

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
MATEUS VINICIUS DA MATA DE ASSIS



CURITIBA
2023

MATEUS VINICIUS DA MATA DE ASSIS

CARACTERIZAÇÃO DA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DO
METABOLISMO DE NITRATO EM *Sinorhizobium fredii* NGR234



Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre em Genética. Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Claudia Bonatto

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Assis, Mateus Vinicius da Mata de

Caracterização da regulação da expressão de genes do metabolismo de nitrato em *Sinorhizobium fredii* NGR234 / Mateus Vinicius da Mata de Assis. – Curitiba, 2023.
1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Claudia Bonatto.

1. *Sinorhizobium fredii*. 2. Nodulação. 3. Nitratos. I. Bonatto, Ana Claudia, 1978-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Genética. III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MATEUS VINICIUS DA MATA DE ASSIS** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO DE NITRATO EM *Sinorhizobium fredii* NGR234**, sob orientação da Prof^a. Dra. ANA CLAUDIA BONATTO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Junho de 2023.

Assinatura Eletrônica
27/06/2023 15:33:37.0
ANA CLAUDIA BONATTO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
27/06/2023 15:32:21.0
ROSE ADELE MONTEIRO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
27/06/2023 16:16:08.0
EDILEUSA CRISTINA MARQUES GERHARDT
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

RESUMO

O nitrogênio faz parte da composição de diversas biomoléculas como proteínas e ácidos nucleicos, sendo desta forma um fator limitante para o crescimento de biomassa. Entretanto, apesar da sua importância para os seres vivos, a maior parte da reserva deste nutriente encontra-se na forma de gás de dinitrogênio (N₂) na atmosfera, a qual não pode ser metabolizada por plantas e animais. Por outro lado, as bactérias diazotróficas são capazes de disponibilizar este nutriente através da conversão de N₂ a amônia por meio da fixação biológica do nitrogênio (FBN). Algumas destas bactérias realizam a fixação em interações simbióticas, como a nodulação com plantas da família das Fabaceae. Entre as bactérias noduladoras está *Sinorhizobium fredii* NGR234, um rizóbio capaz de nodular cerca de 112 gêneros de leguminosas e uma não leguminosa. Os mecanismos que levam a este amplo espectro de nodulação ainda não foram completamente elucidados, embora acredite-se que seja resultado da flexibilidade metabólica de NGR234. Desta forma, as vias de assimilação e desnitrificação de nitrato e nitrito responsáveis pela redução de nitrato para incorporação a biomassa celular ou para obtenção de energia, podem permitir essa flexibilidade. Embora o controle destas vias em NGR234 seja pouco estudado, em outros rizóbios a regulação da assimilação é realizada pelo sistema NtrBC na presença de nitrato, enquanto a via dissimilatória é regulada pelo sistema FixLJ-FixK. Portanto, o objetivo deste trabalho foi de analisar a regulação da expressão de genes de ambas as vias através de ensaios de expressão de GFP e nodulação. Para isso, os promotores dos genes *narK*, *nrtABC*, *ntrCnirBDnarBCysG*, *nasTS*, *fixK* e *napEFDABC* foram fusionados ao gene repórter GFP e a atividade promotora avaliada em vida livre e/ou em simbiose com *Phaseolus vulgaris* BAT93. Os resultados dos ensaios em meio de cultivo sugerem que o regulador NtrC atua no controle dos genes da via assimilatória durante o hábito de vida livre, mas também ao longo do processo simbiótico, visto que a atividade dos promotores dos genes *narK*, *nrtABC* e *ntrCnirBDnarBCysG* é afetada no mutante *ntrC*. No entanto, a expressão do operon *nasST* é independente de NtrC, pois a expressão de GFP foi detectada na estirpe mutante *ntrC*. Os dados de microscopia indicam o mesmo cenário, no qual os genes se apresentam expressos e sob influência de NtrC. Os genes da via dissimilatória *fixK* e *nap* também apresentaram expressão em nódulos. Por fim, os testes de nodulação realizados para avaliar os efeitos da mutação de *ntrC* na nodulação indicam a influência de NtrC durante a simbiose, pois plantas inoculadas com mutantes *ntrC* apresentaram menor número e peso de nódulos em comparação com a estirpe selvagem.

PALAVRA-CHAVE: *Sinorhizobium fredii* NGR234. NtrC. Nitrato. Via assimilatória. Nodulação.

ABSTRACT

Nitrogen is part of the composition of various biomolecules, such as proteins and nucleic acids, and is, therefore, a limiting factor for biomass growth. However, despite its importance for living beings, most of the reserve of this nutrient is found in the form of dinitrogen gas (N₂) in the atmosphere, which plants and animals cannot metabolize. On the other hand, diazotrophic bacteria can make this nutrient available by converting N₂ to ammonia through biological nitrogen fixation. Rhizobia is a group of these bacteria that fix nitrogen in symbiotic interactions, such as nodulation with plants of the Fabaceae family. *Sinorhizobium fredii* NGR234 is a rhizobium capable of nodulating about 112 legume genera and one non-legume. The mechanisms leading to this broad nodulation spectrum have not yet been fully elucidated, although it is believed to be a result of the metabolic flexibility of NGR234. Thus, the nitrate and nitrite assimilation and denitrification pathways responsible for reducing nitrate for incorporation into cell biomass or energy production may allow this flexibility. Although the control of these pathways in NGR234 is poorly studied, in other rhizobia, the regulation of assimilation is performed by the NtrBC system in the presence of nitrate, while the FixLJ-FixK system regulates the dissimilatory pathway. Therefore, this work aimed to analyze the regulation of gene expression of both pathways by GFP expression and nodulation assays. For this, the promoters of *nark*, *nrtABC*, *ntrCnirBDnarBCysG*, *nasTS*, *fixK*, and *napEFDABC* genes were fused to the GFP reporter gene, and the promoter activity evaluated in free-living and in symbiosis with *Phaseolus vulgaris* BAT93. The results of the assays in culture medium suggest that the NtrC regulator acts in the control of assimilatory pathway genes during the free-living habit as well as throughout the symbiotic process since the promoter activity of *nark*, *nrtABC*, and *ntrCnirBDnarBCysG* genes was affected in *ntrC*-mutant. However, expression of the *nasST* operon is independent of NtrC, as GFP expression was detected in the *ntrC*-mutant strain. The microscopy data indicate the same scenario, in which the genes are expressed and influenced by NtrC. The dissimilatory pathway genes *fixK* and *nap* also showed expression in nodules. Finally, nodulation tests performed to evaluate the effects of the *ntrC* mutation indicate the influence of NtrC during symbiosis, as plants inoculated with *ntrC*-mutants showed lower nodule number and weight compared to the wild-type strain.

