

ISSN 0104-6187



Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB

BASES MOLECULARES E GENÉTICA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

**CNPAB
Seropédica, RJ
Outubro/1997**

ISSN 0104-6187



Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB

BASES MOLECULARES E GENÉTICA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

K.R. dos S. Teixeira

CNPAB
Seropédica, RJ
Outubro/1997

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à
Embrapa-CNPAB
Antiga Rodovia Rio/São Paulo
Telefone: (021)682-1086; (021)682-1500
Telex: (21) 32723 EBPA
Fax: (021)682-1230
Caixa Postal 74505
23851-970 Seropédica, RJ

Comitê de Publicações

Helvécio De-Polli(Presidente)
Johanna Döbereiner
José Ivo Baldani
Paulo Augusto da Eira
Norma Gouveia Rumjanek
Sebastião Manhães Souto
Dorimar dos Santos Felix(Bibliotecária)

TEIXEIRA, K.R. dos S. **Bases moleculares e genética da fixação de nitrogênio.**
Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 26p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 32).

1. Genética. 2. Fixação biológica de nitrogênio(FBN). 3. Gene. 4. Microrganismo. I.
Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). II. Título. III.
Série.

CDD 576.5

© Embrapa

BASES MOLECULARES E GENÉTICA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

K.R. dos S. Teixeira¹

1 - INTRODUÇÃO.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo complexo que requer a expressão de um conjunto de genes denominados genes *nif* ("nitrogen fixation"), os quais codificam para proteínas envolvidas diretamente neste processo.

A descoberta dos genes envolvidos na FBN foi proveniente do estudo da genética da fixação de nitrogênio em *Klebsiella pneumoniae* (Streicher et al., 1972; Dixon & Postgate, 1972; Cannon et al., 1976; Dixon et al., 1976). Foram identificados 20 genes, organizados em 7-9 operons que ocupam no genoma de *K. pneumoniae* uma região de aproximadamente 24 kb (1Kb = 1.000 pares de bases) entre os genes *shiA* e *hisD* (Streicher et al., 1972; Dixon et al., 1977; Kennedy, 1977; Elmerich et al., 1978; MacNeil et al., 1978; Merrick, 1988, Arnold et al., 1988). Devido ao envolvimento direto com o processo de FBN estas regiões codificadoras foram denominadas genes *nif*. Os genes *nifHDK* codificam as proteínas estruturais do complexo enzimático

¹Bióloga, PhD., EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Km 47, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ.

denominado nitrogenase. Este complexo é caracterizado pela presença de duas metalo-proteínas, a Fe-proteína (ou componente II) e a MoFe-proteína (ou componente I). A nomenclatura dinitrogenase-redutase e dinitrogenase também pode ser encontrada na literatura, entretanto diversos autores criticam esta denominação considerando que a Fe - proteína e a MoFe-proteína não apresentam atividade catalítica quando dissociadas. A Fe-proteína, codificada pelo gene *nifH*, é homodimérica e sua massa molecular varia entre 57 KDa e 72 KDa de acordo com o microrganismo a partir do qual foi isolada (Eady et al., 1988) e cada uma das subunidades apresenta Centro $\text{Fe}_4\text{:S}_4$. Os genes *nifDK* codificam para a subunidades α e β da MoFe-proteína, respectivamente. Em *K. pneumoniae* a MoFe-proteína é tetramérica (α_2 e β_2) e sua massa molecular é de aproximadamente 220 KDa (Eady et al., 1972; Kennedy et al., 1976), apresenta 2 grupamentos P (ou 8Fe-8S) e seu sítio ativo é composto por 2 cofatores de FeMo.

1.1 - GENES *nif* E SUAS FUNÇÕES.

Além dos genes estruturais, outros genes *nif* estão envolvidos com a síntese e processamento do cofator de FeMo (FeMo-Co), geração de energia para a nitrogenase,

Tabela I - Produtos codificados pelos genes *nif* e suas funções na FBN.

