1991).

O estudo de plasmídeos e a utilização destes como vetores também se mostram promissor para a biologia molecular, em especial na procura de novos genes de resistência a antibióticos ou substancias tóxicas, degradação de substancias via produção enzimática, procura de novos promotores, entre outros (Makrides,1996).

Figura 1. Esquema do Plasmídeo pUC18



1.2.4 Trabalhos Realizados com Plasmídeos Crípticos

A ocorrência de plasmídeos em bactérias aumenta ainda mais o interesse nessas estruturas, principalmente pelo fato de que, através do perfil plasmidial é possível caracterizar estes isolados bacterianos, assim como associar características fenotípicas de interesse com a informação genética contida nesses DNAs extracromossomais (Araujo, 1996).

Linhagens de *Erwinia stewartii* usualmente contêm um grande número de plasmídeos, com tamanhos que variam de 4.000 a 320.000 pb. A função destes plasmídeos não é totalmente conhecida e não está associada a patogenicidade, produção de bactericidas, resistência a antibióticos, metais pesados ou utilização de carboidratos (Coplin *et al*., 1981).

A seqüência de um pequeno plasmídeo isolado de *E. stewartii*, o pSW100 foi determinada, sendo que o plasmídeo apresenta 4.272 pares de base, consistindo de uma região de 702 pares de base, homóloga a da origem de replicação dos plasmídeos p15A, ColE1 e ColA. Esse plasmídeo também possui uma seqüência homóloga à da região bom e dos genes mobCABD do ColE1, com exceção de uma deleção do gene mobA. Porém a deleção não afeta a mobilização do pSW100 por plasmídeos conjugativos endógenos de *E. stewartii*, como por exemplo, o pDC250. O plasmídeo também apresenta uma ORF com 1596 pares de base4s, sendo que esta ORF não é obrigatória para a sua replicação. A perda do pSW100 não causa nenhuma alteração no fenótipo do hospedeiro, o que faz supor não ser, o hospedeiro, essencial para a sobrevivência do organismo (Fu *et al*., 1995).

Um outro plasmídeo também foi extraído da linhagem SW2 e *E. stewartii*, o pSW200, que aparentemente não apresenta genes essenciais para a sobrevivência da célula hospedeira. Entretanto, devido à sua estabilidade nas células, a sua utilização é sugerida na construção de vetores de expressão para produção de proteínas recombinantes com elevadas densidade de fermentação (Fu *et al*., 1998).

Pantoea citrea, agente causador da doença rosa do abacaxi, abriga um plasmídeo de 5.229 pares de bases, denominado pUCD5000, que contém as seqüências responsáveis pela replicação e mobilização, similares às dos plasmídeos pSW100 e pSW200 em *Pnatoea stewartii*, e do pEC3 em *Erwinia carotovara subs. Carotovara.* A sobrevivência da P. *citrea* no abacaxi não depende do pUCD5000, entretanto, a coloração rosa, que é característica da doença, está associada à presença do plasmídeo (Pujol *et al*., 1998).

Em isolados clínicos de *Streptococus pneumoniase* também foram extraídos plasmídeos crípticos, tais como: pDP1 e pSMB1. Ambos são essencialmente idênticos, sendo que o pDP1 apresenta 3.161 pb e o pSMB1, 3.162 pb. Estes plasmídeos são bastante estáveis,

o que possibilitou o desenvolvimento de trabalhos, onde foram usados como vetores de clonagem (Oggoni *et al*., 1998).

A seqüência do plasmídeo pSF51 com 5.100pb, da bactéria patogênica, *Xilella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros (amarelinho), foi analisada mostrando que este plasmídeo codifica para 65 ORFs, organizadas em quatro regiões principais, contendo genes relacionados à replicação, mobilização e transferência conjugativa. Os estudos realizados com pSF51 indicam que ele não tem um papel direto na patogenicidade da bactéria *Xilella fastidiosa*, mas que este é um plasmídeo conjugativo que pode ser importante para a transferência de genes nessa bactéria, sendo que esta propriedade pode ser de grande importância para o desenvolvimento de técnicas de transformação em *Xilella fastidiosa* (Marques *et al*., 2000).

Alegre *et al*. (1998), descreveram um novo plasmídeo críptico pRS1, de um isolado de *Oenococcus oeni*. O plasmídeo apresenta 2.523pb, e a análise da sua seqüência nucleotídica revelou a presença de 3 grandes ORFs e alta homologia com a de outros plasmídos de *Oenococcus oeni*, já estudados.

Inúmeros plasmídeos têm sido seqüenciados e caracterizados, mostrando a divergência existente entre eles, e a forma como funcionam, sendo que uma das características importantes a serem observadas é o mecanismo de replicação.

Segundo del Solar *et al*., (2000), existem três tipos de sistemas de replicação: seqüências repetidas diretas que formam um complexo com a proteína Rep; RNAs “antisense” que hibridizam com a região essencial (ctRNAs); os ctRNAs e a proteína, sendo que este último encontra-se dividido em duas categorias: a primeira os ctRNAs agem de maneira regulatória, e a proteína é o elemento auxiliar, no segundo, tanto os ctRNAs, quanto a proteína, agem em alvos diferentes.

Os sistemas de controle usando os ctRNAs são difundidos em plasmídeos que se replicam por diferentes mecanismos, mas que a divisão da estrutura genética é similar na região de controle. Os ctRNAs são complementares a uma região próxima a extremidade 5’ do RNA essencial. Eles são sintetizados por um promotor constitutivo e tem uma vida média curta, quando dentro da concentração celular ficam próximos da proporção do número de cópias. A replicação é inibida pelo emparelhamento do RNA-ctRNA e abole a atividade do RNA essencial. Diferenças entre vários replicons regulados por ctRNAs são estudadas baseadas na ocorrência da inibição que pode ser exemplificada pela inibição da maturação do primer essencial para a replicação, terminação prematura da síntese do rep-mRNA essencial e inibição da transcrição de rep.

Estes três tipos de replicação são também responsáveis pelo controle do número de cópias de vários plasmídeos.

1.2.5 O Plasmídeo pLK39

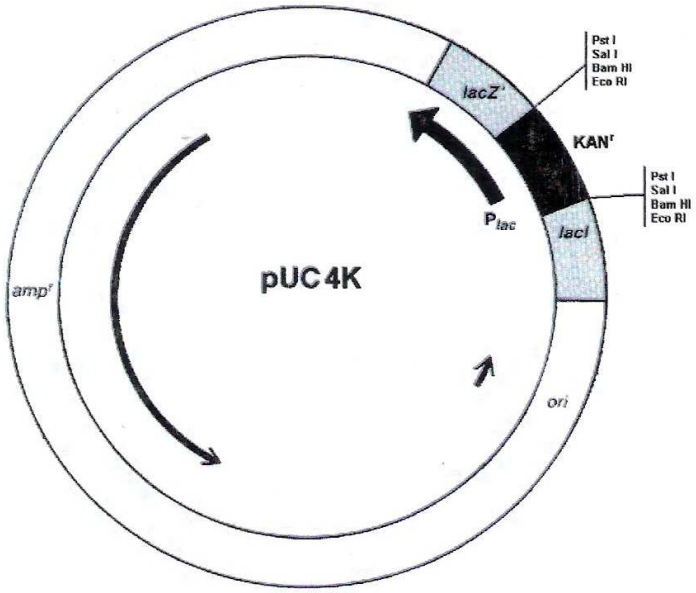
Microrganismos endofíticos foram isolados de folhas de *Solanum licocarpum* (Lobeira). As folhas foram devidamente desinfetadas, a fim de evitar o crescimento dos epifíticos. De acordo com Pereira *et al*., (1993), os processos e os tempos necessários para desinfecção, dependem basicamente da espessura da cutícula e da epiderme dos tecidos do hospedeiro.

Num primeiro isolamento foram obtidos onze morfoespécies de microrganismos: oito bactérias e três fungos. Ao se extrair o DNA total das morfoespécies bacterianas e analisá-las por eletroforese em gel de agarose a 1%, observou-se que alguns apresentavam bandas características de DNA plasmidial. As cepas isoladas foram submetidas a uma mini-preparação para extração desses plasmídeos, confirmando então a presença dos mesmos em pelo menos três isolados.

O DNA plasmidial obtido, foi clivado com diferentes endonucleases, mostrando sempre um perfil de restrição com poucas bandas ou ausência de clivagem, sendo o resultado mais interessante obtido com a enzima **PstI**, em que observou-se uma banda de cerca de 4,5 Kb, o que inicialmente poderia indicar único ciclo de clivagem no plasmídeo.

Para a determinação da funcionalidade da origem de replicação deste plasmídeo críptico em *E. coli*, ligou-se o fragmento obtido na clivagem com **PstI,** a um gene que confere resistência à kanamicina (figura 2), oriundo do plasmídeo pUC4K (Hoffmam *et al*., 1998).

Figura 2. Esquema do plasmídeo pUC4K



Após o procedimento de transformação de células de *E. coli*, com esse material, foi obtido um clone resistente à kanamicina. Uma nova mini-preparação para a extração do plasmídeo, que foi denominado pLK39. Este plasmídeo foi submetido à clivagem com diferentes enzimas de restrição para a liberação do fragmento exógeno e sua linearização (Tabela 1).

Tabela 1 – Enzimas de restrição que apresentam sítios no plasmídeo pLK39 e suas respectivas seqüências de reconhecimento.

Enzima	Seqüência de reconhecimento
Ava I	5’ –CPyCGPuG-3’ 3’ –GpuGCpyC-5’
Nru I	5’ –TCGCGA-3’ 3’ –ACGCGCT-5’
Hinf I	5’ –GANTC-3’ 3’ –CTNAG-5’
Pst I	5’ –CTGCAG-3’ 3’ –GACGTC-5’
Sma I	5’ –CCCGGG-3’ 3’ –GGGCCC-5’
Stu I	5’ –AGGCCT-3’ 3’ –TCCGGA-5’
Vsp I	5’ –ATTAAT-3’ 3’ –TAATTA-5’

A bactéria da qual o pLK39 foi isolado, é um bastonete curto, gram-negativo com coloração alaranjada, e de aspecto gomoso. È resistente a ampicilina (10mg), sensível a: amicacina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, kanamicina, rifampicina, tetraciclina e tobramicina. Em meio sem nitrogênio, ela cresce na parede sem turvar.

II. JUSTIFICATIVA

A capacidade de determinados microorganismos viverem no interior de tecidos vegetais sem causar danos ao hospedeiro, aliado ao fato de sua transposição poder se dar via sementes, torna estes microorganismos candidatos em potencial para o controle biológico de pragas e patógenos de plantas, vetores de novas características para as plantas hospedeiras (Araujo,1996).

Volksch *et al*. (1992) realizaram um estudo qualitativo de populações bacterianas presentes em lesões de folhas de sojas, e verificaram que bactérias do gênero *Erwinia* apresentam a capacidade de sintetizar metabólitos que inibem o desenvolvimento de *Pseudomonas syringae PV. Glycinea*, responsável por essas lesões. O estudo da interação destas e de outras bactérias isoladas deste local pode permitir a utilização dessas bactérias antagônicas contra *Pseudomonas syringae pv. Glycinea* responsável pela queima da soja.

Murray *et al* (1992), fizeram referência á utilização de fungos endofíticos como vetores genéticos. Eles obtiveram transformantes do fungo endofítico Acremonium, resistentes á higromicina em alta freqüência, utilizando o plasmídeo pAN7-1 em sua forma linear e circular. Esses autores também descreveram a transformação desse fungo com o gene da β-glucuronidase, e constataram a expressão desse gene, "*in vitro*" e "in vivo" após a reintrodução do endofítico na planta hospedeira (Araujo, 1996).

O entendimento dos mecanismos genéticos da associação de plantas e microorganismos endofiticos poderá contribuir em programas de melhoramento vegetal que envolva endofiticos manipulados geneticamente. Após esta manipulação genética, esses microorganismos poderiam ser reintroduzidos no hospedeiro, conferindo novas características, tais como: resistência á pragas, produção de proteína e vitaminas nas plantas de interesse biotecnológico.

Nesse contexto, para esse tipo de modificação, são sugeridos os plasmídeos, uma vez que estes podem conferir novas características ás células hospedeiras (Coplin,1989), as quais podem, determinar a especificidade do hospedeiro a diferentes habitats. È importante considerar ainda, que estes plasmídeos seriam mais bem aceitos caso forem oriundos de microorganismos semelhantes.

O estudo de plasmídeos e sua utilização como vetores têm se mostrado de relevante interesse a Biologia Molecular, em especial na procura de novos genes de resistência a antibióticos, bem como na procura de novos promotores.