KEYWORDS: *Sinorhizobium fredii* NGR234. NtrC. Nitrate. Assimilatory pathway. Nodulation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA DOS SISTEMAS DE TRANSPORTE E REDUÇÃO DE NITRATO EM <i>K. oxytoca</i> , <i>R. capsulatus</i> e <i>B. subtilis</i>	24
FIGURA 2 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA VIA DE DENITRIFICAÇÃO EM <i>S. meliloti</i> , <i>R. etli</i> e <i>B. diazoefficiens</i>	27
FIGURA 3 – ESTRATÉGIA DE CLONAGEM PARA OBTENÇÃO DE MUTANTES POR DELEÇÃO EM FASE.....	39
FIGURA 4 – ESTRATÉGIA DE CLONAGEM DAS REGIÕES PROMOTORAS AOS VETORES PPROBE-GT E GT'.....	42
FIGURA 5 – CONFIRMAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DE <i>nasT</i> E <i>fixK</i> EM pTZ57 ...	46
FIGURA 6 – CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DE <i>nasT</i> E <i>fixK</i> TRUNCADOS EM <i>pK18mobsacB</i>	47
FIGURA 7 – CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DE <i>nrtA</i> ΩKm.....	48
FIGURA 8 – CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DE <i>narK</i> ΩKm.....	48
FIGURA 9 – CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DAS REGIÕES PROMOTORAS EM pPROBE-GT OU GT'.....	49
FIGURA 10 – RAIZ DE <i>P. vulgaris</i> EM SIMBIOSE COM <i>S. fredii</i> NGR234 APRESENTANDO NÓDULOS E PRIMÓRDIOS DE NÓDULOS.....	57
FIGURA 11 – SECÇÕES DE NÓDULOS DE <i>P. vulgaris</i> cv. BAT93 INOCULADAS COM <i>S. fredii</i> NGR234.....	58
FIGURA 12 – SECÇÕES DE PRIMÓRDIOS DE NÓDULOS DE <i>P. vulgaris</i> cv. BAT93 INOCULADAS COM <i>S. fredii</i> NGR234 CONTENDO A CONSTRUÇÃO <i>pnarKpGT'</i>	59
FIGURA 13 – SECÇÕES DE PRIMÓRDIOS DE NÓDULOS DE <i>P. vulgaris</i> cv. BAT93 INOCULADAS COM <i>S. fredii</i> NGR234 CONTENDO A CONSTRUÇÃO <i>pnrtABCpGT'</i>	60
FIGURA 14 – SECÇÕES DE NÓDULOS DE <i>P. vulgaris</i> cv. BAT93 INOCULADAS COM <i>S. fredii</i> NGR234 CONTENDO A CONSTRUÇÃO <i>pnarKpGT'</i>	61
FIGURA 15 – SECÇÕES DE NÓDULOS DE <i>P. vulgaris</i> cv. BAT93 INOCULADAS COM <i>S. fredii</i> NGR234 CONTENDO A CONSTRUÇÃO <i>pnrtABCpGT'</i>	62
FIGURA 16 – SECÇÕES DE PRIMÓRDIOS DE NÓDULOS DE <i>P. vulgaris</i> cv. BAT93 INOCULADAS COM <i>S. fredii</i> NGR234 CONTENDO A CONSTRUÇÃO <i>pNitpGT'</i>	64

FIGURA 17 – SECÇÕES DE NÓDULOS DE <i>P. vulgaris</i> cv. BAT93 INOCULADAS COM <i>S. fredii</i> NGR234 CONTENDO A CONSTRUÇÃO pNitpGT'	65
FIGURA 18 – SECÇÕES DE PRIMÓRDIO E NÓDULOS DE <i>P. vulgaris</i> cv. BAT93 INOCULADAS COM <i>S. fredii</i> NGR234 SELVAGEM CONTENDO A CONSTRUÇÃO <i>pnasTpGT</i>	67
FIGURA 19 – SECÇÕES DE PRIMÓRDIOS E NÓDULOS DE <i>P. vulgaris</i> cv. BAT93 INOCULADAS COM <i>S. fredii</i> NGR234 SELVAGEM CONTENDO A CONSTRUÇÃO <i>fixKpGT</i>	70
Figura 20 – SECÇÕES DE PRIMÓRDIOS E NÓDULOS DE <i>P. vulgaris</i> cv. BAT93 INOCULADAS COM <i>S. fredii</i> NGR234 SELVAGEM CONTENDO A CONSTRUÇÃO <i>pnappGT</i>	71
FIGURA 21 - ARRANJO GENÔMICO DE GENES ENVOLVIDOS NA ASSIMILAÇÃO DE NITRATO E NITRITO	79
FIGURA 22 – ARRANJO GENÔMICO DE GENES ENVOLVIDOS NA DESNITRIFICAÇÃO.....	80

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – EXPRESSÃO DA FUSÃO <i>pnarKpGT'</i> EM MEIO CONTENDO NaNO ₃	51
GRÁFICO 2 – EXPRESSÃO DA FUSÃO <i>pnrApGT'</i> EM MEIO NaNO ₃	52
GRÁFICO 3 – EXPRESSÃO DA FUSÃO <i>pNitpGT</i> EM MEIO NaNO ₃	54
GRÁFICO 4 – EXPRESSÃO DA FUSÃO <i>pnasTpGT'</i>	56
GRÁFICO 6 – FLUORESCÊNCIA MÉDIA PARA A FUSÃO <i>pnarKpGT'</i> e <i>pnrABCpGT'</i> EM NÓDULOS DE <i>P. vulgaris</i>	63
GRÁFICO 7 – EXPRESSÃO DAS FUSÕES <i>pNiptGT</i> EM NÓDULOS DE <i>P. vulgaris</i>	66
GRÁFICO 8 – PESO MÉDIO (g) DA PARTE AÉREA DAS PLANTAS PARA OS TRÊS TRATAMENTOS.....	74
GRÁFICO 9 – BOXPLOT PARA NÚMERO E PESO DE NÓDULOS.....	76

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 – ESTIRPES E PLASMÍDEOS UTILIZADOS NO TRABALHO.....	31
QUADRO 2 – PRIMERS UTILIZADOS NO TRABALHO.....	33
TABELA 1 – NODULAÇÃO de <i>Phaseolus vulgaris</i> por <i>S. fredii</i> NGR234 SELVAGEM E <i>nrC</i>	73
TABELA 2 – RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA O TESTE DE SHAPIRO-WILK PARA NÚMERO E PESO DE NÓDULOS.....	74
TABELA 3 – RESUMO DAS COMPARAÇÕES DOIS A DOIS PELO TESTE DE POST-HOC DE DUNN PARA NÚMERO E PESO DOS NÓDULOS.....	75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	JUSTIFICATIVA	16
3	OBJETIVOS	17
3.1	OBJETIVO GERAL	17
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1	<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	18
4.2	<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 E A PROMISCUIDADE DE NODULAÇÃO ...	18
4.3	INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA	20
4.4	CONTROLE DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO	21
4.5	ASSIMILAÇÃO DE NITRATO	23
4.6	VIA DE DENITRIFICAÇÃO EM RIZÓBIOS	26
4.7	REGULAÇÃO EM REPOSTA A MICROAEROBIOSE	29
5	MATERIAS E MÉTODOS	31
5.1	PLASMÍDEOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	31
5.2	PRIMERS	32
5.3	PREPARO DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES DH10B E S17.1	35
5.4	TRANSFORMAÇÃO ATRAVÉS DE CHOQUE TÉRMICO	35
5.5	EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	35
5.6	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	36
5.7	REAÇÃO DE DIGESTÃO ENZIMÁTICA E LIGAÇÃO	36
5.8	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	37
5.9	CONJUGAÇÃO E SELEÇÃO	37
5.10	ESTRATÉGIAS PARA CONSTRUÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES	37
5.10.1	Mutação dos genes <i>nasT</i> e <i>fixK</i> por deleção em fase	37