GENE	PRODUTO	FUNÇÃO
<i>NifH</i>	Codifica para Fe-proteína ou componente II da Nitrogenase.	Transferência de elétrons para a MoFe-proteína, participa na biossíntese e inserção do FeMo-Co.
<i>NifDK</i>	Codifica para subunidade α e β da MoFe-proteína ou componente I da nitrogenase.	redução do N_2 a NH_4^+ , quando associada com a Fe-proteína.
<i>NifA</i>	NifA	Regula positivamente a transcrição dos genes <i>nif</i> .
<i>NifL</i>	NifL, modulador negativo da proteína NifA em <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Azotobacter vinelandii</i> .	Modula negativamente a atividade da proteína NifA.
<i>NifNE</i>	$\alpha_2\beta_2$ tetramero semelhante a FeMo-proteína, FeS-proteína sensível ao oxigênio.	Essencial para a biossíntese do FeMo-Co
<i>NifB</i>	FeS-proteína, sensível ao oxigênio e associada a membrana em <i>K. pneumoniae</i>	Participa na biossíntese do FeMo-Co
<i>NifQ</i>	não determinado.	Não é essencial em concentrações normais de Molibdênio, deve desempenhar papel no metabolismo do Mo tornando-o disponível para incorporação ao FeMo-Co.
<i>NifV</i>	Homocitrato-sintase	Sintetiza homocitrato, essencial para a estabilização do FeMo-Co
<i>NifM</i>	NifM	Participa no processamento da Fe-proteína
<i>NifX</i>	não determinado.	Evidência do seu envolvimento no processo de regulação negativa da transcrição dos genes <i>nif</i> .
<i>NifU</i>	não determinado.	Desconhecida
<i>NifS</i>	S-transferase cisteína dependente (cisteína desulfurase)	Promove a dessulfidação de cisteína dependente de piridoxal fosfato. Deve participar como doador de S para vários grupamentos FeS da Nitrogenase.
<i>NifJ</i>	Piruvato:Flavodoxina-oxidoreductase, proteína dimérica (α_2) que contém centros FeS	Doa elétrons para a Flavodoxina
<i>NifF</i>	Flavodoxina	Doa elétrons para a Fe-proteína
<i>NifY</i>	Codifica para subunidade γ_2 presente na apo-FeMo-proteína	Participa na de inserção do FeMo-Co. Pode estar envolvido com a síntese, inserção e/ou isomerização do grupamento $Fe_4:S_4$.
<i>nifW</i> <i>nifZ</i> <i>nifT</i>	não determinados.	Desconhecidas, podem estar envolvidos com o processo de maturação ou estabilidade da MoFe-proteína.

Adaptado de Ludden, P.W. (1993).

gene *nifL* em *Azotobacter paspali* (dados não publicados, obtidos neste laboratório e redigido como relatório do curso de julho/92).

Apesar do intenso estudo dedicado a caracterização dos produtos e função dos genes *nif*, a essencialidade de alguns desses genes ainda permanece obscura. Simon *et al.* (1996) estudando os efeitos de mutação e expressão excessiva do gene *nifT* em *K. pneumoniae* não observaram qualquer alteração fenotípica em relação a estirpe selvagem. Da mesma forma, estudos de caracterização envolvendo os genes *nifU*, *nifW* e *nifZ* não permitiram identificar função essencial para a expressão da fixação de nitrogênio, nas condições experimentais aplicadas.

1.2 - ENVOLVIMENTO DE OUTROS GENES NO PROCESSO DE FBN.

Além dos genes *nif*, em certos diazotrófos tem sido observado que outros genes tais como genes *ntrA*, *ntrBC*, *fix*, *fdx*, *rnf* e *nod* codificam para proteínas que indiretamente desempenham função essencial para a FBN tais como a regulação ao nível de metabolismo geral de compostos nitrogenados, sensoreamento e sinalização do nível de N-celular, transporte de elétrons para a nitrogenase e até o estabelecimento da interação bactéria-planta. A presença de tais genes em diversos grupos de diazotrófos, exceto os

genes *rnf*, tem sido observado e descrito por vários autores. Aos genes *fdx*, identificados em *A. vinelandii* e *Rhodobacter capsulatus*, tem sido associado um papel no transporte de elétrons para a nitrogenase (Schmehl et al., 1993). Entretanto, mutantes *fdxA* e *nifF* de *A. vinelandii* ainda são capazes de fixar N_2 o que sugere possivelmente o envolvimento de uma terceira proteína no processo de transferência de elétrons (Martin et al., 1989). Estes resultados podem ser reforçados pela recente descoberta em *R. capsulatus* de genes denominado *rnf* (que significa *Rhodobacter* "nitrogen fixation"), os quais não apresentam homologia a outros genes já conhecidos, envolvidos no transporte de elétrons para a nitrogenase neste microrganismo (Schmehl et al., 1993).

Evidências da existência de nitrogenases alternativas, independente de molibdênio, em *Azotobacter vinelandii* foram descritas por Bishop et al. (1980). Entretanto segundo Kennedy et al. (1991) evidências de que a fixação de nitrogênio pode ocorrer em ausência de molibdênio (Mo) datam de 1936. Segundo os autores, Bortels, em 1936, observou que vanádio (V) substituía molibdênio como requerimento para fixação de nitrogênio em meio de cultura de *Azotobacter* e, McKenna et al. (1970) relatou a presença de vanádio em extrato bruto da nitrogenase de *Azotobacter vinelandii*, ao

invés de molibdênio. Durante estudos de crescimento em condições de fixação de nitrogênio, Bishop *et al.* (1980) observou crescimento em culturas de *A. vinelandii* mesmo na ausência de Mo e V. Posteriormente, Robson *et al.* (1986) mostrou que *Azotobacter chroococcum* também produzia nitrogenase vanádio-dependente quando crescida, na ausência de Mo, em meio de cultura suplementado com vanádio. Desde então a existência de nitrogenases alternativas deixou de ser um dogma e diversos autores têm se dedicado ao estudo da genética e mecanismo de regulação tanto da nitrogenase dependentes de Molibdênio (codificadas por genes *nif*), quanto da nitrogenase dependente de Vanádio (codificado por genes *vnf*) e do terceiro tipo de nitrogenase denominada alternativa (codificada por genes *anf*), que se expressa na ausência de ambos metais. Até o momento, a fixação de nitrogênio independente de Molibdênio foi descrito em diazotrófos de diversos grupos tais como: *Anabaena variabilis*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Methanosarcina barkeri* e *Clostridium pasteurianum* (citados por Zinoni *et al.*, 1993).