III. OBJETIVOS

Objetivo geral: Caracterização e seqüenciamento do plasmídeo pLK 39, extraído de uma bactéria endofítica, isolada de *Solanum lycocarpum* (Lobeira), mantida sob cultivo no laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética da Universidade Federal de Goiás.

Objetivos Específicos:

- Análise da estabilidade do plasmídeo,
- Análise da incompatibilidade do plasmídeo,
- Determinação do número de cópias do plasmídeo,
- Análise da seqüência de nucleotídeo do plasmídeo.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

IV. 1. Manutenção dos microorganismos.

A morfoespécie de bactéria endofítica, da qual foi extraído o plasmídeo utilizado neste trabalho, pertence ao Banco de Germoplasma do laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. Estes isolados são mantidos no meio Lúria-Agar, á temperatura ambiente, sendo repicados mensalmente.

IV. 2. Meios de Cultura

IV.2.1 – Meio de Lúria (L) (SAMBROOK *et.al*.,1989)

Peptona	10,0 g
NaCl	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Àgua destilada (qsq)	1000 ml

O pH foi ajustado para 7,2 e o meio autoclavado a 121° C por 20 minutos.

IV.2.2- Meio L-ágar (LA) (SAMBROOK *et al*.,1989)

Meio L contendo 15g/L^{-1} de Agar.
O meio foi autoclavado a 121°C por 20 minutos.

IV.2.3- Meio Maconkey

Peptona de gelatina	17,0g

Mistura de peptonas	3,0 g
Lactose	10,0 g
Mistura de sais biliares	1,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Agar	5,0 g
Vermelho Neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g

O pH final foi acertado para 7,1

IV.2.4 – Meio SOB

Triptona Bacteriológica	2% (p/v)
Extrato de levedura	5% (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5mM
$MgCl^2$	10mM
$MgSO^4$	10mM

O pH foi ajustado para 7,0 com KOH5M e o meio autoclavado a 121°C por 20 minutos.

IV.2.3 – Meio Maconkey

Peptona de gelatina	17,0 g
Mistura de peptonas	3,0 g
Lactose	10,0 g
Mistura de sais biliares	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Agar	5,0 g
Vermelho Neutro	0,03 g
Cristal Violeta	0,001 g

O pH final foi acertado para 7,1.

IV.2.4- Meio SOB

Triptona Bacteriológica	2% (p/v)
Extrato de levedura	5% (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl2	10 mM
MgSO4	10 mM

O pH foi ajustado para 7,0 com KOH5M e o meio autoclavado a 121°C por 20 minutos.

IV.3. Tampões

IV.3.1. Tampão TEM

Tris-HCl	pH8,0	10 m M
EDTA	pH8,0	1 mM
NaCl		100 mM

IV.3.2. Tampão de Equilíbrio

Tris-HCl pH7,5	50 mM
EDTA	2 mM
NaCl	100 mM

IV.3.3. Tampão R

Tris-HCl pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM

IV.3.4. Tampão de lavagem

Tris-HCl pH 7,5	20 mM
EDTA	2 mM

NaCl	200 mM

IV.3.5. Tampão B (TB).

Pipes	10 mM
MnCl2	55 mM
CaCl2	15 mM
KCl	250 mM

O pH foi ajustado para 6,7 com KOH 5M e o material foi filtrado com membrana milipore.

IV.3.6. Tampão de eletroforese (TEB5X) (SAMBROOK *et.al.*, 1989)

Tris-HCl	53,85 g/L
Àcido Bórico	27,5 g/L
EDTA	1,8 g/L

O pH foi ajustado para 8,0

IV.3.7. Tampão de amostra (5x) (SAMBROOK *et. al.*, 1989).

TEB	10 x
Glicerol	50% (v/v)
Azul de bromofenol	0,001 g

IV.3.8. Tampão REact 1

Tris-HCl	
MgCl2	50 mM

O pH foi acertado para 8,0

IV.3.9. Tampão React 2(5x)

Tris- HCl	250mM
MgCl2	50 mM
NaCl	250mM

O pH foi acertado para 8,0.

IV.3.10. Tampão REact 3 (5x)

Tris-HCl	250 mM
MgCl2	50 mM
NaCl	500 mM

O pH foi acertado para 8,0.

IV.3.11. Tampão REact 4 (5x)

Tris- HCl	100 mM
MgCl2	25 mM
NaCl	250 mM

IV.3.12. Tampão da fosfatase alcalina (CIP) 10x

Tris-HCl	500 mM
MgCl2	10 mM

IV.4. Soluções

IV.4.1. Lisozina	20 mg
Água destilada	1,0 mL

IV.4.2. RNAse A

RNAseA	10,0 mg

Acetato de sódio pH 4,8	50 mM
Água destilada	1,0 mL

Esta solução foi fervida por 10 minutos.

IV.4.3. Proteinase K

Proteinase	10 mg
Água destilada	1,0 mL

IV.4.5. Solução de Clorofane

Clorofórmio	500 mL
Fenol Saturado	500 mL
8- hidroxiquilina	0,05 g
B- mercaptoetanol	0,5 g
Tampão de equilíbrio qsq	100 ml

IV.4.6. Solução de clorofil

Clorofórmio	240 ml
Álcool isoamílico	10 ml

A solução foi completada com tampão de equilíbrio.

IV.4.7. Solução I

Tris- HCl pH 7,5	100 mM
EDTA	10 mM
RNAse I	400 mL

IV.4.8. Solução II

NaOH	0,2 M
SDS	1% (p/v)

IV.4.9. Solução III

Acetato de sódio	3 M
Acido acético	2 M

IV.4.10. Solução AI

Tris-HCl pH 8,0	20 mM
EDTA pH 8,0	2 mM
NaCl	200 mM
SDS	1% (p/v)

IV.4.12. Ácido acético 50% (v/v)

Ácido acético	1,0 mL
Água destilada	1,0 mL

IV.4.13. Solução de Lavagem

Tris-HCl pH 8,0	20 mM
EDTA	0,1 mM
NaCl	200 mM

IV.4.14. Solução de eluição

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

IV.4.15.IPTG

IPTG	100 mM

IV.4.16.X- GAL

X-Gal	0,04 g
N’, N’ dimetilformamida	1,0 mL

IV.5. Antibióticos

IV.5.1. Ampicilina 100x

Ampicilina	100 mg
Água destilada	1,0 mL

IV.5.2. Kanamicina 100 x

Kanamicina	100 mg

Água destilada	1,0 mL

IV.5.3.Tetraciclina 100 X

Tetraciclina	100 mg
Água destilada	1,0 mL

Obs.: As concentrações de uso dos antibióticos foram de 100 μg/mL.

IV.5.4. Marcador de massa molecular

DNA de fago λ digerido com Hind III (Pharmacia).

IV. 6. Extração de DNA

IV.6.1. Extração do DNA total (Marmur, 1961).

Colônias de bactérias endofítica Lob7 forma inoculados em 30 ml de meio Lúria e permaneceram sob agitação a 37° C por aproximadamente 16 horas.

As células para a extração do DNA foram coletadas através de centrifugação a 30xg, por 10 minutos, a 4°C. Posteriormente, forma ressuspensas em tampão TEN e incubadas com 0,75 ml de Lisozima (20 mg/mL) a 37°C por 30 minutos. Foram adicionados 10 µl de RNAse A (10 mg/mL) e ficaram incubadas por 15 minutos a 37°C. Adicionou-se 200 µl de SDS 20% (p/v) e 50 µl de proteinase K (10 mg/mL), ficando 1 hora incubados a 40°C. O DNA foi isolado e purificado pela extração com 5,0 ml de fenol saturado, centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e foi feita uma extração com 5,0 ml de clorofane. Novamente a fase aquosa foi corrigida para 300 mM adicionando-se a este 2,5 volumes de etanol 98% a -20°C, para precipitar o DNA. O DNA foi coletado com um bastão de vidro, lavado com etanol 70% (v/v) a -20°C e secado á temperatura ambiente. Para ressuspender o DNA foram utilizados 3,0 ml de tampão R. O material foi mantido a 0°C.

IV.6.2. Extração de DNA Plasmidial

Baseado no manual do fabricante do kit de extração FLEXIPREP^{tm} (Pharmacia), foi inoculado 1 clone em 5,0 ml de meio Lúria, contendo o antibiótico adequado a 37°C overnight, com agitação de 150 rpm. Foram centrifugados 1,5 ml deste material em tubos tipoeppendorf a 5.000xg por 2 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 200µl de solução I e 200 µl de solução II ficando incubados por 5 minutos. Foram adicionados 200 µl de solução III, homogenizados e centrifugados a 5.000xg por 2 minutos. O sobrenadante foi transferidopara outro tubo tipo eppendorf e a ele foi adicionado 500 µl de isopropanol absoluto que foi então homogenizado e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Logo em seguida foi secado a temperatura ambiente e ressuspenso em 150 µl de solução de Sephaglas^{tm} FP que permaneceu incubado por 5 minutos sofrendo homogenizações a cada minuto. Centrifugou-se o material por 2 minutos a 1,000xg e desprezou-se o sobrenadamente. O sedimento foi lavado com 200 µl de tampão de lavagem e novamente centrifugado por 2 minutos. Ao sedimento foi adicionado 300 µl de etanol 70% (v/v) que também foi centrifugado por 2 minutos. O sedimento permaneceu secando a temperatura ambiente por 20

minutos. O DNA plasmidial ligado ao Sephaglas^{tm} FP foi eluído adicionado ao sedimento 50 µl de tampão R, ficando incubado por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugado por 2 minutos a 5.000xg. O sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf e analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

IV.6.3.Extração do DNA plasmidial pUC18 e pLK39

O DNA plasmidial foi extraído de células de E. coli com a utilização do kit FLEXIPEP^{tm} (Pharmacia). As células foram crescidas em 100 mL de meio Lúria contendo antibiótico adequado (ampicilina 100µg/mL, Kanamicina 50µg/ml) a 37°C por 15 horas e coletadas por centrifugação a 8000xg por 5 minutos a 4°C. Em seguida o sedimento foi ressuspenso em 20 ml de tampão TEN gelado e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sedimento foi ressuspenso em 10 ml de solução I e a ele foi adicionado 500 µl de lisozima (20mg/ml) recém preparada, ficando incubada a 0°C por 5 minutos. Adicionou-se 10 ml de solução II, mantendo-se a mistura a temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se mais 10 ml de solução III, deixando a 0°C por 10 minutos. O material foi então centrifugado a 12.000xg por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e a ele foi adicionado 21 ml de isopropanol que permaneceu incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Ao sedimento foi adicionado 10 ml de suspensão de Sephaglas^{tm} FP que ficou incubado por 10 minutos, sofrendo agitação a cada 10 minutos. Centrifugou-se o material por 2 minutos a 1.000xg e desprezou-se o sobrenadante. O sedimento foi lavado com 10 ml de tampão de lavagem e novamente centrifugado por 2 minutos. Renovou-se o sobrenadante e ao sedimento foi adicionado 10 ml de etanol 70% (v/v) que também foi centrifugado por 2 minutos. Este sedimento por sua vez permaneceu secando a temperatura ambiente por 20 minutos. Para eluir o DNA plasmidial ligado ao Sephaglas^{tm} FP foi adicionado ao sedimento 1,00 ml de tampão R que ficou incubado por 5 minutos a 1.000xg. Todo o sobrenadante foi transferido para um tubo tipo eppendorf.

IV.7. Digestão de DNA com Enzimas de Restrição

Os sistemas de digestão foram preparados com água bidestilada, tampão adequado à enzima, DNA e a enzima apropriada, seguindo as instruções do fabricante. A quantidade de DNA utilizada para a digestão variou de 1,0 a 3,0 ng de acordo com o experimento.

O sistema preparado para a digestão do plasmídeo pUC18 foi incubado na temperatura para a enzima BamHI, 37°C, por 4 horas. Certificada a linearização do DNA plasmidial, foi realizada, então, a defosforilação do pUC18. Foram preparados sistemas, conforme orientação do fabricante, com água bidestilada, tampão da enzima fosfatase alcalina, DNA do pUC18/BamHI e a enzima fosfatase alcalina que permaneceram incubados por 30 minutos a 37°C. Em seguida, a incubação foi repetida por mias 30 minutos, adicionando-se fosfatase alcalina. Aos sistemas foram adicionados solução AI seguido de uma extração do DNA com clorofane e uma com clorofil. A concentração de NACl da fase aquosa, resultante das extrações, foi corrigida para 300mM adicionando-se a este 2,5 volumes de etanol 98% á – 20°C para precipitação do DNA. Os sistemas foram incubados por 30 minutos. Depois de desprezar o sobrenadante o material permaneceu secando a temperatura ambiente por 20 minutos, sendo ressuspenso em água bidestilada.

O sistema preparado para a digestão do plasmídeo pLK39 foi incubado na temperatura para a enzima Sau3AI, 37°C, por 5 minutos.