5.10.2	Construção de mutante <i>nrtA</i> por inserção de cassete de resistência.	40
5.10.3	Construção de mutante <i>narK</i> por inserção de cassete de resistência	40
5.11	ESTRÁTEGIA DE CLONAGEM PARA FUSÃO DAS REGIÕES PROMOTORAS AO GENE REPÓRTER GFP	40
5.12	CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE DE PROMOTOR EM VIDA LIVRE.....	43
5.13	ENSAIOS DE NODULAÇÃO	43
5.13.1	Esterilização das sementes de feijão (<i>P. vulgaris</i> cv. BAT93).....	43
5.13.2	Preparo das estirpes para inóculo na planta	44
5.13.3	Secção de nódulos e microscopia confocal.....	45
5.13.4	Análise das imagens de microscopia	45
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.1	OBTENÇÃO DAS CONSTRUÇÕES PARA OS MUTANTES	46
6.1.1	Deleção em fase dos genes <i>fixK</i> e <i>nasT</i>	46
6.1.2	Mutação por inserção dos genes <i>nrtA</i> e <i>narK</i>	47
6.2	FUSÃO DE REGIÕES PROMOTORAS AO GENE GFP	49
6.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS PROMOTORES EM CULTIVO EM VIDA LIVRE	50
6.3.1	Atividade dos promotores dos genes <i>narK</i> e <i>nrtABC</i> em vida livre.....	50
6.3.2	Atividade do promotor do operon <i>pNit</i> em vida livre	53
6.3.3	Atividade do promotor do operon <i>nasTS</i> em vida livre	55
6.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROMOTOR DURANTE A NODULAÇÃO	57
6.4.1	Atividade de promotores de genes da via assimilatória em nódulos	58
6.4.2	Atividade dos promotores de genes da via dissimilatória em nódulos...	69
6.5	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO MUTANTE <i>ntrC</i> - NA SIMBIOSE.....	73
6.6	ORGANIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE NITRATO.....	78

7	CONCLUSÕES	82
8	REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio pode ser encontrado em diferentes formas na natureza. Na sua forma orgânica este nutriente faz parte da composição de diversas biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. Já a sua forma inorgânica pode ser encontrada como dinitrogênio (N_2) amplamente presente na atmosfera, ou em solos e fontes de água na forma de amônia (NH_3), nitrato (NO_3^-) e outros óxidos nitrogenados (CHERKASOV; IBHADON; FITZPATRICK, 2015; HERRERO; FLORES; IMPERIAL, 2019a). O uso deste elemento por organismos vivos está atrelado aos processos de conversão destes compostos, sendo a amônia preferencialmente metabolizada pois pode ser direcionada diretamente para a síntese de macromoléculas. Todavia, quando há baixa disponibilidade, fontes alternativas de nitrogênio podem ser utilizadas para a incorporação à biomassa celular. Entre essas alternativas estão a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a assimilação de nitrato, uma das principais fontes de nitrogênio para microrganismos (MERRICK; EDWARDS, 1995; MOROZKINA; ZVYAGILSKAYA, 2007).

A fixação biológica consiste na conversão de dinitrogênio em amônia através de um complexo enzimático conhecido como nitrogenase. Esta redução do nitrogênio gasoso é realizada por um grupo de bactérias e arqueas, conhecidos como diazotrofos, em vida livre ou em associação simbiótica dependendo do organismo (BATISTA; DIXON, 2019; MUS *et al.*, 2018). Já a assimilação de nitrato ocorre através da redução do nitrato à amônia pela via assimilatória, composta por enzimas como a nitrato e nitrito redutase, cujos genes geralmente são encontrados em mesmo operon. Em alguns casos, estes genes estruturais podem estar acompanhados por genes que codificam para transportadores, reguladores e cofatores, embora estes também possam ser encontrados em diferentes regiões cromossômicas (CABRERA *et al.*, 2016; HERRERO; FLORES; IMPERIAL, 2019a; LÓPEZ *et al.*, 2017; RUIZ *et al.*, 2019).

O processo assimilatório demanda um alto custo energético, portanto essa via está sob regulação de dois sistemas. O primeiro é o sistema de controle global do metabolismo de nitrogênio (sistema NTR), responsável por minimizar o baixo crescimento celular em condições de baixas concentrações de amônio por meio da

atuação de proteínas de transdução de sinal (PII) e reguladores de transcrição, como o sistema de dois componentes NtrBC. A segunda forma de regulação encontrada em bactérias como *Klebsiella oxytoca* e *Azotobacter vinelandii* ocorre na presença de nitrato e é mediada por proteínas anti-terminação de transcrição, sendo assim estas proteínas se ligam ao RNA mensageiro do operon impedindo a terminação prematura (BATISTA; DIXON, 2019; DIXON; KAHN, 2004; HERRERO; FLORES; IMPERIAL, 2019b).

Sinorhizobium fredii NGR234 está entre as bactérias capazes de realizar a fixação de nitrogênio e a assimilação de nitrato. Neste organismo, como em outros Rizóbios, a FBN ocorre apenas em associação simbiótica com plantas da família Fabaceae por meio da nodulação, sendo que NGR234 destaca-se devido a sua promiscuidade como nodulador (PUEPPKE; BROUGHTON, 1999; SALDAÑA *et al.*, 2003). No entanto, apesar de compartilhar os genes da via assimilatória com uma vasta diversidade de bactérias, esta via permanece inexplorada neste organismo.

A via da desnitrificação também é responsável pela redução do nitrato encontrado no ambiente, entretanto diferente do que ocorre na via assimilatória este nitrato é reduzido como forma de obtenção de energia em condições de baixas concentrações de oxigênio. As enzimas que realizam esta redução são codificadas pelos genes *nap*, *nir*, *nor* e *nos* e estão presentes em uma grande variedade de rizóbios, podendo ser encontradas em sua totalidade como ocorre em *Bradyrhizobium japonicum* ou de maneira incompleta como é observado em diversos rizóbios, como em *S. fredii* NGR234 e *Sinorhizobium meliloti* (ALBRIGHT *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2017a; TORRES *et al.*, 2011). Em *B. diazoefficiens* a via de regulação é mediada pelos sistemas FixLJ e RegSR que atuam como um sistema sensor e de resposta a baixas concentrações de O₂, levando à expressão de genes associados à respiração, resposta a estresse, desnitrificação, entre outros (TORRES *et al.*, 2011)

Assim como a via assimilatória, a desnitrificação em *S. fredii* NGR234 não é explorada apesar de possuir parte dos genes da via, sendo que os reguladores FixLJ e RegSR não estão presentes neste organismo. Desta forma, o presente trabalho se propõe a investigar a regulação da expressão de genes envolvidos com

o metabolismo de nitrato em *S. fredii* NGR234 buscando aprofundar o conhecimento do metabolismo de nitrogênio neste organismo.