O quadro atual da caracterização da genética de diversos diazotrófos revela que a complexidade da FBN não se restringe simplesmente à bioquímica do processo e sugere que a existência de outros genes, ainda não identificados, pode

ser essencial para a elucidação do processo em diversos grupos de diazotrófos.

2 - ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS GENES *nif* EM DIVERSOS DIAZOTRÓFOS.

A escolha de *Klebsiella pneumoniae* como fonte para o estudo inicial dos genes envolvidos na FBN foi muito favorável para a descoberta do envolvimento de um grupo de genes neste processo. A organização dos genes *nif* em uma única região do genoma deste microrganismo permitiu que a estrutura dos operons, a presença de promotores específicos e a função de vários desses genes fossem definidas através de estudos de mutação sítio-dirigida e sequenciamento da região de 24 kb que contém estes genes. Entretanto, este tipo de organização é única em relação as observadas, até o momento, em outros diazotrófos. Merrick (1993) relata que a identificação, clonagem e o sequenciamento de 20 genes *nif* em *Klebsiella pneumoniae* permitiu o estabelecimento de estudos comparativos com genes semelhantes presentes em outros diazotrófos. Os estudos da organização dos genes *nif* em diazotrófos de vida livre ou encontrados em associação tem resultado em um quadro bastante completo da organização estrutural de seus genes *nif* (revisado por Merrick, 1993).

2.1 - ORGANIZAÇÃO DOS GENES *nif* EM MICRORGANISMOS NÃO SIMBIÓTICOS.

Apesar de organização estrutural semelhante a observada para *Klebsiella pneumoniae* (K.p., Figura 2), em *Enterobacter agglomerans* (E.a., Figura 2), diazotrofo de vida livre encontrado associado a rizosfera de diversos cereais, foi observado a presença de genes *nif* na porção extracromossomal do genoma, indicando que esta característica não é única dos diazotrófos simbióticos (Singh et al., 1983; Singh & Klingmuller, 1986; Kreutzer et al., 1991). Neste microrganismo, os genes *nif* ocupam região de aproximadamente 23 Kb do plasmídeo pEA3 de 113 Kb (Figura 2).

Em *Azotobacter vinelandii* (A.v., Figura 2) onde estão presentes a informação para expressão dos três tipos de nitrogenase conhecidos, foram identificadas três regiões contendo genes codificadores para as proteínas estruturais dessas nitrogenases *nifHDKTY*, *vnfH* - *vnfDGK* e *anfHDKGK* (Joerger et al., 1989, 1990; Robson et al., 1986). Em *A. vinelandii* já foram identificados e mapeados 19 genes *nif* distribuídos em três regiões do cromossoma deste microrganismo, a maior parte dos genes está localizada em uma região de aproximadamente 27 Kb organizados em 5-6 unidades de transcrição como apresentados na Figura 2. Os

operons *nifLA-nifBQ* e o *fixABC* estão localizados em outras regiões do cromossoma.