O sistema preparado para a digestão dos plasmídeo pUC18/pLK39 resultantes do processo de transformação, foi incubado na temperatura para a enzima EcoRI,37°C, por 4 horas.

IV.8. Purificação dos fragmentos de DNA plasmidial (pLK39).

Após a análise eletroforética da digestão do DNA plasmidial, em gel de agarose 0,8% (p/v) visualizada com o auxilio de uma lâmpada portátil de UV, foi realizada a extração dos fragmentos de interesse. O gel foi cortado na altura representada pelos fragmentos de interesse, utilizando o DNA de fagoλ/Hind III como referência. O pedaço do gel foi transferido para um tubo eppendorf e sua massa determinada. A extração de DNA a partir do pedaço de gel de agarose foi então processada conforme orientações do fabricante do kit de purificação Sephaglas^{tm} Band Prep da Pharmacia.

Para cada 250 mg de gel foram adicionados 250 µl de solução solubilizadora e 5µl de ácido acético 50% (v/v), ficando incubados pro 10 minutos a 60°C. Depois do resfriado, foi acrescentado 5µl de Sephaglas^{tm} FP que ficou incubado por 5 minutos. O material centrifugado e o sedimento foi lavado três vezes com a solução de lavagem. Por fim o material foi eluído em 20 µl de solução de eluição e quantificado através de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

IV. 9. Clonagem dos fragmentos de DNA do pLK39

Os sistemas de ligação para a clonagem das moléculas digeridas foram preparadas no sistema Ready-TOGO T4 DNA ligase da Pharmacia e incubados a 16°C por 18 a 20 horas. A concentração de DNA utilizada nos sistemas tinha uma razão molar (vetor: inserto) de 1:3.

IV. 10. Preparo e transformação de células competentes (INOUE *et.al.*,1990).

Foi feito um pré-inóculo das células de E.coli XL10 a serem transformadas (um clone isolado, em 5,0 ml de Lúria) que ficou incubado por 16 horas a 37°C. 500µl deste pré-inóculo foi adicionado em 250 ml de meio SOB, incubado a 37°C sob agitação por aproximadamente 3 a 4 horas, até atingir 0,5 D.O. em 60nm. As células ficaram a 0°C por 10 minutos e então foram coletadas pro centrifugação a 5.000g, 10 minutos e 4°C. Depois foram ressuspensas em 801 ml de tampão B e incubados a 0°C por 10 minutos. Alíquotas de 1 ml foram processadas e mantidas a -80°C. Para a transformação foram utilizados 200 µl de suspensão de células competentes e 10 µl dos sistemas de ligações, que foram cuidadosamente homogenizados e incubados a 0°C por 30 minutos. Após um choque térmico a 42°C por 2 minutos, foi adicionado 1,0 ml do meio Lúria Broth que permaneceu sob agitação a 37°C por 1 hora. Uma alíquota deste sistema (cerca de 100µl), foi plaqueada em meio Lùria Broth-ágar suplementado com ampicilina (100µl), IPTG (0,05 mM) e X-gal 0,05% (p/v) sendo incubado por 16 horas a 37°C, para selecionar as colônias transformantes.

IV.11.Minipreparação de plasmídeos

Baseado no manual do fabricante do kit de extração FLEXIPREP^{tm} (Pharmacia), foi inoculado 1 clone em 5,0 ml de meio Lúria, contendo o antibiótico adequado a 37°C durante a noite, com agitação. Foram centrifugados 1,5 ml deste material em tubos tipo eppendorf a 5.000xg por 2 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 200µl de solução I e 200 µl de solução II, ficando incubados por 5 minutos. 200µl de solução III foram adiconados, homogenizados e centrifugados a 5.000xg por 2 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo eppendorf e a ele foram adicionados 500µl de isopropanol que foi então homogenizado e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. Logo em seguida foi realizada uma centrifugação por 10 minutos a 5.000xg. O sedimento foi secado á temperatura ambiente a ressuspenso em 150µl de solução de Sephaglas^{tm}FP que permaneceu incubado por

5 minutos sofrendo homogenizações a cada minuto. Centrifugou-se o material por 2 minutos a 1.000xg e desprezou-se o sobrenadante. O sedimento foi lavado com 200 µl de tampão de lavagem e novamente centrifugado por 2 minutos. Ao sedimento foi adicionado 300 µl de etanol 70%(v/v) que também foi centrifugado por 2 minutos. O sedimento permaneceu secand a temperatura ambiente por 20 minutos. O DNA plasmidial ligado ao Sephaglas^{tm}FP foi eluído, adicionando-se ao sedimento 50µl de tampão R, ficando incubado pro 5 minutos á temperatura ambiente e centrifugado por 2 minutos a 5.000xg. O sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf e analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

IV.12.Eletroforese em gel de Agarose

Baseado em SAMBROOK *et al.* (1989) as amostras de DNA plasmidial foram analisadas por eletroforese em gel de agarose. A escolha da concentração do gel foi em função do tamanho do fragmento a ser analisado. Fragmentos foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) em presença de TEB5X e brometo de etídio (0,2µl/mL).

Submeteu-se o gel a uma amperagem de 30 mA até que a amostra entrasse no poço, sendo posteriormente ajustada para 60mA. A corrida foi interrompida quando a amostra atingiu a metade de gel. Visualizou-se as bandas de DNA plasmidial por irradiação ultra-violeta de baixa intensidade e foram fotografadas quando necessário.

IV.13. Ensaio de Estabilidade do Plasmídeo.

Baseado no método de Summers e Sherratt (1984), inoculou-se células de E.coli contendo o plasmídeo pLK39 em meio Lúria, suplementado com Kanamicina e incubou-se a 37°C durante a noite. 5µl dessa cultura foram transferidos para 5 ml de meio Lúria sem antibiótico e alíquotas foram plaqueadas em meio Lúria-ágar 1,5% (p/v), suplementado com Kanamicina e placas com o mesmo meio sem kanamicina. O restante da cultura foi mantida a 37°C por 24 horas, sob agitação de 1510rpm. Esse procedimento foi repetido durante 5 dias, com inoculações e plaquetamentos realizados a cada 24 horas.

IV.14. Ensaio da Incompatibilidade do Plasmídeo

Baseado no método de FU *et al.* (1998). Células de E.coli XL10 foram transformadas com os plasmídeos pLK39 e pACY184, pLK39 e pBR322 e pLK39 e pUC18,

foram inoculadas em meio Lúria, suplementado com Kanamicina e tetraciclina, kanamicina e ampicilina e incubadas a 37°C durante a noite. 5µl de cada uma dessas culturas foi inoculada em 5 ml de Lúria, contendo o antibiótico adequado, sendo que alíquotas foram plaqueadas me meio Lúria-ágar suplementado com ampicilina ou tetraciclina e placas contendo kanamicina. O restante da cultura foi mantido a 37°C sob agitação 150 rpm. Esse procedimento foi repetido durante 5 dias, com inoculações e plaqueamentos realizados a cada 24 horas.

IV.15. Determinação do número de cópias do plasmídeo.

Células de *E.coli* XL10 contendo os plasmídeos pLK39, pUC18 e pBR322 foram inoculadas em meio Lùria, suplementado com os antibióticos adequados e incubados durante a noite. Posteriormente, foram medidas as suas densidades ópticas a 660 D.O. Uma minipreparação dos plasmídeos foi realizada e a intensidade e quantidade das bandas analizadas em gel de agarose 1% (p/v), utilizando sistema de fotodocumentação e análise na *Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis Systen* (EDAS) 290.

IV.16. Seqüenciamento de pLK39

Para a realização do seqüenciamento automático foi utilizado aparelho MegaBace1000 Pharmacia. Foi utilizado o *Kit DYEnamic Dye Terminator Cyclo Sequencing da Amesham Pharmacia Biotecho*, nas seguintes condições: 2µl de DNA (100ng/µl), 1µL de primer (5µmoL), 4 µL de *DyEnamic Et Termination Reagent Premix* e 3 µL de H2O. O material foi submetido as seguintes condições de PCR: 95°C por 10 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Esse procedimento foi repetido por 30 vezes. Após o termino da reação de PCR, o material foi preciptado e ressuspenso em 10 µL da solução de ressuspensão, conforme as instruções do fabricante *Amersham Pharmacia Biotech*. O material foi submetido a uma injeção de 2KV por 110 segundos.

IV.17. Análise das Seqüências

As seqüências obtidas foram analisadas utilizando-se os programas: *Phred, Phrap and Consend-Autofimsh* desenvolvidos por pesquisadores da Universidade de Washingtom e pelos programas: *Blast e ORFinder* disponíveis no Instituto de Saúde nos Estados Unidos.

V. RESULTADOS

V. 1 Análise da Estabilidade do Plasmídeo pKL39

Para analisar a estabilidade do plasmídeo, células de *E. Coli* XL10, contendo o pLK39 foram cultivadas em meio Lúria, suplementado com kanamicina (50mg/mL) sob agitação, durante 24 horas. A cada 24 horas uma amostra da cultura foi plaqueada em meio LA contendo kanamicina e outra em meio LA sem antibiótico. Uma alíquota foi inoculada em meio L sem pressão seletiva. Este procedimento foi repetido até atingir 240 gerações de células bacterianas. A figura 3 mostra o percentual de células que mantiveram o plasmídeo. No quinto dia 81,5% das células continham o plasmídeo.

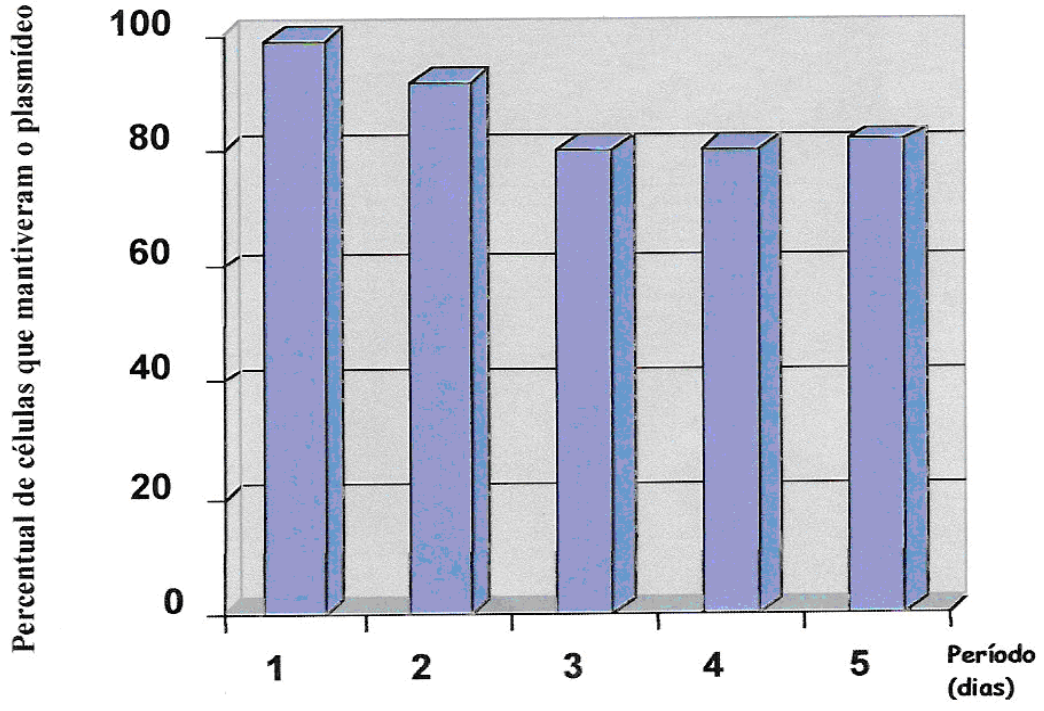


Figura 3. Análise da estabilidade do plasmídeo pLK39, em células de *Escherichia coli*, através da comparação do número de células obtidas em meio sólido com e sem antibiótico.

V. 2 Análise da incompatibilidade do plasmídeo pLK39

A tabela 2 mostra os resultados obtidos no teste de incompatibilidade do plasmídeo pLK39 com os plasmídeos: pUC18, pBR322 e pÁCYC184. Células de *E. coli* XL10 transformadas com os plasmídeos pLK39/pUC18, pLK39/pBR3222 e pLK39/pACYC184, foram uma amostra das culturas foi plaqueada em meio LA contendo ampicilina, tetraciclina ou kanamicina, dependendo do sistema. O número de colônias obtidas nas diferentes placas foram comparados. Os dados obtidos mostram que não há incompatibilidade entre os plasmídeos testados.