2 JUSTIFICATIVA

O nitrogênio é um nutriente essencial para organismos vivos uma vez que faz parte da composição de diversas biomoléculas, entre elas proteínas e ácidos nucleicos. Apesar da sua essencialidade para a vida e enorme disponibilidade na atmosfera, eucariotos não possuem a capacidade de assimilar este composto na sua forma gasosa de dinitrogênio (N_2), mas essa habilidade é encontrada em vários grupos de bactérias e arqueas, chamados de diazotrofos (CHERKASOV; IBHADON; FITZPATRICK, 2015; MUS *et al.*, 2018). A associação simbiótica entre leguminosas e rizóbios confere a nutrição necessária para crescimento da planta, disponibilizando nitrogênio em formas de fácil assimilação (TIMMUSK *et al.*, 2017). Entretanto, apesar da relevância dessa associação simbiótica, a maioria dos rizóbios nodula um número limitado de plantas, como *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* que é capaz de infectar apenas espécies de trevos do gênero *Trifolium* (POOLE, 2017). Nesse sentido, *Sinorhizobium fredii* NGR234 é de grande interesse devido a sua promiscuidade, sendo capaz de nodular 112 gêneros de leguminosas (PUEPPKE; BROUGHTON, 1999).

Organismos diazotrófos são uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos, os quais são conhecidos por gerar danos ambientais durante o processo de fabricação e uso, acarretando numa grande entrada de nitrogênio nos ecossistemas. A exemplo estão os campos de agricultura, os quais apresentam a sua rede de microbiota altamente afetada por essa entrada antropomórfica de nitrogênio (AHMED *et al.*, 2017; KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018). Assim, o uso de bactérias fixadoras como biofertilizantes apresenta vantagens por não causar danos ao meio e por estas atuarem na restauração da fertilidade do solo (TIMMUSK *et al.*, 2017). Desta forma, é necessário o estudo de todos os aspectos do metabolismo de nitrogênio destas bactérias para a melhor compreensão da sua fisiologia no solo e em simbiose com as plantas de interesse agrícola.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a regulação da expressão de genes envolvidos com o metabolismo de nitrato em *Sinorhizobium fredii* NGR234 e investigar o papel das proteínas NtrC, NasTS, FixK, NarK e NrtABC de *S. fredii* NGR234 na regulação do metabolismo de nitrato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter construções para obtenção de estirpes mutantes de *S. fredii* NGR234 incapazes de expressar os genes *nasT*⁻, *fixK*⁻, *narK*⁻, *nrtA*⁻;
- Clonar as regiões promotoras dos operons *nasTS*, *nrtCnirBDnarBcysG*, *nrtABC*, *narK* e *napEFDABC* de *S. fredii* NGR234 fusionadas ao gene repórter GFP;
- Avaliar a expressão dos operons *nasST*, *nrtCnirBDnarBcysG*, *nrtABC*, *narK* e *napEFDABC* nas estirpes selvagem e mutante *ntrC*⁻ de *S. fredii* NGR234;
- Avaliar a capacidade de nodulação da estirpe mutante *ntrC*⁻ de *S. fredii* NGR234 em *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) BAT93.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 *Sinorhizobium fredii* NGR234

Os rizóbios são microrganismos presentes no solo capazes de fixar nitrogênio em associação simbiótica com plantas da família Fabaceae através da nodulação. Entre os noduladores, *S. fredii* NGR234 se destaca, visto que é o microsimbionte com o maior espectro de nodulação, possuindo uma abrangência de 112 gêneros de leguminosas e a não-leguminosa *Parasponia andersonii* (CAGE, 2004; PERRET; STAEHELIN; BROUGHTON, 2000; PUEPPKE; BROUGHTON, 1999). Este simbiote, anteriormente *Rhizobium* sp. NGR234, é um bacilo gram-negativo isolado pela primeira vez em Papua-Nova Guiné (TRINICK, 1980). Atualmente pertence ao gênero *Sinorhizobium* de acordo com a classificação taxonômica baseada em filogenia de genoma (PARKS *et al.*, 2018), embora alguns autores defendam a reunião de *Sinorhizobium* no gênero *Ensifer* baseando-se em análise de rRNA 16S e *recA* (WILLEMS *et al.*, 2003; YOUNG, 2003).

O genoma de *S. fredii* NGR234 possui 6,9 Mpb dividido em três replicons, sendo um cromossomo (cNGR234) contendo os genes necessários para a maior parte da manutenção das funções e crescimento celular, com um total de 3.633 ORFs; um megaplasmídeo (pNGR234b) possuindo genes também necessários para a manutenção celular, num total de 2.342 ORFs e um plasmídeo simbiótico (pNGR234a), o qual não abriga genes essenciais, mas contém genes relacionados ao processo de simbiose, incluindo o genes para nodulação e fixação de nitrogênio (SCHMEISSER *et al.*, 2009)

4.2 *Sinorhizobium fredii* NGR234 E A PROMISCUIDADE DE NODULAÇÃO

O amplo espectro de nodulação de NGR234 é constantemente alvo de estudos desde o seu descobrimento, entretanto o mecanismo que possibilita essa ampla faixa de hospedeiros permanece desconhecido. Embora não esteja completamente elucidado, algumas hipóteses argumentam que essa capacidade de nodulação pode ser explicada pelo número de sistemas especializados de secreção

de proteínas presentes no genoma de NGR234 (SCHMEISSER *et al.*, 2009). Em comparação com rizóbios de baixa amplitude de nodulação como *S. meliloti* e *R. leguminosarum*, NGR234 possui quase duas vezes mais sistemas de secreção, sendo alguns duplicados. Embora ainda não existam evidências que suportem com mais firmeza essa hipótese, outros mecanismos também são investigados com o intuito de esclarecer esse fenômeno, como o estudo dos fatores Nod. Estes fatores possuem um importante papel na nodulação, em especial em NGR234, devido a sua capacidade de sintetizar cerca de 80 fatores Nod diferentes, um número maior que outros noduladores e que pode contribuir para essa gama de hospedeiros (SCHMEISSER *et al.*, 2009; UNAY; PERRET, 2020).

Outro mecanismo é o *Quorum sensing* (QS) que consiste na comunicação entre as bactérias por meio de moléculas auto indutoras (AI) secretadas e reconhecidas pelas células vizinhas, isto ocorre quando uma certa densidade populacional é atingida, desta forma a expressão gênica é regulada a nível populacional. Portanto, esse sistema demonstrou ser de importante influência modulando a expressão de genes envolvidos na mobilidade, sistemas de secreção, biossíntese de cofatores, metabolismo energético e entre outros. Sendo assim, é possível que QS possa influenciar o estabelecimento do processo simbiótico. Embora estudos com mutantes para os autos indutores de QS não tenham estabelecido uma ligação direta com a nodulação, a falta de QS pode afetar estágios fundamentais para a simbiose, uma vez que esta ausência de AI em NGR234 resulta na indução de genes simbióticos e produção de fatores Nod sem a presença de sinais da planta (DUIN, 2021; GROTE *et al.*, 2016; PETERSEN, 2019).