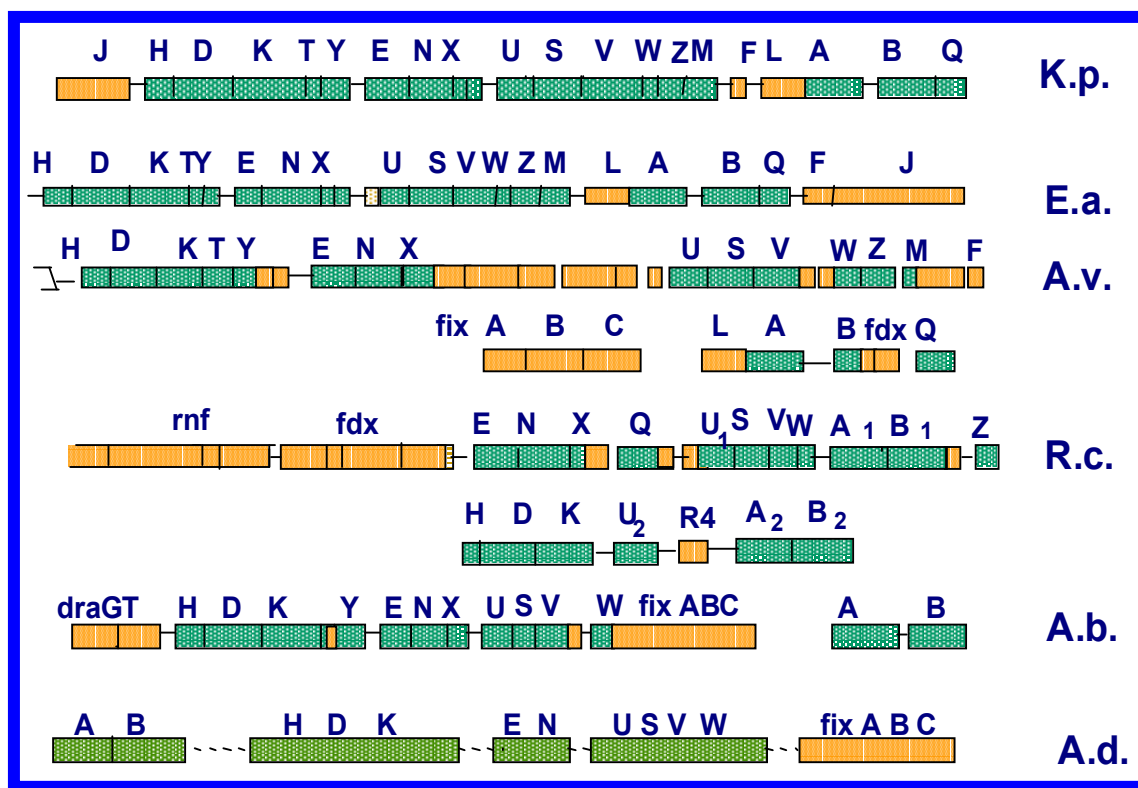
Regiões homólogas a genes *nif* em *Rhodobacter capsulatus* (R.c., Figura 2) têm sido descritas e se encontram amplamente separadas e distribuídas ao longo do cromossoma deste microrganismo (Klipp et al., 1988; 1990; Fonstein et al., 1992). Uma característica interessante deste microrganismos é a presença duplicação dos genes *nifU*, *nifA* e *nifB*, e apesar da seqüência dos genes *nifU* e *nifA* não serem idênticas acredita-se que cada um dos homólogos possam substituir o outro em condições ainda não definidas (revisado por M.J. Merrick, 1993). Alguns desses genes já foram mapeados e sequenciados, inclusive dois genes regulatórios homólogos aos genes *ntrB* e *ntrC*, denominados *nifR1* e *nifR2* devido a sua especificidade para expressão de genes *nif* em *Rhodobacter capsulatus* (Hubner et al., 1991; Foster-Hartnett & Kranz, 1992). Além de genes homólogos aos genes *nif*, duas outras classes de genes essenciais para a fixação de nitrogênio em *Rhodobacter capsulatus* têm sido caracterizada, os genes *fdx* e *rfn* (Schemhl et al., 1993). Estes genes estão localizados acima da região codificadora para os genes *nifENX* (Figura 2).

Em *Azospirillum brasilense* (A.b., Figura 2), foram identificadas duas regiões contendo os genes *nif*, e em uma

delas estes genes estão associados a genes *fix*. A região principal contém os genes estruturais *nifHDKY* e os operons *nifENX*, *nifUSV*, *nifW* e *fixABCX* (Elmerich et al., 1991,1987; Schrank et al., 1987; Galimand et al., 1989; Milcamps et al., 1993; Elmerich, 1994; Frazzon 1996). Na outra região foram localizados os genes *nifA* e *nifB* (Liang et al., 1991; Knopik et al., 1991). A presença de outros genes *nif* em loci diferentes tem sido descrito entretanto o envolvimento desses genes com o processo de fixação ainda permanece obscuro (Singh & Klingmüller, 1986; Vanstocken et al., 1987). Neste caso, segundo Elmerich (1994) apesar de mutantes *Nif⁻* terem sido obtidos através da inserção ao acaso de Tn5 nestas regiões, a identidade dos genes mutageneizados não foram completamente definidas. Uma outra característica importante na organização dos genes *nif* em *A. brasilense* e *A. lipoferum* é a presença de genes envolvidos na regulação pós-traducional da nitrogenase ("switch-off") dependente da presença de concentração de amônia ou oxigênio desfavoráveis para a atividade da nitrogenase (Hartmann et al., 1986). As proteínas DRAT (NAD-dependente ADP-ribosil transferase) e DRAG (Glicohidrolase associada à membrana), responsáveis pela inativação e reativação da nitrogenase respectivamente, são codificadas pelos genes *draT* e *draG*

organizados em um único operon localizado a 5' do operon *nifHDK* (Fu et al., 1990ab; Zhang et al., 1992).

Figura 2 - Organização estrutural dos genes envolvidos no processo de FBN em diazotrófos não-simbióticos.



Adaptado de M.J. Merrick (1993) e J. Frazzon (1996).

Os genes comuns a todos os diazotrófos estão caracterizados pelo preenchimento em verde.