Tabela 2. Teste de incompatibilidade do plasmídeo pLK39

		Número de colônias/placa				
Tratamentos		24(h)	46(h)	72(h)	96(h)	120(h)
PLK39/pUC18	Ampicilina	3024	4224	3344	4440	4760
	Kanamicina	3160	2432	1832	2968	2400
PLK39/pBR322	Ampicilina	3280	2400	1776	nd	3720
	Kanamicina	1944	2256	1680	nd	2800
PLK39/pACYC184	Tetraciclina	2576	3464	3736	3264	3896
	Kanamicina	2520	3920	3200	3984	4080

Teste de incompatibilidade de pLK39 c/ pUC18 + amp., pLK39 c/ pUC18 + Kana., pLK39 c/ pBR322 + amp., pLK39 c/ pBR322 + Kana., pLK39 c/ pACYC184 + tetra. E pLK39 c/ pACYC184 + Kana., respectivamente. A célula utilizada foi XL10 e meio LA. Nd – não determinado, devido ao crescimento excessivo de células.

V 3. Determinação do número de cópias do plasmídeo pLK39

Para estimar o número de cópias do plasmídeo, foi realizada uma transformação de *E. coli* XL10 com os plasmídeos pLK39, pUC18 e pBR322. As células foram cultivadas em meio L, suplemento com o antibiótico adequado por 16 horas. O crescimento celular foi medido pela determinação de $D.O_{660nm}$. Foi realizada a minipreparação dos plasmídeos utilizando 2,0 mL de cada cultura 15µl do produto das minipreparações foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 4).

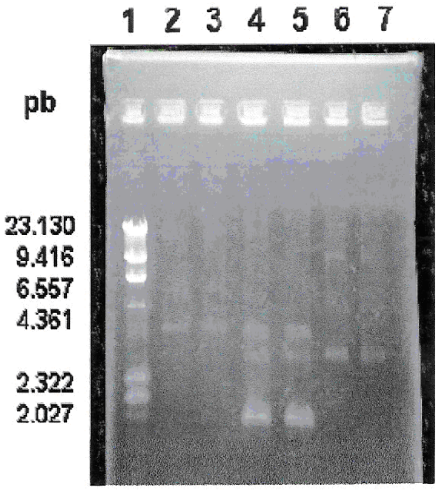


Figura 4. Comparação do número de cópias do pLK 39 com os plasmídeos pUC18 e pBR322. (1) Marcador Lambda/HindIII, (2) e (3) pLK39, (4) e (5) pUC18, (6) e (7) pBR322.

Após a análise por eletroforese em gel de agarose, foi realizada uma quantificação utilizando sistema de fotodocumentação e *análise Kodak Electroforesis Documentation and Analysis Systen* (EDAS). Os dados obtidos foram normatizados para a maior D.O. A tabela 3, sugere que o plasmídeo pLK39 apresenta um número de cópias semelhantes ao do plasmídeo pBR322.

Tabela 3. Quantificação dos Plasmídeos pLK39, pBR322 e pUC18.

Plasmídeos	D.O.$_{660nm}$	Quantidade de Plasmídeos(ng)	Normatização para a maior D.O.	Quantidade de Plasmídeos(ng)
PBR322	0,960	60,59	1,02	62,34
PLK39	0,996	66,90	1,00	66,90
PUC18	0,686	98,39	1,45	142,86

V. 4. Clonagem dos fragmentos de DNA do pLK39 digerido com Sal3AI

O vetor pUC18 foi digerido com a enzima de restrição **Bam**HI, enquanto que o DNA do plasmídeo pLK39 com a enzima **Sau**3AI. Essas moléculas de DNA foram misturadas e tratadas com enzimas T4 DNA ligase. O sistema de ligação foi utilizado para transformar células de *E. coli* XL10, tendo os clones transformantes sido selecionados em meio sólido contendo IPTG e X-GAL.

A diferenciação dos clones transmantes e recombinantes, foi feita diretamente na placa. Os clones contendo os plasmídeos religados apresentaram coloração azul devida ação da β-galactosidase ativa, enquanto que os plasmídeos recombinantes não apresentaram coloração.

Cerca de 1.0 mL dos sistemas de transformações de células de *E. coli* XL10 com os transformantes, foram inoculados em 5,0 mL de meio L e incubados por 16 horas. Essas culturas foram utilizadas para extrações dos plasmídeos através de minipreparações. Os plasmídeos obtidos foram posteriormente submetidos à análise através de eletroforese em gel de agarose 1%. Foi possível observar a presença de inúmeras bandas de tamanhos diferentes, o que caracteriza uma grande diversidade de plasmídeos recombinantes, quando comparados com o plasmídeos pUC18 intacto.

Visando promover a linearização dos plasmídeos recombinantes, foram realizadas digestões com a enzima de restrição **EcoRI**. O produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose ‘%. Os plasmídeos que apresentaram insertos com tamanhos maiores foram escolhidos para a reação de seqüenciamento.

V. 5. Resultados do Seqüenciamento

Alguns dos clones obtidos nas sub-clonagens do pLK39 no vetor pUC18, foram seqüenciados. Utilizando-se os programas Pherd, Phrap e Consed-Autofimsh, foi obtido uma seqüência com 1.637 pb. A figura 5 mostra a seqüência, e o sítio de **PstI** onde foi clonado o gene de resistência a kanamicina, que encontra-se destacado de vermelho.

TCCGAACACGGAGCTGCTGAGCGGCAACGGTCCAGGCATACTATGTAACGCGCGA
CGTCCTCGCATTGATGCCTGGCAGACCATCGTGAACGGCAGTCTGGGGCTGCACG
ACCGAACGCGCCGGAAAACCGGCGGGCACTGGTCACGCCGTCCGCGCTGCCGGAA
ACGAAGCAGGAAGCCGCTCAGGCGATTACGCGGGGTTTACTGGCCTTAGCCTCGT
CCGGGGAGCTGAAAACGCGTCAGGACGTCACTGAGGCGCTGGAAAGCGCAGGTTT
TGAGGTGGTTCGCACCACAAAAAGCAGCATCAGCATTTCCGACCCGGACGGGGGG
CGAAACATCCGACTGAAGGGAGCCATCTATGAACAGTCTTTTAACGCTGGCGAAG
GACTTAGAGCAGAAATCGAAAGTGCAGCAGCAGACTACCGGCGAGATGCTGAAAG
CCGCATTCAGCGAGCACGAGAAGTCTGTCAGAGCGGAACTGAACGAAAGCGAGAA
GAGAATCAGCGCCGCCATCCACGACCACGACCGGATGCTGTCCTCAGCCATGAGC
CAGCGTACGAAAGGGATGCTGCGCATGGTCAGCCAGACGTGGCTGACCATCGTCC
TGGTCTCCGTGCTGCTGATAGCCTCAAGTGCGGGCATTCTATGGTGGCAGGGGCA
GCAGATACTCGACAATTACACGACCATCCGGGAGCAGAAGAGCACGCAGGCCATG
CTGTCCGAGAGGAACAGCGGCGTGCAGCTCACGACCTGCGGAGAGGAACGACGCC
GCTGCGTGAGGGTGAACCCGGACGCGGGACGGTTCGGAGAGGATTCGAGCTGGAT
GATACTGGCGGGGAAATAGCACATGACGGAACTGGAAAAACAGTTGCTGAGCGCA
TTAGAGCAGCTACAGCAGGACTACTCGAAAAGGCTGGACGAGTGGGAGAGCGCCT
TCGCGGAATGGCGGACGATGTGTGGTCTTATGCAACGGGAGAACGCAGCGCTGAG
CGAGCGCGTCACGGACTTGAGCACGCAGGTGCTGAGTCTACGCGAGCAGCTGCGC
CGGTTGTCGTAAGGCTGAACGACATCGAGGCACACCGGGAGCAGGAGCGCGCAGC
GCAGCACCAGAAAGCGCTGGAGCTGGAACGATCGCAGCGTCAGCAGGAGTATGAC
AAGCATGATGCCTGGCGGGTACGGAAAAATTGTGGCGACCGAGCCTGCAGGGGGG
GGGGGGCGCTGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATACCAGGCCT
GAATCGCCCCATCATCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGGTTGTC
GGGAAGATGCGTATCCCCGGTACCGATAGATGTA

Figura 5. Seqüência de nucleotídeos do pLK39 (1637). Em vermelho, o sítio de PstI, onde foi inserido o gene de resistência a kanamicina.

V. 5.1 Alinhamento do pLK39 com os plasmídeos que apresentaram maior homologia

Após a retirada do fragmento do gene de resistência a kanamicina, a seqüência foi submetida ao GenBank, onde os dados mostram homologia entre o pLK39 e os plasmídeos: pSW200, pSW100, pEC3, pUCD5000 e pBERT. As seqüências foram alinhadas, utilizando o programa Clustal x (figura 6).

```
pSW100          GCTGGAGCTGAACTTCCTGATCCCGAACACGGAGCTGCTGACCGGCAGGCGTCTCCAGCC
pEC3            ------------------------------------------------------------
pSW200          ------------------------------------------------------------
pLK39           --------------------TCCGAACACGGAGCTGCTGAGCGGCAACGGT--CCAGGC
pUCD5000        ------------------------------------------------------------C
pBERT           --TTACCGGGAAGGATTTGAACATAATGAGAACTGCGGGGGGGTCAGGCTACTGGCATGC

pSW100          GTATTACGACCGCGCCGACCGACCGCGCATCGATGC-CTGGCAGACCATTGTGAAC----
pEC3            ---TTACGACCGCGCCGATCGTCCGCGCATCGATGC-CTGGCAGACCATCGTGAAC----
pSW200          -----ACGACCGCGCCGACCGTCCGCGCATCAATGC-CTGGCAGACCATTGTGAAC----
pLK39           ATACTATG-TAACGCGCGACGTCCTCGCATTGATGC-CTGGCAGACCATCGTGAAC----
pUCD5000        GTATTACGACCGTGCCGATCGTCCGCGCATTGATGC-TTGGCAGACTATCGTGAAC----
pBERT           CAGAAGCAGACAGGCTCAACGATGCCGAGTTACCTCATTAGCAGTACAGTAAGAAACCGA
                              **    **    **  *     *  * ****   *    ***

pSW100          -GGCAGGCTGGGGCTGCACGA---TCCGAACGCGCCGGAAAACCGGCGGGCGCTGGTCAC
pEC3            -GGCAGGCTGGGGCTGCACGA---CCGAACGCGCCGGAGAACCGGCGTGCGCTGGTCAC
pSW200          -GGCAGGCTGGGGCTGCACGA---CCCGAACGCACCGGAGAACCGGCGGGCGCTGGTCAC
pLK39           -GGCAGTCTGGGGCTGCACGA----CCGAACGCGCCGGAAAACCGGCGGGCACTGGTCAC
pUCD5000        -GGCAGGCTGGGGCTGCACGA---CCCGAATGCGCCGGAGAACCGGCGAGCGCTGGTCAC
pBERT           AGGGAAACGTGGGCAGTAAAAGACCTGGAACACGGCACAGCATTCCTGATCGCCAAAATT
                  ** *  *  **** * *  *      ***  *  *  *  *     *  * *

pSW100          GCCGTCCGCGCTG------CCGGAAACGA-AGCAGGAA-GCAG----CCCAAGCGATTAC
pEC3            GCCGTCCGCGCTG------CCGGAAGCGA-AACAGGAA-GCCG----CTCAGACGATTAC
pSW200          GCCGTCCGCGCTT------CCGGAAGCGA-AGCAGGAA-GCTG----CCCAGTCGATTAC
pLK39           GCCGTCCGCGCTG------CCGGAAACGA-AGCAGGAA-GCCG----CTCAGGCGATTAC
pUCD5000        GCCATCTGCGTTG------CCGGAAGCGA-AGCAGGAA-GCCG----CTCAGGCGATTAC
pBERT           ACCGGGTGTTTTAAAAGCCCTGATTACGACGACAGGAACGTCATAACCTTTGATGAATAC
                 **    *   *       * *    ***   ****** *       *      ** ***

pSW100          GCGGGGTTTACTGGCCTTAGC-TCGTCCGGGGAGCTGAAAACCCGGCAGGACGTCACTGA
pEC3            ACGGGGGTTACTGGCCTTAGCCTCGTCCGGGGAGTTGAAAACCCGTCAGGACGTCACTGA
pSW200          ACGTGGTTTGCTGTCCTTAGCCTCATCCGGGGAGCTGAAAACCCGCCAGGACGTCACTGA
pLK39           GCGGGGTTTACTGGCCTTAGCCTCGTCCGGGGAGCTGAAAACGCGTCAGGACGTCACTGA
```