Além destes fatores, a diversidade de hospedeiros de NGR234 pode ser resultado da flexibilidade metabólica pois este organismo é capaz de resistir a uma grande variedade de condições nutricionais, consecutivamente possui uma maior taxa de sobrevivência do que rizóbios que possuem vias metabólicas mais restritas. Sendo assim, a competição pela rizosfera é uma etapa chave da simbiose, visto que bactérias capazes de metabolizar diferentes fontes de carbono e nitrogênio secretadas pela planta terão uma maior taxa de colonização da mesma (SCHMEISSER *et al.*, 2009).

4.3 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

A comunicação entre raiz e os microrganismos presentes no solo é um importante processo que caracteriza a rizosfera, região de contato da raiz com o solo. Os rizóbios são encontrados nessas regiões juntamente com uma diversidade de outros organismos que desempenham uma interação positiva, como a simbiose com rizóbios fixadores e/ou micorrizas que auxiliam o desenvolvimento da planta hospedeira ou interações negativas com parasitas e microrganismos patogênicos (WALKER *et al.*, 2003). Estas interações são influenciadas pela planta hospedeira responsável por modular a composição do microbioma da raiz por meio de exsudatos, levando à competição pela colonização da rizosfera e a nodulação da raiz. (LEDERMANN; SCHULTE; POOLE, 2021; TKACZ *et al.*, 2015; WALKER *et al.*, 2003).

Para o estágio de nodulação, uma série de genes se destacam como fundamentais para infecção, diferenciação em bacteroide e fixação biológica, como os genes *nod*, *nif* e *fix*. Os genes *nod* são responsáveis pela resposta gerada pela liberação de compostos orgânicos pela raiz da planta, como carboidratos, aminoácidos e principalmente flavonoides (VEITCH, 2009). Estes compostos exsudados, quando reconhecidos pela bactéria, interagem com a proteína regulatória NodD, que se liga às sequências conservadas conhecidas como *nod-box* na região promotora dos genes *nod*, *nol* e *noe* (FISHER; LONG, 1993; MARTINEZ; ROMERO; PALACIOS, 1990). Os genes *nod* codificam para as enzimas que sintetizam os fatores Nod e a síntese e secreção desses fatores levam a indução da morfogênese da raiz da planta, como a deformação dos pelos radiculares, flutuações nos níveis de cálcio, despolarização das membranas, alterações no citoesqueleto, formação do cordão de pré-infecção, multiplicação das células corticais e desenvolvimento do nódulo (A.BARTSEV, H.KOBAYASHI, 2004; DOWNIE; WALKER, 1999; OLDROYD; DOWNIE, 2004).

Os fatores Nod, aliados aos exopolissacarídeos de membrana, são responsáveis por induzir o início da colonização das células corticais através de um cordão de infecção produzido pela planta (CAGE, 2004; JONES *et al.*, 2007). A formação do cordão permite que a bactéria, num primeiro momento, se multiplique dentro do cordão separada do citoplasma da célula vegetal devido a presença da

parede celular. Em seguida, conforme o cordão de infecção se desenvolve e se ramifica, o rizóbio adentra o citoplasma das células corticais e neste local expressa proteínas necessárias para a sua diferenciação em bacteroides e para a fixação biológica de nitrogênio. Essa diferenciação e a completa formação do nódulo propicia um microambiente necessário para ação da enzima nitrogenase, devido a presença da proteína leghemoglobina e uma barreira de difusão de O₂. Este ambiente impede que o oxigênio inative a nitrogenase, permitindo que esta desempenhe sua função de converter o nitrogênio atmosférico (N₂) em amônia (NH₃), disponibilizando este nutriente para a planta (BURRIS; ROBERTS, 1993; CHERKASOV; IBHADON; FITZPATRICK, 2015; OLDROYD; DOWNIE, 2008).

A transição do estilo de vida livre para a forma de fixador de nitrogênio é resultado de uma série de mudanças de condições enfrentadas pelos rizóbios. Nesse sentido, estudos buscam compreender a progressão da interação planta-bactéria, embora nem sempre seja possível relacionar diretamente o efeito de um fenótipo mutante a um estágio específico da simbiose. No entanto, através de ensaios com *Rhizobium leguminosarum* foram identificados genes relacionados com os diferentes estágios da simbiose como crescimento na rizosfera, ligação a raiz, formação de nódulo e diferenciação em bacteroide, evidenciando a importância da capacidade adaptativa durante todo processo simbiótico visto que o metabolismo durante a sobrevivência na rizosfera é altamente complexo e pode afetar a colonização desta região e posteriormente a competitividade na nodulação (LEDERMANN; SCHULTE; POOLE, 2021).

Diversos genes foram associados à nodulação competitiva com funções necessárias desde a rizosfera até os estágios mais avançados da nodulação. Entre estes genes inclui-se *ntrBC*, sendo que o sistema NTR possivelmente atua na sobrevivência das bactérias em solos naturais onde o nitrogênio está em baixas concentrações, até genes relacionados a produção de lipopolissacarídeos (LPS) e exopolissacarídeos (EPS) associados a resposta ao sistema imune da planta durante a formação do cordão de infecção (WHEATLEY *et al.*, 2020).

4.4 CONTROLE DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO

Os mecanismos bioquímicos e genéticos associados ao controle do metabolismo de nitrogênio são melhor conhecidos em enterobactérias, entretanto os elementos que compõem o sistema são encontrados em diversos grupos de bactérias (MERRICK; EDWARDS, 1995). Em *Escherichia coli*, o sistema global de regulação de nitrogênio (NTR) é composto pelas proteínas UTase/UR, as proteínas PII (GlnB e GlnK), o transportador AmtB e as proteínas regulatórias NtrB e NtrC (DIXON; KAHN, 2004; JAVELLE; MERRICK, 2005; MERRICK; EDWARDS, 1995). Em condições limitantes de nitrogênio, quando os níveis de glutamina são relativamente baixos, a proteína UTase/UR produto do gene *glnD*, modifica covalentemente GlnB pela adição de um grupo uridilil (UMP) a um resíduo de tirosina em cada um dos três monômeros da proteína. A forma GlnB-UMP previne a ligação com NtrB, desta forma NtrB promove a fosforilação da proteína NtrC ativando-a. Em contrapartida, quando os níveis de nitrogênio são relativamente altos, ocorre a ligação da glutamina à proteína UTase/UR causando a remoção do grupo uridilil de GlnB. Nesta forma, a proteína GlnB é capaz de ligar-se a NtrB e estimular a desfosforilação de NtrC, inativando-a. O controle da atividade da proteína GlnK por uridililação ocorre de modo semelhante, mas os alvos desta proteína diferem um pouco de GlnB. Em altos níveis de nitrogênio intracelular, a proteína GlnK inibe o transportador de amônia AmtB, ao passo que sob escassez de nitrogênio, a modificação covalente por UMP impede a ligação GlnK-AmtB, permitindo o transporte de amônia (DIXON; KAHN, 2004; MERRICK; EDWARDS, 1995).