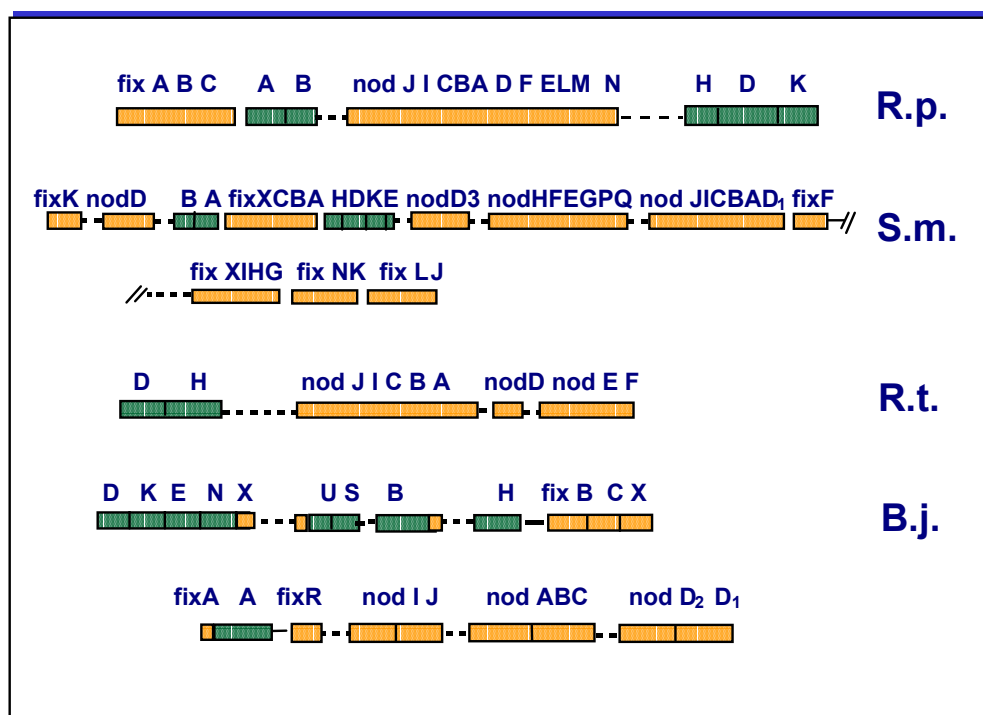
A organização de genes *nif* em *A. diazotrophicus* tem sido razão de estudos desde 1992 por pesquisadores do Brasil, México e Estados Unidos e a ação cooperativa destes grupos permitiu estabelecermos que a localização de genes *nif* neste diazotrófo é cromossomal. Até o momento grande parte dos genes envolvidos direta ou indiretamente na FBN têm sido mapeado em uma única região. A presença dos genes *nifA*, *nifB* e *nifK* no inserto do plasmídeo recombinante pAD101 foram inicialmente evidenciados pelo sequenciamento (Teixeira, 1997). Estes resultados associados aos obtidos por Sevilla *et al.* (1997) e C. Kennedy (comunicação pessoal) permitiram estabelecer que em *Acetobacter diazotrophicus* (A.d., Figura 2) os genes *nifA-B-HDK-EN-USVW-fixABC* estão organizados em uma única região do cromossoma deste diazotrofo, adjacente a genes homólogos aos genes *mocA* e *mcpA*.

2.2 - ORGANIZAÇÃO DE GENES *nif* EM MICRORGANISMOS SIMBIÓTICOS.

Em termos de diazotrófos simbióticos o quadro é menos completo, principalmente devido a presença de seqüências repetidas (reiterated sequences) e frequentes rearranjos genômicos já descritos para diversos microrganismos do grupo (revisado por Martinez *et al.*, 1990; Martinez-Romero & Caballero-Mellado, 1996). Os fixadores de nitrogênio

simbióticos compreendem bactérias do Gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e os gênero recentemente descrito *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1996, 1997).

Figura 3 - Organização de genes envolvidos no processo de FBN em microrganismos simbióticos.



Adaptado de Martinez et al., 1990 e M.J. Merrick, 1993.

Os genes comuns a todos os diazotrófos estão caracterizados pelo preenchimento em verde.

A Figura 3 apresenta a organização parcial de genes *nif*, *nod* e *fix* em bactérias simbióticas. As espécies foram representadas pelas suas iniciais: R.p. *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, S.m. *Sinorhizobium meliloti*,

R.t. *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, B.j. *Bradyrhizobium japonicum*.

De acordo com revisão de Martinez *et al.* (1990), estes microrganismos apresentam informação genética para estabelecer, em conjunto com a planta hospedeira, a formação de estruturas altamente especializadas denominadas pelos autores como nódulos fixadores de nitrogênio. Ainda segundo estes autores, nas espécies de *Rhizobium*, exceto *R. loti* (Sullivan *et al.*, 1995), a maioria dos genes para nodulação e fixação de nitrogênio está localizada em plasmídeos de alto peso molecular, denominados plasmídeos simbióticos (pSym). Entretanto, a partir da reclassificação de *R. loti* para o novo gênero *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997) esta exceção deixou de existir. Além disso, nos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium* outros loci simbióticos estão localizados ao longo do cromossoma (Noel *et al.*, 1984; Dylan *et al.*, 1986 - citados por Martinez *et al.*, 1990) ou em outros plasmídeos (Toro & Olivares, 1986ab; Finan *et al.*, 1986 - citados por Martinez *et al.*, 1990). Por outro lado, em *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* a informação genética tem sido encontrada, na porção cromossomal do genoma (Hennecke *et al.*, 1987; Van den Eede *et al.*, 1987). Além da diferença em relação a localização dos genes envolvidos no processo de simbiose e fixação de nitrogênio, uma diferente organização estrutural

do operon *nifHDK*, onde o gene *nifH* se encontra separado dos outros genes estruturais e constitui uma unidade de transcrição independente dos genes *nifDK*, é única em espécies de *Bradyrhizobium* (Kaluza et al., 1983; Yun & Szalay, 1984). Entretanto, organização semelhante foi observada para os genes *vnfH* e *vnfD₂GK* (codificadores para V-nitrogenase) que se encontram distanciados entre si aproximadamente 2 Kb (Kennedy et al., 1991).