Figura 6. Comparação das seqüências de nucleotídeos dos plasmídeos: pLK39, pSW200, pSW100, pEC3, pUCD5000 e pBERT.

```
pUCD5000        CGAGGTTTACTGTCCTTAGCCTCATCCGGGGAGCTGAAAACGCGTCAGGACGTCACGGA
pBERT           GCAGAAATT-CACACGCCAAAAGCATGGAAAATGCTAACCGATGGTCAGCGCTATCCGGT
                  *     ** *   *   *    * *       * * *      * ***  *    * *

pSW100          GGCGCTGGAAAGCGCAGGTTTTGAGGTGGTGCGCACCACAAAAAGCAGCATCAGCATTGC
pEC3            GGCTGTGGAAAGCGCAGGTTTTGAGGTGTTGCGTACAACAAAGAGCAGCATCAGCATTGC
pSW200          GGCGCTGGAAAGCGCAGGTTTTGAGGTGGTGCGCACGACTAAAAACAGTATCAGTATTGC
pLK39           GGCGCTGGAAAGCGCAGGTTTTGAGGTGGTTCGCACCACAAAAAGCAGCATCAGCATTTC
pUCD5000        GGCGCTGGAAAGCGCAGGTTTTGAGGTGGTACGCACCACAAAAAGCAGTATCAGCATTGC
pBERT           TGCTTACCTGAGCGCACAGGAAGCTTTTTTACGTATTG----AGGTAACACCGGAACAAC
                 **       ******      *   *  * ** *          *  * * * *   *

pSW100          CGGCCCGGACGGGGGGCGAAACATC--------CGACTC--AAGGGAGCCATCTATGAAC
pEC3            CGACCCGGACGGGGGGCGAAACATC--------CGACTG--AAGGGAGCCATCTATGAAC
pSW200          CGGCCCGGACGGGGGGCGAAACATC--------CGACTC--AAGGGAGCCATCTATGAAC
pLK39           CGACCCGGACGGGGGGCGAAACATC--------CGACTG--AAGGGAGCCATCTATGAAC
pUCD5000        CGACCCGGACGGGGGGCGAAATATC--------CGACTG--AAGGGAGCCATTTATGAAC
pBERT           TGGAATGGAAGAAATTCCATCCTTCATCCCCATCGGTTCCTAATACAGTGATTCCTGGTC
                 *    *** *     * *    **        **  *   **   **  **   ** *

pSW100          AGTCTTTTAACGCTGGCGAAGGACT------TAGAGCAGAAATCGAAAGTGCAGCAGCAG
pEC3            AGTCTTTTAACGCTGGCGAAGGACT------TAGAGCAGAAATCGAAAGCGCACGAGCAG
pSW200          AGTCTTTTAACGCTGGCGAAGGACT------TAGAGCAGAAATCGAAAGTGCAGCAGCAG
pLK39           AGTCTTTTAACGCTGGCGAAGGACT------TAGAGCAGAAATCGAAAGTGCAGCAGCAG
pUCD5000        AGTCTTTTAACGCTGGCGAAGGACT------TAGAGCAGAAATCGAAAGCGCAGCAGCAG
pBERT           TGGCTGAAGAGAAAACAGAAAAACTCTCCCTTAACGAGGCAATTGAAAGAGCCAAAA-AG
                 * **    *        ***  ***       **  *  * *** ***** **   *  **

pSW100          AGTACCGGCGAGATGCTGAAAGCCGC--ATTCAGCGAGCACGAGAAGTCTGTCAGAGCGG
pEC3            AGTACCGGCGAGATGCTGAAAGCCGC--ATTCAGCGAGCACGAGAAGTCTGTCAGAGCGG
pSW200          ACTACCGGCGAGATGCTGAAAGCCGC--ATTCAGCGAGCACGAGAAGTCTGTCAGAGCGG
pLK39           ACTACCGGCGAGATGCTGAAAGCCGC--ATTCAGCGAGCACGAGAAGTCTGTCAGAGCGG
pUCD5000        AGTACCGGCGAGATGCTGAAAGCCGC--ATTCAGCGAGCACGAGAAGTCTGTCAGAACGG
pBERT           GATATTAGCAACGCAACAGGGATTGATAGCTCAGCCATAACAATAAGC--ATCAAGATCT
                  **   ** *              *     ***** *  ** * ***    ***

pSW100          AACTGAGCGAAAGCGAGAAGAGAATCAGCGCCGCCATCCTCGACCACGACCGGAAGCTGT
pEC3            AACTGAGCGAAAGCGAGAAGAGAATCAGCGCCGCTATCCTCGACCACGACCGGAAGCTGT
pSW200          AACTGAGCGAAAGCGAGAAGAGAATCAGCGCCGCCATCCTCGACCACGACCGGAAGCTGT
pLK39           AACTGAACGAAAGCGAGAAGAGAATCAGCGCCGCCATCCACGACCACGACCGGATGCTGT
pUCD5000        AACTGAGCGAAAGCGAGAAGAGAATCAGCGCCGCCATCCACGACCACGACCAGAAGCTGT
pBERT           GATGAAGCGTGAACAACAAGATAG-CAGCCTCATGTTCTAGAACTGAACCTGTACGCCAG
                 *   * **  * * * **** *  **** *    **    **     *   * **

pSW100          CCTCAGC-----CATGAG---CCAGCGCACGAAAGGGATGCTGCGTATTGTCA---GCCA
pEC3            CTTCAGT-----CATGAG---CCAGCGCACGAAAGGGATGCTGCGCATGGTCA---GCCA
pSW200          CCTCAGC-----CATGAG---CCAGCGCACGAAAGGGATGCTGCGGATGGTCA---GCCA
pLK39           CCTCAGC-----CATGAG---CCAGCGTACGAAAGGGATGCTGCGCATGGTCA---GCCA
pUCD5000        TCTCAGC-----CATGAG---TCAGCGTACGAAAGGGATGCTGCGCATGGTCA---GCCA
pBERT           AAACAGCAAGCCCATGCTTTTCCGGCGCACAGATTCAAAGTGACGGACCGTTGTACGTTC
                    ***      ****      * *** **  *    * *   ** *  **     *
```

Figura 6. continuação

```
pSW100      -CGCTGAGCGAGCGCGTCACGG---ACTTGAGCAGGCACGTGCAGAGTTTGAG---CGAG
pEC3        -CGCTGAGCGAGCGCGTCACGG---GCTTGAGCAGGCAGGTGCAGAGTTTGAG---CGAG
pSW200      -CGCTGAGCGAGCGCGTCACGG---GTTTGAGCAGGCAGGTGCAGAGTTTGAG---CGAT
pLK39       -CGCTGAGCGAGCGCGTCACGG---ACTTGAGCACGCAGGTGCTGAGTCTACG---CGAG
pUCD5000    -CGCTGAGCGAGCGCGTCACGG---CCTTGAGCAGGCAGGTGCAGAGTTTGAG---CGAG
pBERT       CCTCTCGGACAGCATGGCCTGGTGCGCTTCTGCTCCCGGATGGTACGTGTAATTGTCGAG
             * **  *  ***  * *  **     **  **   *   **    ** *      ***

pSW100      CACGTGCGCCGGTTGTCGTGAGGATGAACGGGATAGAGGCGCACCGGGAGCAGGAGCTCT
pEC3        CAGCTAAGCCGGTTGTCGAAAG-------------------------------------
pSW200      CAGCTGCGCCGTTTGTCACAAGGCTGAATGGGATAGAGGCACTCCGGGAGCAGGAGCGGG
pLK39       CAGCTGCGCCGGTTGTCGTAAGGCTGAACGACATCGAGGCACACCGGGAGCAGGAGCGCG
pUCD5000    CACGTACGCCGGTTGTCGTAAAGCTGAACAGTATTGAGGCACTTCGGGAGCAG-------
pBERT       TATCTGCGCC-CCTGCCACCA--CAGAATGCTTGCGCCCGATGCTGTCAGCAGTGTAGAC
             *  *  ***   ** *   *

pSW100      CAGCGCAGCATCAGAAAGCGCTGGAGCTGGAACGATCGCAGCGGCAACGGACGTATGACG
pEC3        ------------------------------------------------------------
pSW200      CGGCACAGCATCAGAAAGCGCTGGAGCTGGAACGATCACAGCGACAACGGACGTATGACG
pLK39       CAGCGCAGCACCAGAAAGCGCTGGAGCTGGAACGATCGCAGCGTCAGCAGGAGTATGACG
pUCD5000    --------CACGAGAAAGAGCTGGAGCTTGAACGCTCGCAGCGTCAGCAGACGTATGATG
pBERT       ACCAAGACGATGGTCAGCCACGTCTGGCTGACCATCCGCAGCAT-ACCTTTCGTGCGCTG

pSW100      GTCCGTCGCTGTAACAAACCGGATGTAATG----------------------------
pEC3        ------------------------------------------------------------
pSW200      GTCCGTCGCTGTAACAAACCGGATAAAACGGGGC-------------------------
pLK39       GTCCGTCGCTGTGATAA-CCGGATAAAACGGGGCTTTCATTGAGGATCTGCGCCGAAACC
pUCD5000    GTCCGTCGCTGTGATAAACCGGA-------------------------------------
pBERT       GCTCATGGCAGCGGACAGCTTCCTGTCGTGGTCGAGGATGGCGGCGCTGATTCTCTTCTC
```

Figura 6. continuação

V. 5.2. Inferência filogenética entre o plasmídeo pLK39 e os plasmídeos que apresentaram maior homologia

As bactérias nos processos evolutivos sofreram uma série de divergências, que ocasionaram divergências nos plasmídeos, o que nos permite fazer uma inferência filogenética entre o pLK39 e os plasmídeos com os quais ele apresentou homologia (Figura 7).

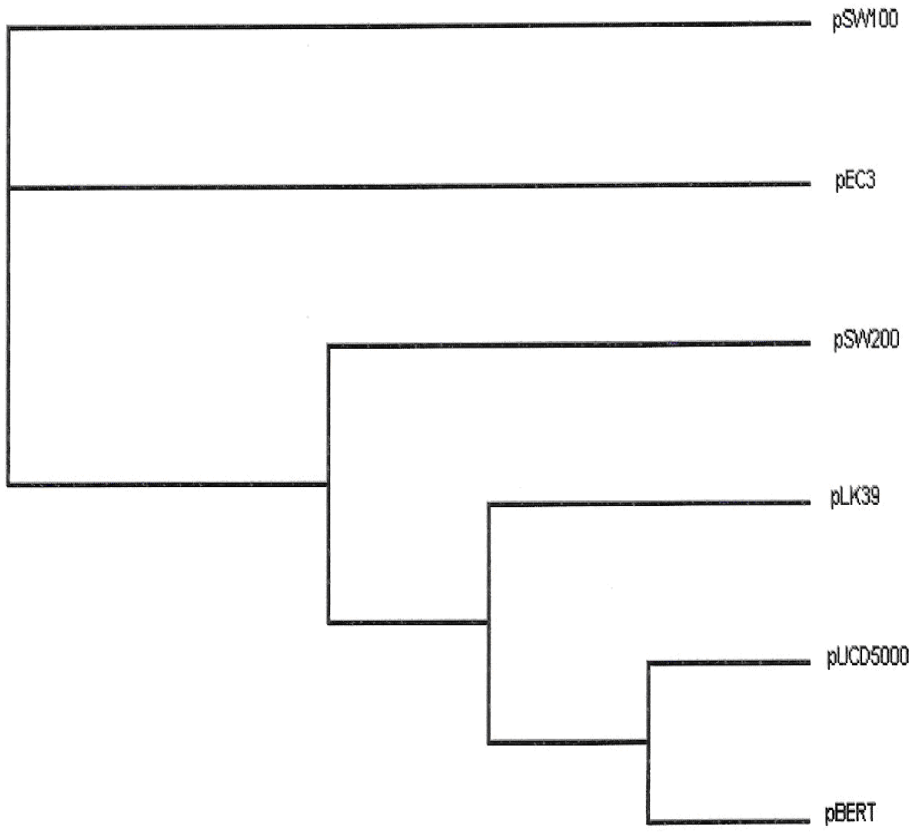


Figura 7. Clandograma mostrando a inferência filogenética entre o pLK39 e os plasmídeos pSW200, pSW100, pEC3, pUCD5000 e pBERT.