Aproximadamente 2% do genoma de *E. coli* está sob a regulação transcricional direta ou indireta da proteína NtrC em conjunto com a holoenzima RNA polimerase - σ^{54} . A proteína NtrC ativa a transcrição de genes e operons responsáveis por minimizar o baixo crescimento sob condições limitantes de nitrogênio. Em sua maioria, estes operons codificam sistemas de transporte de moléculas nitrogenadas, incluindo proteínas recicladas durante a síntese da parede celular. Em enterobactérias, a escassez de nitrogênio é percebida de acordo com o decréscimo da concentração interna de glutamina. Os genes regulados por NtrC possuem a função de mediar a assimilação de amônia em dois produtos intermediários, a glutamina e o glutamato. Entre os genes ativados por NtrC

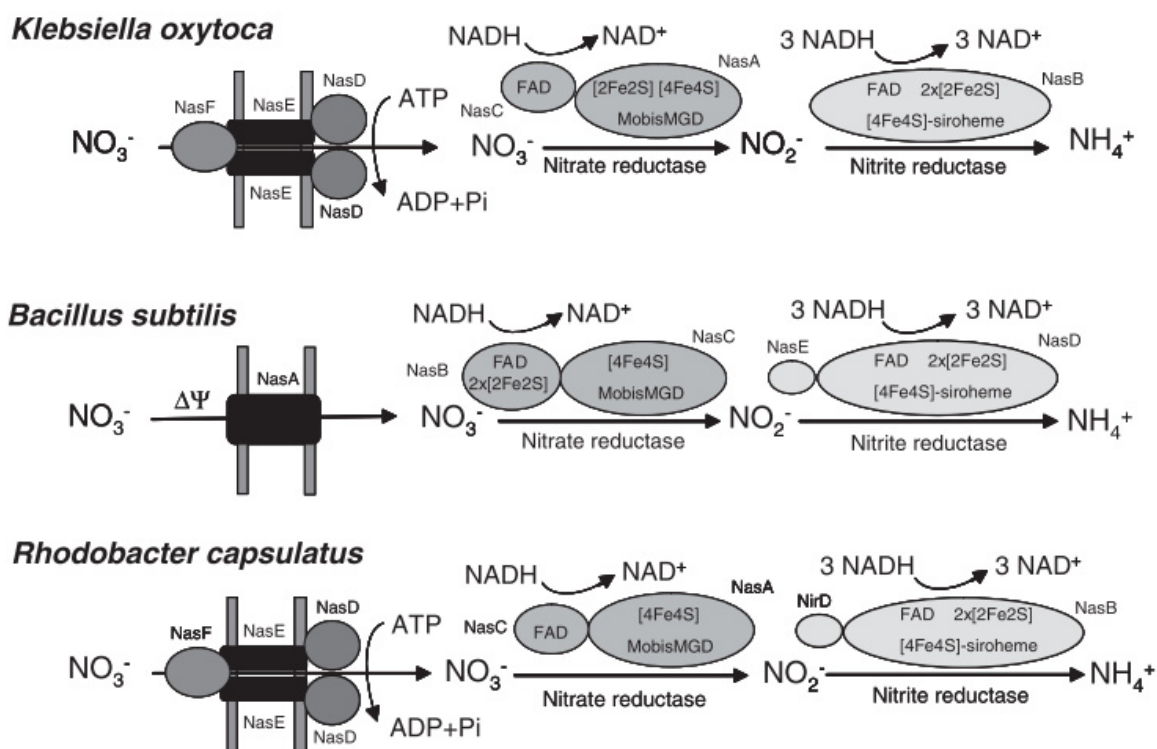
encontram-se o transportador de amônia (*amtB*), a glutamina sintetase (*glnA*), amino ácido permeases e enzimas catabólicas (ZIMMER *et al.*, 2000).

Os sistema NTR também é encontrado em outros microrganismos como em bactérias fixadoras de vida livre, como por exemplo em *Klebsiella pneumoniae* onde o sistema NTR atua no controle da fixação de nitrogênio através da ativação do gene *nifA* que age na ativação da transcrição dos genes *nif* encarregados do processo de fixação (PATRIARCA; TATÈ; IACCARINO, 2002). Entretanto, em bactérias noduladoras, o controle da fixação de nitrogênio geralmente não responde ao sistema NTR. Em *Bradyrhizobium diazoefficiens*, a ativação de *nifA* é realizada pelo sistema RegSR. Neste organismo a proteína NtrC tem sua ação sobre as vias de assimilação de nitrato, e em baixas concentrações de glutamina, ativa os genes para o metabolismo de nitrato e nitrito, para a incorporação deste composto e uso para crescimento da bactéria (DIXON; KAHN, 2004; LÓPEZ *et al.*, 2017)

4.5 ASSIMILAÇÃO DE NITRATO

Análises de genomas procarióticos evidenciam a ampla distribuição de genes envolvidos na assimilação de nitrato. Entretanto, apesar deste vasto compartilhamento entre bactérias, a caracterização fisiológica e bioquímica desta via se concentra em cianobactérias e em bactérias heterotróficas como *Klebsiella oxytoca*, *Rhodobacter capsulatus*, *Azotobacter vinelandii* e *Bacillus subtilis* (LÓPEZ *et al.*, 2017; LUQUE-ALMAGRO *et al.*, 2011). A via assimilatória de nitrogênio tem como função a incorporação de nitrato (NO_3^-) a compostos orgânicos, agregando este nutriente à biomassa celular essencialmente via glutamina/glutamato sintase (MORENO-VIVIÁN; FLORES, 2007; SPARACINO-WATKINS; STOLZ; BASU, 2014). Essa incorporação ocorre no citoplasma através da redução de nitrato pela enzima nitrato redutase (NR) dependente de molibdênio, utilizando dois elétrons para conversão a nitrito (NO_2^-). A redução subsequente a amônio (NH_4^+) é então realizada pela enzima nitrito redutase (NiR), responsável por catalisar a reação utilizando seis elétrons (Figura 1) (MORENO-VIVIÁN; FLORES, 2007).

FIGURA 1 – ESQUEMA DOS SISTEMAS DE TRANSPORTE E REDUÇÃO DE NITRATO EM *K. oxytoca*, *R. capsulatus* e *B. subtilis*.



FONTE: Modificada de MORENO-VIVIÁN (2007).

K. oxytoca: as enzimas NasF, NasE e NasD (transportadores); NasC e NasA (nitrato redutase) e NasB (nitrito redutase); *B. subtilis*: NasA (transportador); NasB e NasC (nitrato redutase) e NasD NasE (nitrito redutase); *R. capsulatus*: NasF NasE e NasD (transportadores); NasA NasC (nitrato redutase) e NasB e NirD (nitrito redutase).