3 - AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. José I. Baldani e Dr. Sebastião M. Souto, pelas valiosas críticas e sugestões feitas durante a correção. Agradeço também ao suporte do acervo e correções bibliográficas feitas por Dorimar dos S. Félix.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOLD, W.; RUMP, A.; KLIPP, W.; PRIEFER, U.B.; PÜHLER, A. Nucleotide sequence of a 24,206 base pair fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Molecular Biology**, England, v.203, p.715-738, 1988.
- BISHOP, P.E.; JARLENSKI, D.M.L.; HETHERINGTON, D.R. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.150, p.1244-1251, 1980.
- BORTELS, H. Weitere Untersuchungen über die Bedeutung von Molybdän, Vanadium, Wolfram und anderen Erdschwebstoffen für stickstoffbindende und andere Mikroorganismen. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde**, Stuttgart, v.95, p.193-218, 1936.

- CANNON, F.C.; DIXON, R.A.; POSTGATE, J.R. Derivation and properties of F-prime factors carrying nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of General Microbiology**, London, v.93, p.111-125, 1976.
- DIXON, R.; KENNEDY, C. ; KONDOROSI, A. ; KRISHNAPILLAI, V.; MERRICK, M. 1977. Complementation Analysis of *Klebsiella pneumoniae* mutants defective in nitrogen fixation. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.157, p.189-198, 1977.
- DIXON, R.A.; POSTGATE, J.R. Genetic transfer of nitrogen fixation from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. **Nature**, London, v.237, p.102-103, 1972.
- DIXON, R.A.; CANNON, F.C.; KONDOROSI, A. Construction of a P plasmid carrying nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniae*. **Nature**, London, V.260, p.268-271, 1976.
- DYLAN, T.; IELPI, L.; STANFIELD, S.; KASHYAP, L.; DOUGLAS, C.; YANOSFSKY, M.; NESTER, E.; HELINSKI, D.R.; DITTA, G. *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.83, p.4403, 1986.
- EADY, R.R.; ROBSON, R.L.; SMITH, B.E. Alternative and conventional nitrogenase. In: COLE, J.A.; FERGUSON, S., ed. **The nitrogen and sulfur cycles**. Cambridge: Cambridge University, 1988. p.363-382.
- EADY, R.R.; SMITH, B.E.; COOK, K.A.; POSTGATE, J.R. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: Purification and properties of the component proteins. **Biochemical Journal**, v.128, p.665-675, 1972.
- ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation and nitrogen metabolism in *Azospirillum brasilense*: a review. In: HEGAZI, N.A.; FAYEZ, M.; MONIB, M., ed. **Nitrogen Fixation with Non-legumes**. Cairo: The American University in Cairo, 1994. p.237-249.
- ELMERICH, C., DE ZAMAROCZI, M.; VIEILLE, C.; DELLORME, F.; ONYEOCHA, I.; LIANG, Y.Y.; ZIMMER, W. Nif and nod genes in *Azospirillum*. In: POLSINELLI, M., MATERASSI, R.; VINCENZINI, M., ed. **Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.79-87. (Developments in Plant and Soil Sciences, 48).

- ELMERICH, C.; BOUZOKLIAN, H.; VIEILLE, C.; FOGHER, C.; PERROUD, B.; PERRIN, A.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*: Genetics of nitrogen fixation and interactions with plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, London, v.317, p.183-192, 1987.
- ELMERICH, C.; HOUMARD, J.; SIBOLD, L.; MANHEIMER, I.; CHARPIN, N. Genetic and biochemical analysis of mutants induced by bacteriophage Mu DNA integration into *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation genes. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.165, p.181-189, 1978.
- FINAN, T.M.; KUNKEL, B.; DE VOSS, G.F.; SIGNER, E.R. Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.167, p.66, 1986.
- FONSTEIN, M.; ZHENG, S.; HASELKORN, R. Physical map of the genome of *Rhodobacter capsulatus* SB1003. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, p.4070-4077, 1992.
- FOSTER-HARTNETT, D.; KRANZ, R.G. Analysis of the promoters and upstream sequences of nifA1 and nifA2 in *Rhodobacter capsulatus*: activation requires ntrC but not rpoN. **Molecular Microbiology**, England, v.6, p.1049-1060, 1992.
- FRAZZON, J. **Regulação e expressão dos genes nifUSV de *Azospirillum brasilense* Sp7**. Porto Alegre: UFRGS, 1996. Tese de Doutorado.
- FU, H.-A.; BURRIS, R.H.; ROBERTS, G.P. Reversible ADP-ribosylation as a regulatory mechanism in prokaryotes demonstrated by heterologous expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.87, p.1720-1724, 1990a.
- FU, H.-A.; FITZMAURICE, W.P.; ROBERTS, G.P.; BURRIS, R.H. Cloning and expression of draTG genes from *Azospirillum lipoferum*. **Gene**, Netherlands, v.86, p.95-98, 1990b.
- GALIMAND, M.; PERROUD, B.; DELORME, F.; PAQUELIN, A.; VIEILLE, C.; BOZOUKLIAN, H.; ELMERICH, C. Identification of DNA regions homologous to nitrogen fixation genes nifE, nifUS and fixABC in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Journal of General Microbiology**, London, v.135, p.1047-1059, 1989.