V. 5.3. Análise de genes contidos no fragmento de pLK39 seqüenciado

Quando a seqüência foi traduzida, no ORFinder, obtivemos dois genes inteiros: ORF I e ORF II (Figura 8. A e 8 B).

```
pSW200          MNSLLTLAKDLEQKSKVQQQTTGEMLKAAFSEHEKSVRAELSESEKRISAAILDHDRKLS
pLK39           MNSLLTLAKDLEQKSKVQQQTTGEMLKAAFSEHEKSVRAELNESEKRISAAIHDHDRMLS
pEC3            MNSLLTLAKDLEQKSKAHEQSTGEMLKAAFSEHEKSVRAELSESEKRISAAILDHDRKLS
pUCD5000        MNSLLTLAKDLEQKSKAQQQSTGEMLKAAFSEHEKSVRTELSESEKRISAAIHDHDQKLF
pSW100          MNSLLTLAKDLEQKSKVQQQSTGEMLKAAFSEHEKSVRAELSESEKRISAAILDHDRKLS
pBERT           MNSLLTLAKDLEQKSKAQQQSTGEMLKAAFSEHEKSVRAELSESEKRISAAILDHDRKLS
                ****************.::*:******************:**.********** ***: *

pSW200          SAMSQRTKGMLRMVSQTWLTIVLVSALLIASSAGILWWQGQQILDNYTTIREQKSTQAML
pLK39           SAMSQRTKGMLRMVSQTWLTIVLVSVLLIASSAGILWWQGQQILDNYTTIREQKSTQAML
pEC3            SVMSQRTKGMLRMVSQTWLTIVLVSVLLIASSAGILWWQGQQILDNYTTIREQKSTQAML
pUCD5000        SAMSQRTKGMLRMVSQTWLTIVLVSALLIASSAGILWWQSQQILDNYTTIREQKNTEAIL
pSW100          SAMSQRTKGMLRIVSQTWLTIVLVSVLLIASSAAILWWQSQQILDNYTTIREQKSTQAML
pBERT           AAMSQRTKGMLRMVSQTWLTIVLVSTLLTASGASILWWQGRRYSTITRTIREQKRTRPCC
                 :.**********:************.** **.*.*****.::      ****** *..

pSW200          SERNSGVQLTTCGEQRRRCVRVNPEAGRFGEDSSWMILAEK
pLK39           SERNSGVQLTTCGEERRRCVRVNPDAGRFGEDSSWMILAGK
pEC3            SERNSGVQLTTCGEQRRRCVRVNPEAGTFGEDSSWMILAGK
pUCD5000        SERNSDLQLSTCGEQRRHCVRVNPEAGRFGEDSSWMILAGK
pSW100          SERNSGVQLSTAAIR---------DAAA-------------
pBERT           P-RGTAVCSSRPAESR--------DAAA-------------
                . *.: :  :  .           :*.
```

Figura 8. A. Comparação entre as seqüências de nucleotídeos dos genes da ORF I do pLK39 e dos genes mob B dos plasmídeos pSW200, pSW100, pEC3, pUCD5000 e pBERT.

```
pSW200          MTELEKQLLSALEQLQQDYSKRLDEWESAFAEWRTMSGLMQRENAALSERVTGLSRQVQS
pLK39           MTELEKQLLSALEQLQQDYSKRLDEWESAFAEWRTMCGLMQRENAALSERVTDLSTQVLS
pEC3            MTELEKQLLSALEQLQQDYSKRLDEWENAFAEWRTMSGLMQRENAALSERVTGLSRQVQS
pSW100          MTELKKQLQSALEQLQQDYSKRLDEWENAFAEWRTMSGLMQRENAALSERVTDLSRHVQS
pUCD5000        MTELEKQLLSALEQLQQDYSKRLDEWENAFAEWRTMSGLMQRENAALSERVTALSRQVQS
                ****:*** ******************.********.*************** ** :* *

pSW200          LSDQLRRLSQG
pLK39           LREQLRRLS--
pEC3            LSEQLSRLSKG
pSW100          LSEHVRRLS--
pUCD5000        LSEHVRRLS--
                * ::: ***
```

Figura 8. B. Comparação entre as seqüências dos genes da ORF II do pLK39, com os genes mob D dos plasmídeos pSW200, pSW100, pEC3 e pUCD5000.

Essas seqüências, quando submetidas ao GenBank, obtiveram homologia com os genes mobB e mobD, respectivamente com os plasmídeos: pSW200, pEC3, pUCD5000, pSW100 e pBERT. Em relação ao mobB, o pLK39 possui 161 resíduos de aminoácidos, apresentando 96%, 94% e 96% de homologia com os plasmídeos pSW200, pUCD5000 e pEC3, respectivamente, sendo que estes plasmídeos também possuem 161 resíduos de aminoácidos. Já com os plasmídeos pSw100 e pBERT, ele apresentou 96% e 87% de homologia, respectivamente, e ambos possuem 139 resíduos de aminoácidos. (Figura 9).

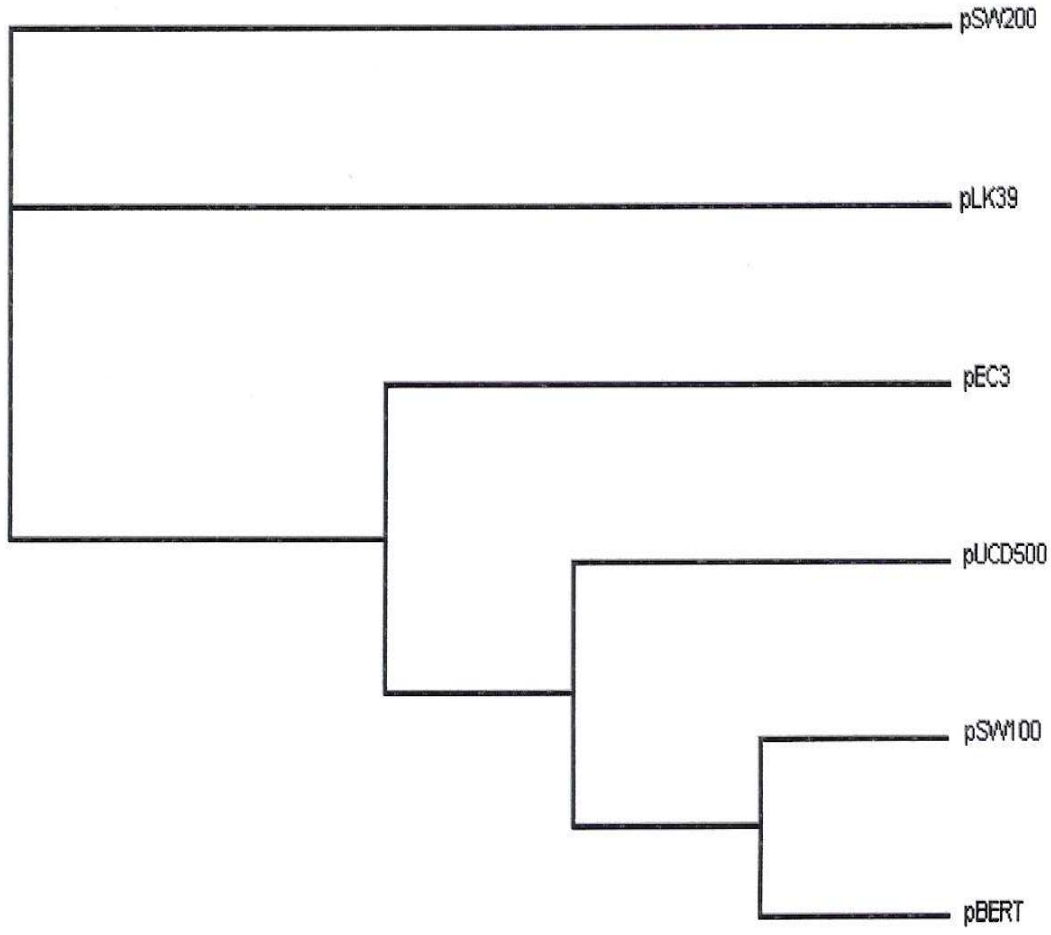


Figura 9. Clandograma mostrando a inferência filogenética entre as seqüências mob B do pLK39 com os plasmídeos pSW200, pSW100, pEC3, pUCD5000 e pBERT.

Em relação ao mobD, o pLK39 possui 71 resíduos de aminoácidos, apresentando 92% e 90% de homologia com os plasmídeos pSW200 e pEC3, respectivamente,sendo que ambos os plasmídeos,possuem 71 resíduos de aminoácidos. Com os plasmídeos pUCD5000 e pSW100, que possuem 69 resíduos de aminoácidos, ele apresentou 90% e 80% de homologia (Figura 10).

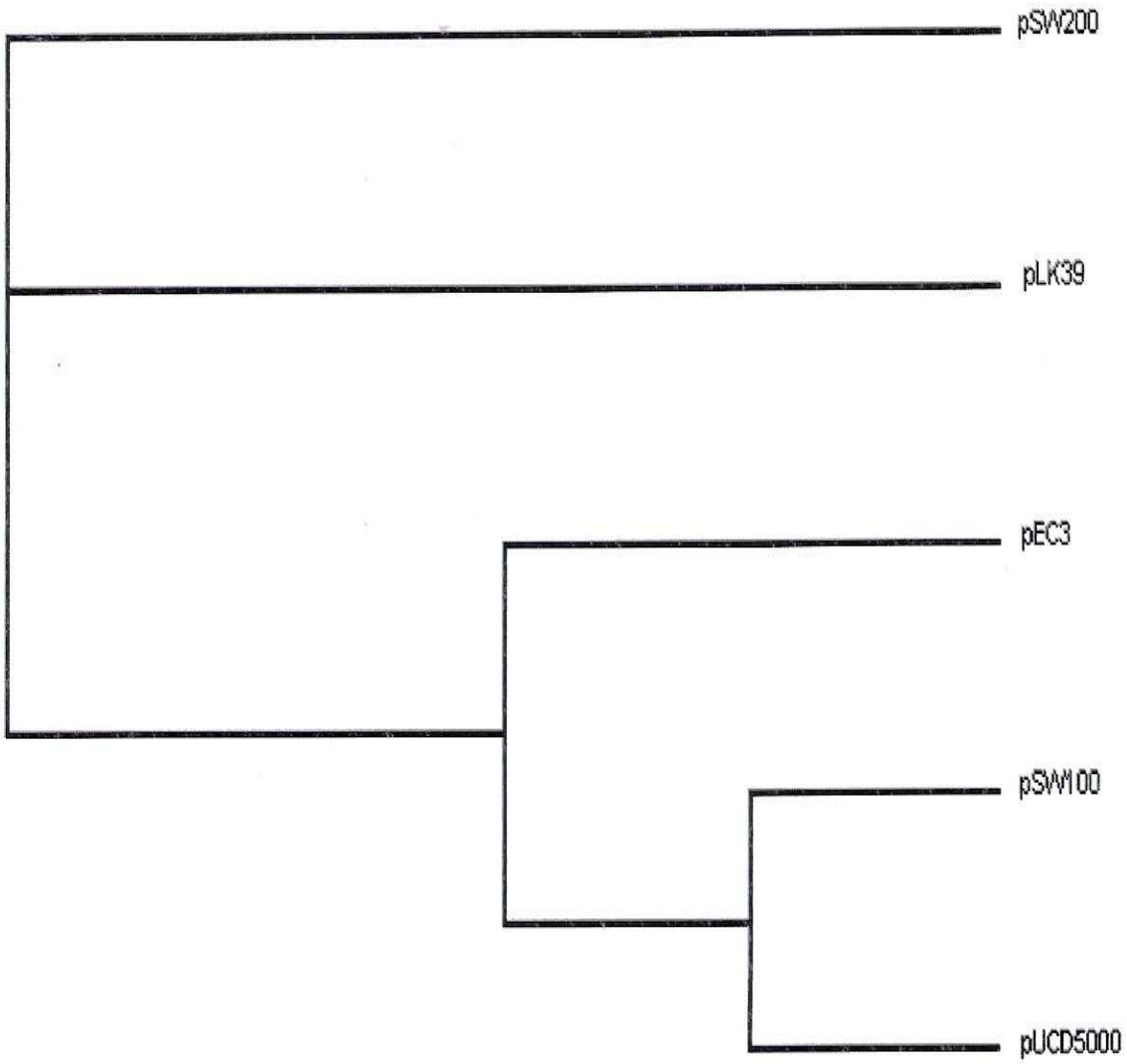


Figura 10. Clandograma mostrando a inferência filogenética entre seqüências de genes do mobD do pLK39 e os plasmídeos pSW200, pSW100, pEC3 e pUCD5000.

VI. DISCUSSÃO

Os plasmídeos são elementos extracromossomais com capacidade de replicação autônoma, constituídos por uma única molécula de DNA fita dupla circular. Por serem capazes de se auto-duplicar, os plasmídeos são também considerados replicons, que se multiplicam independentemente do cromossomo bacteriano. O tamanho dos plasmídeos pode variar de 1 a 200 kb, e a seqüência nucleotídica da maioria tem pouca ou nenhuma homologia com o cromossomo da célula hospedeira, podendo ser considerados, sob este ponto de vista, como elementos estranhos à bactéria. Em geral, plasmídeos pequenos estão presentes em várias cópias por células (plasmídeos multicópias), enquanto que plasmídeos maiores estão freqüentemente presentes numa única cópia (plasmídeos cópia-única).