Os genes necessários para este processo estão geralmente agrupados, entretanto essa organização pode variar entre os organismos, incluindo genes regulatórios e estruturais. Em *Klebsiella oxytoca*, a redução de nitrato é mediada por enzimas presentes no operon *nasFEDCBA*. Os genes *nasFED* correspondem a transportadores periplasmáticos dependentes de nitrito/nitrato do tipo ABC, enquanto *nasCA* codificam para a enzima NADH-nitrato redutase e *nasB* para nitrito redutase. Em *B. subtilis*, *nasBC* codifica para a NR, enquanto que o gene *nasA* corresponde a um transportador, *nasDE* codifica para NiR, e *nasF* está ligado a biossíntese do cofator siroheme (MORENO-VIVIÁN *et al.*, 1999). Nestas bactérias as NR são classificadas como NADH-dependente, já em bactérias como *A. vinelandii* e cianobactérias, as NR são classificadas como dependentes de ferredoxina (Fd) ou flavodoxina (Fld) (FLORES *et al.*, 2005; GANGESWARAN; EADY, 1996).

Rizóbios como *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Sinorhizobium meliloti* também possuem o operon *nas*, contudo *B. diazoefficiens* apresenta os genes da via

assimilatória organizados em diferentes regiões cromossômicas. A nitrato redutase, produto do gene *nasC* se agrupa junto ao gene *narK*, pertencente à família de transportadores de nitrito e nitrato, além dos genes *bjgb* para a hemoglobina bacteriana e *flp* que codifica para uma flavoproteína. O gene que codifica para nitrito redutase, *nirA*, está localizado próximo aos genes regulatórios *nasST*. Em *Sinorhizobium meliloti* os genes da via assimilatória estão agrupados em um mesmo operon, sendo *nirBD* correspondente a NiR, enquanto a NR é produto do gene *narB*, seguido do gene *cysG* que codifica para uma possível uroporfirina-III C-metiltransferase ligada a síntese sirohemo, um cofator da enzima NiR (CABRERA *et al.*, 2016; LÓPEZ *et al.*, 2017).

A regulação da assimilação de nitrato em geral envolve dois sistemas: o sistema de controle geral do metabolismo de nitrogênio (NTR), através da repressão por amônio, e o sistema de controle via proteínas regulatórias Nas. Em bactérias como *K. oxytoca*, este controle é realizado por NasR, e em bactérias como *B. diazoefficiens* e *A. vinelandi*, por meio de proteínas de função análoga, como o sistema de dois componentes NasST (LUQUE-ALMAGRO *et al.*, 2011).

Em casos de limitação de amônio, a proteína NtrC atua na ativação de genes relacionados ao uso de compostos nitrogenados alternativos, como o nitrato, portanto NtrC efetua a ativação transcricional do operon *nas*, como observado em bactérias como *B. diazoefficiens* e *K. oxytoca*. Vários mutantes para o gene *ntrC* já foram desenvolvidos em diferentes organismos. De uma forma geral, estas estirpes são incapazes de utilizar vias alternativas ao amônio para obtenção de nitrogênio. Em *Azorhizobium caulinodans*, por exemplo, o mutante *ntrC*- apresenta crescimento lento em nitrato, redução da expressão do gene *nifA* (envolvido com a fixação de nitrogênio) em condições de fixação, além de apresentar mudanças significativas no fenótipo quando em simbiose (PAWLOWSKI; KLOSSE; DE BRUIJN, 1991). Em trabalhos com *Klebsiella pneumoniae*, mutantes no gene *ntrC* demonstram um fenótipo pleiotrópico, que inclui auxotrofia de glutamina, inabilidade no uso de nitrato e aminoácidos, entre eles histidina, prolina ou arginina, como única fonte de nitrogênio e incapacidade de fixar nitrogênio (FISCHER, 1994). Em estudos avaliando os efeitos da mutação em *ntrC* em *Sinorhizobium meliloti* e *Bradyrhizobium diazoefficiens*, os mutantes não foram capazes de crescer usando nitrato como a única fonte de nitrogênio, sugerindo que nestas bactérias, a proteína

NtrC é necessária para a síntese da enzima nitrato redutase assimilatória (MARTIN; CHAPMAN; CHELM, 1988b; SZETO *et al.*, 1987). Assim como em outras bactérias, a mutação de *ntrC* em *S. fredii* NGR234 também resultou na sua incapacidade de crescimento em meio contendo nitrato como fonte de nitrogênio, indicando a ação de NtrC na regulação do metabolismo de nitrato também em NGR234 (ASSIS, 2019).

Em *K. oxytoca*, NtrC ativa a expressão do operon *nas* e a regulação de *nasR*. A proteína regulatória NasR, na presença de nitrato e ausência de amônio, tem como função impedir a terminação da transcrição do operon, ligando-se a sequência líder de *nasF* impedindo a formação de um grampo de terminação (CHAI; STEWART, 1998; WU *et al.*, 1999). Já em *B. diazoefficiens* e *A. vinelandii*, a proteína NasS age como um sensor de nitrato e nitrito, assim como NasR. No entanto, nestes organismos, a função de antiterminação de transcrição é mediada por NasT, que impede a formação do grampo. Nestes organismos, NtrC atua na ativação do operon da via assimilatória, como ocorre em *K. oxytoca*. Contudo, estudos em *A. vinelandii* indicam que o sistema NTR não possui ação sob a regulação de NasST, como observado para NasR (CABRERA *et al.*, 2016; GUTIERREZ *et al.*, 1995; LÓPEZ *et al.*, 2017).

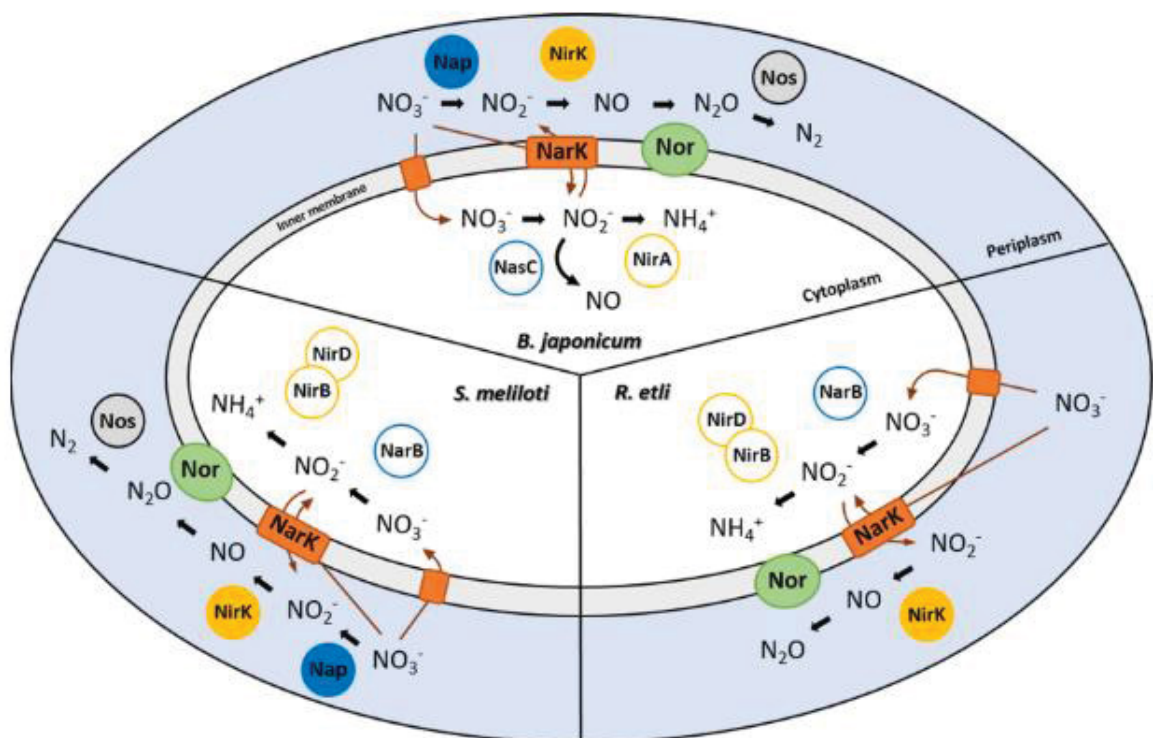
Sinorhizobium fredii NGR234 apresenta genes da via assimilatória organizados no operon *nrtCnirBDnarBcysG* (operon *nas*). Os genes que codificam para possíveis proteínas regulatórias do sistema NasTS também estão presentes, contudo, a regulação dessa via permanece inexplorada. Diferente de *K. oxytoca*, os transportadores de nitrato de NGR234 estão localizados em uma região genômica diferente, possuindo tanto o gene *narK* quanto o operon *nrtAnrtBnrtC*. A região promotora destes genes apresenta prováveis sítios de ligação para NtrC, sugerindo uma possível regulação por esta proteína (TOZATTO, 2023).