- HARTMANN, A.; FU, H.; BURRIS, R.H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum* spp. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.165, p.864-870, 1986.
- HENNECKE, H.; FISHER, H.M.; EBELING, S.; GUBLER, M.; THONY, B.; GOTTFERT, M.; LAMB, J.; HAHN, M.; RAMSEIER, T.; REGENSBURGER, B.; ALVAREZ-MORALES, A.; STUDER, D. *nif*, *fix* and *nod* gene clusters in *Bradyrhizobium japonicum*, and *nifA*-mediated control of symbiotic nitrogen fixation. In: VERMA, D.P.S.; BRISSON, N., ed. **Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p.191.
- HÜBNER, P.; WILSON, J.C.; VIGNAIS, P.M.; BICKLE, T.A. Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.2993-2999, 1991.
- JARVIS, B.D.W.; SIVAKUMARAN, S.; TIGHE, S.W.; GILLIS, M. Identification of *Agrobacterium* and *Rhizobium* species based on cellular fatty acid composition. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.184, p.143-158, 1996.
- JARVIS, B.D.W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W.X.; NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *R. loti*, *R. huakuii*, *R. ciceri*, *R. mediterraneum* and *R. tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p.895-898, 1997.
- JOERGER, R.D.; JACOBSON, M.R.; PREMAKUMAR, R.; WOLFINGER, E.D.; BISHOP, P.E. Nucleotide sequence and mutational analysis of the structural genes (*anfHDK*) for the second alternative nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.171, p.1075-1086, 1989.
- JOERGER, R.D.; WOLFINGER, E.D.; BISHOP, P.E. Nucleotide sequence and mutational analysis of the structural genes for nitrogenase 2 of *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.172, p.3400-3408, 1990.
- KALUZA, K.; FURHMANN, M.; HAHN, M.; REGENSBURGER, B.; HENNECKE, H. In *Rhizobium japonicum* the nitrogenase genes *nifH* and *nifDK* are separated. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.155, p.915, 1983.

- KENNEDY, C. Linkage map of nitrogen fixation (nif) genes in *Klebsiella pneumoniae*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.157, p.199-204, 1977.
- KENNEDY, C.; BALI, A.; BLANCO, G.; CONTRERAS, A.; DRUMMOND, M.; MERRICK, M.; WALMSLEY, J.; WOODLEY, P. Regulation of expression of genes for three nitrogenases in *Azotobacter vinelandii*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VINCENZINI, M., ed. **Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.13-23.
- KENNEDY, C.; EADY, R.R.; KONDOROSI, E.; REKOSH, D.K. The Molybdenum-Iron Protein of *Klebsiella pneumoniae* Nitrogenase: Evidence for non-identical subunits from peptide mapping. **Biochemical Journal**, Essex, v.155, p.383-389, 1976.
- KLIPP, W. Organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*. In: GRESSHOFF, P.M.; ROTH, L.E.; STACEY, G.; NEWTON, W.E., ed. **Nitrogen fixation: Achievements and objectives**. New York: Chapman, 1990. p.467-474.
- KLIPP, W.; MASEPOHL, B.; PÜHLER, A. Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: duplication of a nifA-nifB region. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, p.693-699, 1988.
- KNOPIK, M.A.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; SOUZA E.M.; MACHADO, H.B.; PEDROSA, F.O. Cloning of the nifA and nifB genes of *Azospirillum brasilense* strain FP2. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VINCENZINI, M., ed. **Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. P.133-138. (Developments in Plant and Soil Science, 48).
- KREUTZER, R.; STEIBL, H.-D.; DAYANANDA, S.; DIPPE, R.; HALDA, L.; BUCK, M.; KLINGMÜLLER, W. Genetic characterization of nitrogen fixation in Enterobacter strains from the rhizosphere of cereals. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VINCENZINI, M., ed. **Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1991. p.25-36.
- LIANG, Y.Y.; KAMINSKI, P.A.; ELMERICH, C. Identification of a nifA-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. **Molecular Microbiology**, England, v.5, p.2735-2774, 1991.

- LUDDEN, P.W. Nif gene products and their role in nitrogen fixation. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E., ed. **New Horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. p.101-104.
- MacNEIL, T.; MacNEIL, D.; ROBERTS, G.P.; SUPIANO, M.A.; BRILL, J.W. Fine-structure mapping and complementation analysis of nif (nitrogen fixation) genes in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.136, p.253-266, 1978.
- MARTIN, A.E.; BURGESS, B.K.; LISMAA, S.E.; SMARTT, C.T.; JACOBSON, M.R.; DEAN, D.R. Construction and characterization of *Azotobacter vinelandii* strain with mutations in the genes encoding flavodoxin and ferredoxin I. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.171, p.3162-3167, 1989.
- MARTINEZ, E.; ROMERO, D.; PALACIOS, R. The Rhizobium genome. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.9, p.59-93, 1990.
- MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.15, p.113-140, 1996.
- MCKENNA, C.E.; BENEMANN, J.R.; TAYLOR, T.G. A vanadium containing nitrogenase preparation: implications for the role of molybdenum in nitrogen fixation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Washington, v.41, p.1501-1508, 1970.
- MERRICK, M.J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In: BOTHE, H.; BRUIJN, F.J.; NEWTON, W.E., ed. **Nitrogen Fixation: Hundred years after**. Stuttgart: Gustav Fischer, 1988. P.293-302.
- MERRICK, M.J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E., ed. **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993. p.43-54.
- MILCAMPS, A.; KEYERS, V.; VANDERLEYDEN, J. Identification of a nifW-like gene in *Azospirillum brasilense*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Washington, v.1173:237-238, 1993.