É comum encontrarem-se na natureza bactérias portadoras de inúmeros plasmídeos distintos. Esses plasmídeos tendem, contudo, a serem perdidos quando essas bactérias são mantidas em laboratório. Tal fato ocorre porque o DNA plasmidial usualmente não codifica nenhum produto com função essencial para a célula hospedeira. As vantagens adaptativas conferidas pela presença dos mesmos operam apenas quando outros fatores, que não a simples disponibilidade de nutrientes, determina a sobrevivência da célula (Zaha, 1996).

Os plasmídeos apresentam dois grupos de genes: o primeiro, responsável pela sua duplicação e disseminação, e outro, responsável por conferir novas características fenotípicas à célula hospedeira (Coplin, 1989), as quais podem determinar a especifidade do hospedeiro. Segundo Panoulos & Peet (1985), o estudo de plasmídeos como elementos acessórios em bactérias se concentra principalmente em: a) na detecção e caracterização de vários isolados, patovares e espécies; b) em pesquisa de características associadas a plasmídeos; c) transmissão entre isolados; d) no desenvolvimento de ferramentas para análise genética *in vivo e in vitro*, e e) sistemas de transformação em plantas.

Neste contexto, o estudo destas estruturas através da caracterização e da análise da sua seqüência de nucleotídeos, torna-se ainda mais interessante, tendo sido utilizado neste trabalho um plasmídeo extraído de uma bactéria endofítica, isolada de *Solanum lycocarpum*, pertencente ao laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética (UFG/GO).

VI.1 Estabilidade do Plasmídeo pLK39

A estabilidade do plasmídeo pLK39, foi testada em celulas de *Escherichia coli* XL10, sendo que estas foram cultivadas em meio L e subcultivadas a cada 24 horas até atingirem um total de 240 gerações. No quinto dia, 81,5% das células continham o pLK39, indicando que o plasmídeo pode se manter estável nas células de *E. coli* em meio L por no mínimo 240 gerações. Dados semelhantes foram obtidos por Fu *et al*. (1998). Eles testaram a estabilidade do plasmídeo pSW200, utilizando um dos seus derivados, o pSW203. Eles transformaram células de *E. coli* HB101 com pSW203, cultivando-se em meio L e subcultivando-as a cada 12 horas até atingirem um total de 140 gerações, sendo que os resultados obtidos mostraram que esse plasmídeo podia se manter estável por no mínimo 140 gerações, uma vez que 100% das células conservavam o plasmídeo.

A estabilidade do plasmídeo pUCD5000, foi testada com a construção de um derivado, o plasmídeo pUCD5002, com a inserção dentro de um sítio único de **EcoRV**do plasmídeo, de um fragmento de **HindIII0EcoRI** contendo o gene de resistência a kanamicia do plasmídeo pJH1. Uma cultura “overnight” de células de *Pantoea citrea* hospedando o pUCD5002 foi subcultivada em meio L-Rm e apropriadamente diluídas, sendo plaquedas em meio L-Rm-agar 1.5% (p/v) com ou sem kanamicina (15µg/mL) para mensurar a proporção de células contendo plasmídeos no total da população. Após 192 gerações, 90% das células ainda continham o plasmídeo, indicando que ele é significativamente estável (Pujol et al.,1998).

Segundo Summers & Sherratt (1984), os plasmídeos ColE1 e seus derivados, são bastante estáveis, apesar de apresentar um alto número de cópias, característica esta, que influencia na baixa estabilidade de outros plasmídeos. Eles sugerem que a estabilidade do ColE1 e de seus derivados, ocorre em função da presença, nestes plasmídeos, de um gene determinante *cer*, que é necessário para converter a forma de multímero dos plasmídeos, pois há evidencias de que o plasmídeo ColE1 e os plasmídeos a ele relacionados são divididos randomicamente durante a divisão celular, e a sua estabilidade é correlativamente inversa à multinerização plasmidial, e os fatores ou condições que reduzem a multimerização aumentam a estabilidade.

A estabilidade do plasmídeo pXV2, de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatória,* também foi testada, células de Xv65 contendo os plasmídeos derivados do pXV2; pOKE34, p55PK, -25PK, p25PK ou p21PK foram cultivadas e subcultivadas em meio não seletivo. Após 100 gerações, 98% das células mantiveram os plasmídeos pOKE34 e p55PK, mostrando

que estes plasmídeos são estáveis. Em contraste, após as 100 gerações, apenas 35% das células mantiveram o plasmídeo p25PK e 15% das células mantiveram o plasmídeo p21PK (Wu *et al*., 2000).

VI. 2 Incompatibilidade do plasmídeo pLK39

Uma grande variedade de plasmídeo ocorre em bactérias e eles são classificados com base em dois critérios: o organismo hospedeiro no qual um determinado plasmídeo é descoberto, e, o grupo de incompatibilidade ao qual ele pertence, definindo com base na sua habilidade de coexistir na célula com outros plasmídeos (Zaha, 1996).

Existem casos de incompatibilidade entre plasmídeos. Para explicar o fenômeno, sugeriu-se, então, a existência de sítios de manutenção nas células, aos quais os plasmídeos se ligam para efetuar a duplicação. Plasmídeos compatíveis devem ter sítios de manutenção diferentes e plasmídeos incompatíveis têm o mesmo sitio de manutenção, não podendo, portanto, coexistir na mesma célula (Azevedo, 1998).

O teste de incompatibilidade do pLK39 foi realizado entre ele e os plasmídeos: pBR322, pACYC184, e pUC18. O plasmídeo pBR322, geralmente não é estável quando cultivado em meio não seletivo (Summers & Sherratt, 1984), sendo necessário criar um meio, seletivo adicionado ampicilina para a manutenção do pBR322. Similarmente, tetracilina e ampicilina foram também adicionados para a manutenção dos plasmídeos pACYC184 e pUC18.

As células de *E. coli* XL10 transformadas com os plasmídeos pLK39/pBR322; pLK39/pACYC184 e pLK39/pUC18 foram cultivadas até atingirem um total de 240 gerações de células bacterianas. Os resultados indicaram que o plasmídeo pLK39 se manteve estável nas células e foi compatível com os plasmídeos do tipo ColE1. Um resultado similar foi obtido por Fu *et al*. (1998), quando realizaram o teste de incompatibilidade do plasmídeo pSW203 com os plasmídeos: pBR322, pACYC184 e pSW106. Após analisarem as seqüências nucleotídicas destes plasmídeos, observaram que as regiões em RNAI em forma de loop, eram diferentes, sugerindo ser esta a causa da compastibilidade.

Os plasmídeos pLK39 e pUC18 se mostraram menos compatíveis. Apenas 50% das células *E. coli* XL10 co-transformadas com os plasmídeos pLK39/pUC18, mantiveram o pLK39 quando cultivadas em meio sem pressão seletiva. O plasmídeo pUC18 apresenta um número elevado da cópia entre 500 a 700 (Sambrook *et al*., 1989). Este fato poderia, de alguma forma, diminuir a estabilidade do plasmídeo pLK39, resultando em um número menor

de células mantendo o plasmídeo, quando comparado com os dados obtidos para pBR322 e pACYC184.

VI.3 Determinação do número de cópias do plasmídeo pLK39

O número de cópias de um plasmídeo é sugerido como um fator importante na instabilidade de plasmídeos. Sabe-se que os plasmídeos multicópias, utilizados como vetores de clonagem, são bastante instáveis, devido ao seu número excessivo de cópias (Summers & Sherratt, 1984).

O plasmídeo pUC18, apresenta de 500 a 700 cópias por célula, já o plasmídeo pBR322, apresenta de 20 a 25 cópias por células (Sambrook *et al*., 1989). O número de cópias do plasmídeo pLK39, foi estimado por reletroforese em gel de agorose 1%, e posterior quantificação utilziando sistema de fotodumentação a análise Kodak Electroforesis Documentation and Analysis Systen (EDAS), e comparação com os plasmídeos pUC18 e pBR322. Os resultados mostraram que o plasmídeo pLK39, apresenta um número de cópias semelhantes ao do plasmídeo pBR322, sendo estimado em 25 cópias por células. Um procedimento semelhante foi realizado para determinar o número de cópias do plas,ídeo pSW200 e dos seus derivados, que foram estimados em torno de 10 cópias por células (Fu *et al.*, 1998).

VI. 4 Estratégias utilizadas nas subclonagens do plasmídeo pLK39 no vetor pUC18

Objetivando a obtenção da clonagem do pLK39 no vetor pUC18 bem como uma grande variedade de pmasídeos recombinantes, foi desenvolvida a seguinte estratégia de clonagem: O DNA do pLK39 foi submetido à digestão, utilizando-se a enzima **Sau**3AI.

O pUC18 foi digerido com a enzima **Bam**HI, que apresenta extremidades complementares as produzidas pela digestão dos DNAs plasmidiais com a enzima **Sau**3AI (5’/GATC3’).

Fragmentos do DNA do pLK39 foram clonados no plasmídeo linearizado, carregando extremidades compatíveis. Durante esta reação de ligação, o DNA do plasmídeo pLK39 e o DNA do plasmídeo pUC18 se unem, formando moléculas quiméricas circulares.

Para otimizar a obtenção de um maior número de moléculas quiméricas, foi necessário ajustar cuidadosamente a concentração dos dois tipos de DNAs (vetor e cromossomal). Sambrook *et al*. (1989) sugerem que a relação entre as moléculas de vetor e do

inserto deve ser de 1:3. Se a concentração do inserto é substancialmente menor que a do vetor, o número de moléculas quiméricas será muito pequeno, dificultando a obtenção de uma grande quantidade de colônias bacterianas transformadas.

O preparo das células de *E. coli* XL10 competentes, resultou numa eficiência satisfatória de transformação. O principio de preparo destas células se baseia no tratamento com misturas de cátions divalentes para manter temporariamente a permeabilidade da membrana plasmática e pequenas moléculas de DNA. Algumas variações das técnicas de Inouse et al. (1990) e Hanahn (1983) têm sido descritas em trabalhos de clonagem, todas direcionadas à otimização da eficiência de transformação de diferentes bactérias com diferentes plasmídeos.

Quando o pUC18 religado ou intacto, contendo o gene de β-galactosidase, *lacZa* integro, foi introduzido em células de *E coli* XL10 competentes, ocorreu uma α-complementação, e as células de *E coli* XL10 expostas ao indutor IPTG adquiriram a a capacidade de metabolisar o substrato cromogênico X-gal, um análogo da lactose, clivado-o e formando um precipitado de cor azul. As colônias que continham os plasmídeos com o gene de β-galagtosidase intacto apresentavam a cor azul, indicando a presença de plasmídeos religados.

Quando o gene de β-galagtosidase, *lacZa,* do pUC18 foi inativado pela inserção de um fragmento de DNA exógeno na região de múltiplos sítios de clonagem, ele perdeu a capacidade de programar a hidrolise o sunstrato X-gal pelas células transformadas, impedindo a formação do precipitado azul. Assim, as colônias transformadas com as moléculas quiméricas apresentaram uma coloração branca, caracterizando a presença de plasmídeos recombinantes.

Assim, o desenvolvimento desse simples teste colorimétrico simplificou a identificação dos clones recombinantes construídos no pUC18. O reconhecimento de centenas de colônias foi feito visualmente para identificar as colônias que carregavam os supostos plasmídeos recombinantes. A análise dos plasmídeos recombinantes, e digestão com *EcoRI*, permitiu analisar a variedade dos perfis eletroforéticos, e selecionar os insertos adequados para o seqüenciamento do plasmídeo pLK39.

VI. 5 Análise da seqüência do plasmídeo pLK39

Os clones seqüenciados permitiram a obtenção de um fragmento de DNA contendo 1637 pb. Parte desse fragmento continha um pedaço do gene de resistência a kanamicina, o qual foi utilizado como marca de seleção.

A seqüência obtida, sem a região contendo o gene de resistência à kanamicina, foi utilizada para se buscar homologia com outras seqüências de DNA depositados no GenbANK. Utilizando o programa Blast (Altschul et al., 1997), foi encontrado homologia com os plasmídeos pSW100, pSW200, pEC3, pBERT e pUCD5000. Esses plasmídeos foram isolados de *Erwinia stewartii*, *Erwinia caratovora, Salmonella sp. Berta e Pantoea citrea*, sendo todas bactérias Gram-negativas. O pLK39, também foi isolado à parte de uma bactéria Gram-negativa.

O conteúdo de G+C e a organização estruturak desses plasmídeos, contendo os genes mobABCD, origem de replicação semelhantes à do plasmídeo ColEI (Fu et al.1998), o tamanho semelhante do plasmídeos, sugere que houve um plasmídeo ancestral comum (Figura 11 A e 11 B).

