

296

CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO OPERON *nifHDK* DA BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA *AZOSPIRILLUM AMAZONENSE*. Samanta B. de Campos, Paola P. Stumpf, Irene S. Schrank, Luciane M. P. Passaglia (Centro de Biotecnologia, Deptos de Genética e de Biologia Molecular e Biotecnologia, IB-UFRGS).

O nitrogênio é um grande fator limitante na produção agrícola e representa um grande custo no uso de adubos. Uma solução para este problema é a utilização de microrganismos diazotróficos, os quais fornecem, naturalmente, o nitrogênio às plantas, através do processo de fixação biológica do nitrogênio. Este processo é catalizado pelo complexo enzimático Nitrogenase. A nitrogenase é formada por duas proteínas: a MoFe-proteína, produto dos genes *nifD* e *nifK* e a Fe-proteína, produto do gene *nifH*. As bactérias do gênero *Azospirillum* são encontradas em associação com gramíneas no solo brasileiro e a espécie *A. amazonense* tem se mostrado de grande interesse devido à sua associação com a cana-de-açúcar. Os mecanismos que controlam a expressão dos genes *nif* são muito complexos, envolvendo proteínas que "percebem" as concentrações de amônia e oxigênio. A fim de isolarmos os genes *nifHDK* de *A. amazonense* foi realizado um Southern-Blot, onde o DNA total dessa bactéria foi clivado com as enzimas *HincII*, *SmaI* e *Sall* e hibridizado com um fragmento contendo o gene *nifH* de *Azospirillum brasilense*. Foi obtida uma banda de hibridização de \approx 3,0 Kb quando o DNA total de *A. amazonense* foi clivado com *SmaI*. Para a clonagem dos fragmentos correspondentes ao tamanho da banda de hibridização, o DNA total de *A. amazonense* foi novamente extraído, clivado com a enzima *SmaI* e submetido à eletroforese em gel de agarose para a separação dos fragmentos por tamanho. A região correspondente a fragmentos de \approx 3,0 Kb foi purificada e ligada ao vetor pUC 18, também clivado com *SmaI* e defosforilado. O produto da ligação será utilizado para transformar *Escherichia coli* XL1 por eletroporação. As colônias que apresentarem sinal de hibridização positivo, após a técnica de hibridização em colônia, terão o seu fragmento seqüenciado. (Fapergs e CNPq-PIBIC/UFRGS).