- NOEL, K.D.; SANCHEZ, A.; FERNANDEZ, L.; LEEMANS, J.; CEVALLOS, M.A. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertion. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.158, p.148, 1984.
- ROBSON, R.L.; WOODLEY, P.R.; PAU, R.N.; EADY, R.R. Second gene (nifH*) coding for a nitrogenase iron-protein in *Azotobacter chroococcum* is adjacent to a gene coding for a ferredoxin-like protein. **EMBO Journal**, Oxford, v.5, p.1159-1163, 1986.
- SCHMEHL, M.; JAHN, A.; VILSENDORF, A.M.; HENNECKE, S.; MASEPOHL, B.; SCGUPPLER, M.; MARXER, J.; KLIPP, W. Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*: a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.241, p.602-615, 1993.
- SCHRANK, I.; ZAHA, A.; ARAÚJO, E.F.; SANTOS, D.S. Construction of gene library from *Azospirillum brasilense* and characterization of a recombinant containing the nif structural genes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.20, p.321-330, 1987.
- SEVILLA, M.; MELETZUS, D.; TEIXEIRA, K.; LEE, S.; MUTAKKI, A.; BALDANI, J.I.; KENNEDY, C. Analysis of nif and regulatory genes in *Acetobacter diazotrophicus*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.871-874, 1997.
- SIMON, H.M.; HOMER, M.J.; ROBERTS, G.P. Perturbation of nif expression in *Klebsiella pneumoniae* has limited effect on nitrogen fixation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, p.2975-2977, 1996.
- SINGH, M.; KLINGMÜLLER, W. Cloning of pEA3, a large plasmid of *Enterobacter agglomerans* containing nitrogenase structural genes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.90, p.235-242, 1986.
- SINGH, M.; KLEEBERGER, A.; KLINGMULLER, W. Location of nitrogen fixation (nif) genes on indigenous plasmids of *Enterobacter agglomerans*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.190, p.373-378, 1983.

- ST. JOHN, R.T.; JOHNSTON, M.H.; SEIDMAN, C.; GARFINKEL, D.; GORDON, J.K.; SHAH, V.K.; BRILL, W.J. Biochemistry and genetics of *Klebsiella Pneumoniae* mutant strains unable to fix N₂. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.121, p.759-765, 1975.
- STREICHER, S.L.; GURNEY, E.G.; VALENTINE, R.C. The nitrogen fixation genes. **Nature**, London, v. 239, p.495-499, 1972.
- SULLIVAN, J.T.; PATRICK, H.N.; LOWTHER, W.L.; SCOTT, D.B.; RONSON, C.W. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.92, p.8995, 1995.
- TEIXEIRA, K.R. dos S. *Acetobacter diazotrophicus*, endófito diazotrófico associado à cana-de-açúcar: presença de plasmídeos e sequenciamento do gene nifA, responsável pela regulação da fixação biológica de nitrogênio. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1997. 168p. Tese de doutorado.
- TORO, N.; OLIVARES, J. Analysis of *Rhizobium meliloti* Sym mutants obtained by heat treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.51, p.1148, 1986a.
- TORO, N.; OLIVARES, J. Characterization of a large plasmid of *Rhizobium meliloti* involved in enhancing nodulation. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.202, p.331, 1986b.
- VAN DEN EEDE, G.; DREYFUS, B.; GOETHALS, K.; VAN MONTAGU, M.; HOLSTERS, M. Identification and cloning of nodulation genes from the stem-nodulating bacterium ORS571. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.206, p.291, 1987.
- VANSTOCKEN, M.; MICHIELS, K.; VAN DER LEYDEN, J.; VAN GOOL, A. Transposon mutagenesis of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: physical analysis of Tn5 and Tn5-Mob insertion mutants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.43, p.410-415, 1987.
- YUN, A.C.; SZALAY, A.A. Structural genes of dinitrogenase and dinitrogenase reductase are transcribed from two separate promoters in the broad host range cowpea *Rhizobium* strain Irc78. **Proceedings of the National Academy Sciences**, USA, v.81, p.7358, 1984.

ZHANG, Y.; BURRIS, R.H.; ROBERTS, G.P. Cloning, sequencing, mutagenesis and functional characterization of draT and draG genes from *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, p.3364-3369, 1992.

ZINONI, F.; ROBSON, M.; ROBSON, R.L. Organization of potential alternative nitrogenase genes from *Clostridium pasteurianum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Washington, v.1174, p.83-86, 1993.