Utilizando-se o programa ORFinder, foram encontrados dois possíveis genes, denominados de ORFI e ORFII.

A seqüência ORFI apresenta grande homologia com o gene mobB, presnete no splasmídeos pSW200 (96%), pSW100 (96%), pEC3 (94%), pBERT (87%) e pUCD5000 (94%).

Essa homologia tão grande sugere que esse gene é importante para a manutenção das funções desenvolvidas por esses plasmídeos (Figura 8).

A ORFII apresenta grande homologia com o gene mobD dos plasmídeos pSW200 (92%), pSW100 (90%), pEC3 (90%) e pUCD5000 (89%). O plasmídeo pBERT apresenta uma mutação dentro da região codante do gene mobD, de tal forma a não permitir a correta tradução desse gene (Figura 8 B).

Quando se comparou os dados de homologia, foi possível observarmos que o gene mobB é mais conservado do que o gene mobD. A pressão seletiva apara se manter conservado o gene mobB, que 2,5 vezes maior que o gene mobD, pode ser explicada de duas formas: 1) o gene mobB é mais importante para realizar a mobilização de DNA em bactérias Gram-negativas; 2) o gene mobD poderia ser responsável pelo reconhecimento da maquinaria do hospedeiro.

O fragmento de 1.637 pb contém homologia com a seqüência do gene mobA dos plasmídeos pSW200, pBERT, pUCD5000 e pEC3. Entretanto, o seqüenciamento não está completo. Assim, não se pode afirmar que o plasmídeo pLK39 apresenta o gene mobA funcional. O plasmídeo pSW100, apresenta uma muração no gene mobA que impede a formação de uma proteína funcional.

Figura 11.A. – Mapa físico do plasmídeo pSW200

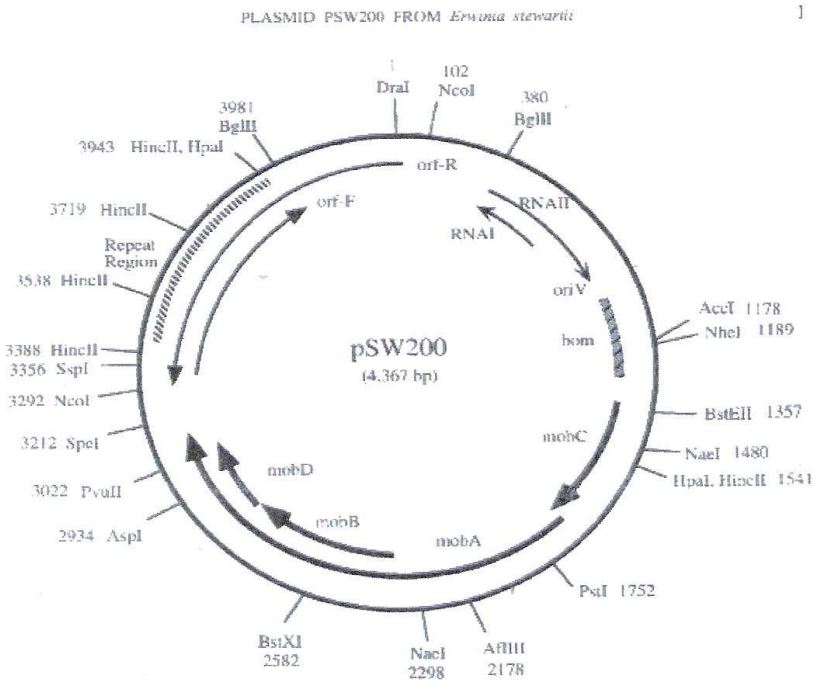
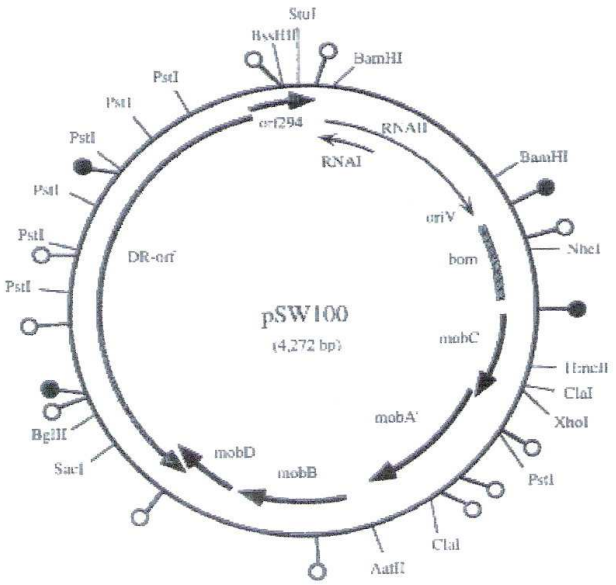


Figura 11.B. Mapa físico do plasmídeo pSW100



VII. PERSPECTIVAS

VII.1. Construção de novos primers, para obter a sequência total do plasmídeo pLK39;

VII.2. Realização de experimentos de mobilização,

VII.3. Construção de novos vetores com genes que permitam o controle biológico.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEGRE,M.T.;Rodriguez,M.& Mesas, J.M. (1998). Nucleotide sequence analysis of pRS1, a cryptic plasmid from Oenococcus oeni. Plasmid. **41**:128-134.

ALTSCHUL,S.F., Madden, T.L.; Shaffer, A.A.;Zhang, J.;Zhang, Z.;Miller, W.& Lipman, D.J. (1997) "Gapped Blast and PST-Blast: a new geration of protein database search programs". Nucleic Acids Res. **25**:3389-3402.

ARAÙJO, W.L. (1996). Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros. Tese de mestrado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

ARAÙJO, W.L.; Maccheroni, W.; Aguilar-Vildoso, C.I.;Barroso, P.A.V.;Saridakis, H.O. & Azevedo, J. L. (2001). Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. J. Miicrobiol.**47**:229-236.

ASTOLFI-FILHO,S.;Azevedo, J.L.; Azevedo, M.O.(1985) Genética de microorganismos em Biotecnologia e Engenharia Genética, FEALQ, Piracicaba-SP.

AZEVEDO, J.L. (1998). Genética de microorganismos.232-235

BARROS, E.V.S.A.; Bataus, L. A.M.; Valência, F.F.; Maranhão, A.Q.& Astolfi-Filho, S.(1996). A novel cloning system for direct screening a suicidal stretegy. Gene. **179**:287-289.

BACON,C.W. & Hinton, D.M. (1997). Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. In: Manual of environmental microbiology. ASM Press, Washington. 413-421.

BATAUS, L.A.M. (1991). Construção de um vetor de seleção de promotores (VSP) para Escherichia coli. Tese de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

BATAUS, L.A.M. (1999). Construção de vetores multifuncionais utilizando o gene de α-amilase como marcador genético. Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

CHANWAY, C.P. (1997). Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria. Na emerging technology for reforestation. Forest Sci. **43**:99-112.

COPLIN, D.L. (1989). Plasmids and their role in the evolution of plant pathagenic bacteria. Annual review of phytopatopathology. **27**:187-212.

COPLIN, D.L.: Rowan, R.G.; Chisholm, D.A.; Whitmoyer, R.E. (1981). Characterization of plasmids in *Erwinia stewartii*. Applied and enviromental microbiology. **42**:599-604.

FAHEY,J.N. (1988). Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plantss, IN: Cutler, H.O.ED Biologically active natural products potential use in agriculture. Washington, Americam chemical society symposuim ser. **380**:120-128.

FU, J.F.; Hu, J.M.; Chang, Y.S.& Liu, S.T. (1995). Sequence analysos of na *Erwinia stewartii* plasmiid pSW200 from Erwinia stewartii. Plasmid. **40**:100-112.

GABANT,P.; Szpirer, C.Y.: Cuturier, M. & Faele, N. M. (1998). Isotion and characterzation of plasmid pSW200 from Erwinia stewartii. Plasmid. **40**:100-112.

GABANT,P.; Szpirer, C. Y.; Cuturier, M. & Faele, N. M. (1998). Direct selection cloning vectors adapted to the genetic analysis of gram-negative bacteria and their plasmids. Gene. **207**:87-92.

HALLMANN, J.; Quadt- Hallmann, A.; Mahafee, W.F. & Faele, N.M. (1998). Direct selection cloning vectors adapted to the genetic analysis of gram-negative bactéria and their plasmids. Gene. **207**:87-98.

HALLMANN, J.; Quadt-Hallmann, A.;Mahafee, W.F. & Kloepper, J. N. (1997). Bacterial endophtes in agricultural crops. Can J. microbiol. **43**:895-914.

HANAHAN, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coZi with plasmids. J. MoI. Biol. 166(**4**):557-580.

HOFFMAN, C.; Maitan, V. R. & Bataus, L. A. M. (1997). Caracterização de plasmídeos extraídos de bacterias endofiticas de *Solanum lycocarpum* (Lobeira). Resumo apresentado no XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia.

INOUE, H.; Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency of *Escherichia coli* Zi with plasmids. Gene. **96**:23-28.

ISAAC, S. (1992). Bndophytic symbiosis. In: Fungal- plant interacions. Champman & HaI1.316-327.

MAKRIDES, S. C. (1996). Strategies for achieving high-Ievel expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. **60**:512-538.

MARQUES, M. V.; Silva, A. M. & Gomes, S. (2000). Genetic organization of plasmid pXF51 from the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. Plasmid. **45**:184-199.

MARMUR, J. (1961). A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microrganisms. J. MoI. Biol. **3**:208-218.

MISAGHI, L J.; Donndelinger, C. R. (1990). Endophytic bacteria 1ll symptomfree cotion plants. Phytopathology. **80**:808-811.

MURRA Y, F. R.; Latch, G. C. & Scoti, D. B. (1992). Surrogate transformation of perennial rygrass, Lolium perene, using genetically modified *Acremonium endophyte*. Molecular general genetics . **233**:1-9.

OGGIONI, M. R., Iannelli, F. & Pozzi, G. (1998). Characterization of cryptic plasmids pDPl and pSMBl of *Streptococcus pneumoniae*. Plasmid. **41**: 70-72.

PANOULOS, N. J. & Peets, R. C. (1985). The molecular genetics of plant pathogenic bacteria and their plasmids. Annual review of phytopathology. **23**:381-419.

PELCZAR,M.; Reid, R. & Chan, E. C. S. (1981). A rizosfera. Microbiologia.**7**:840.66

PEREIRA, J. O.; Azevedo, J. L. & Petrini, O. (1993). Endophytic fungi from Stylosantes. Mycologia. **85**:362-364.

PETRINI, O. & Müller, E. (1986). Research on endophytes swiss biotech. **4**:8-10.

PETRINI, O. (1986). Taxonomy of endophytic of aerial plant tissues. In: Fokkema,

N. J. 7 Heavel, J. Van den, eds. Microbiology of phyllosphere. London: Cambridge University Press. 175-197.

PETRINI, O. (1991). Fungal endophyte oftree leaves. In: Andrens, J. & Hirano S. S. eds. Microbiol ecology ofleaves. New York: Spring-Verlag. 179-197.

PUJOL, C. J. & Kado, C. (1998). Characterization of pUCD5000 involved in pink disease color formation by *Pantoea citrea*. Plasmid. **40**: 169-1 73.

SAMBROOK, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning- A laboratory manual. Cold Spring Press, NY.

SINCLAIR, J. B. (1991). Latent infection ofsoy-bean plants and seeds by fungi. Plant disease. **75**:220-224.

SOLAR, G. D. & Espinosa5 M. (2000). Plasmid copy number control: na evergrowing story. Molecular Microbiology. **37**: 492-500.

STROBEL, G.; Li, J. Y.; Sidhu, R.; Hess, W. M. & Ford, E. J. (1996). Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, Taxodium distichum. Microbiology. **142**:2223-2226.

STURZ, A.V.; Christie, B. R. & Nowak, J. (2000). Bacterial endophytes potential role in developing sustainable systems of crop productio. Crit. Ver. Plant Sci. **19**:1-30.67

SUMMERS, D. K. & Sherratt, D. J. (1984). Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE 1 encodes a determinant essential for plasmid monomerlzation and stability. Cell. **36**: 1097-1103.

SUN, X.; Griffith, M.; Pastemak, J. J. & Glick, B. R. (1995). Loeo temperature growth, freezing survival, and production of antifree protein by plant growth promoting *rhizobacterium ,Pseudomonas putida* GR12-2. Cano J. Microbiol. **41** :445-451.

VOLKSCH, B.; Ullrich, M. & Fritsche, W. (1992). Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots of soybean. Microbial Ecology. **24**: 305-311.

WU, L. T. & Tseng: Y. H. (2000). Characterization ofthe IncW cryptic plasmid pXV2 from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatória. Plasmid. **44**:163-172.

ZARRA, A. (1996). Biologia molecular básica.70-77 e 309-312.68