4.6 VIA DE DENITRIFICAÇÃO EM RIZÓBIOS

O nitrato e o nitrito utilizados pela célula são nutrientes intercambiáveis pelas vias metabólicas que realizam suas reduções. Podem ser metabolizados tanto pela via assimilatória em condições de aerobiose, levando à incorporação a compostos orgânicos, como a sua redução também pode ocorrer através de outros processos biológicos como a denitrificação em caso de anaerobiose, sendo considerado uma

forma de respiração (KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018). Essa respiração utilizando o nitrato como aceptor final de elétrons ocorre em quatro estágios sob condições limitantes de oxigênio, iniciando-se com a redução de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), seguido da redução de nitrito (NO_2^-) a óxido nítrico (NO), óxido nítrico para óxido nitroso (N_2O) e por fim de óxido nitroso para gás nitrogênio (N_2) (Figura 2). A denitrificação é melhor estudada em bactérias como *Paracoccus denitrificans* e *Pseudomonas stutzeri*, contudo rizóbios como *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Azorhizobium caulinodans* também possuem esse processo estudado e se mostram como verdadeiros denitrificadores. Em outras bactérias como *Rhizobium sllae*, *S. meliloti* e *Rhizobium etli*, os genes necessários para a denitrificação como a nitrato redutase periplasmática (Nap), Nitrito redutase contendo cobre (Nir), óxido nítrico redutase (Nor) e a óxido nitroso redutase (Nos) foram identificados (DELGADO; CASELLA; BEDMAR, 2007; ROB J.M. VAN SPANNING, 2007).

FIGURA 2 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA VIA DE DENITRIFICAÇÃO EM *S. meliloti*, *R. etli* e *B. diazoefficiens*.



FONTE: Figura obtida de RUIZ *et al.* (2021).

A denitrificação é realizada no periplasma, enquanto a assimilação ocorre no citoplasma. Nitrato redutase (azul); nitrito redutase (amarelo); Óxido nítrico redutase (verde), Óxido nitroso redutase (preto) e Transportador de nitrato/nitrito (laranja).

No processo de desnitrificação, a primeira redução envolve o uso de dois elétrons, resultando na conversão de nitrato a nitrito catalisada pela enzima nitrato redutase. Em *Bradyrhizobium diazoefficiens*, os produtos do operon *napEDABC* são responsáveis por esse estágio, onde o gene *napA* codifica para a subunidade catalítica. A seguinte redução é realizada pelas enzimas nitrito redutase codificadas pelos genes *nirK* e *nirS*, e este processo resulta no primeiro intermediário gasoso, o óxido nítrico (NO) (BEDMAR; ROBLES; DELGADO, 2005). Devido à alta toxicidade do NO, sua conversão ocorre rapidamente pelo produto dos genes *norCB*, os quais codificam para os citocromos tipo c e b, respectivamente. Em *B. diazoefficiens*, a reação final de desnitrificação é realizada pelos produtos do operon *nosRZDFYLX*, através da conversão de óxido nítrico a gás nitrogênio por meio de NosZ, enquanto os outros genes são responsáveis por codificar os componentes necessários para a regulação e transferência de elétrons (BEDMAR; ROBLES; DELGADO, 2005).

A deleção dos genes do cluster III em *S. fredii* CCBAU45436 contendo os genes para desnitrificação *nap*, *nir* e *nor* e genes como *nnrS* e *hemN1*, acarretou na incapacidade de persistência dos nódulos desta estirpe em plantas como *Glycine max* (soja), além do número de bacteroides presentes nos nódulos ser significativamente menor em *G. max*, *Cajanus cajan* (Guandu) e *G. soja* (soja selvagem). De modo semelhante, mutantes para o cluster III em *S. sp. II* CCBAU05631 apresentaram nódulos prejudicados em *G. soja* e *C. cajan*. Em ambas as estirpes os nódulos foram ineficazes, resultando em plantas com a parte aérea sem diferenças significativas comparado ao tratamento controle sem inoculante (LIU *et al.*, 2017a).

Posteriormente os genes contidos no cluster III foram individualmente mutados e a mutação dos genes *nap* (nitrato redutase periplasmática) em *S. fredii* CCBAU45436 resultou na inefetividade da fixação biológica de nitrogênio, sugerindo que estes genes são essenciais para esse processo. Por outro lado, em *S. sp. II* CCBAU05631, os genes *nap* foram dispensáveis para a fixação. O número de nódulos também sofreu alteração uma vez que em *S. fredii* CCBAU45436, a ausência de *nap* levou a presença de três vezes mais nódulos em comparação com a estirpe selvagem em nódulos de soja. Entretanto, o peso da parte aérea da planta foi significativamente menor nas plantas inoculadas com estirpes *nap*. Em

contrapartida, os genes *nir* e *nor* não foram necessários para a interação simbiótica com a soja (LIU *et al.*, 2017a).

4.7 REGULAÇÃO EM REPOSTA A MICROAEROBIOSE

A regulação da expressão de genes da via de denitrificação e de outros genes associados à microaerobiose ocorre por meio de proteínas regulatórias que respondem aos níveis de oxigênio. Em algumas bactérias noduladoras, esta regulação é realizada pelo sistema de dois componentes FixLJ. Neste sistema, a proteína FixL age como um sensor de oxigênio e em condições de baixa concentração de O₂ exerce sua atividade de histidina quinase se autofosforilando. Em seguida, FixL transfere o fosfato para o regulador de resposta FixJ. Em *S. meliloti*, FixJ fosforilado ativa a transcrição de reguladores como FixK e NifA. Estes reguladores atuam na ativação de genes associados a respiração, como os genes *fixNOPQ* e *fixGHIS*, fixação biológica, como o caso dos genes *nifHDKEX*, assim como genes do metabolismo de arginina, produção de exopolissacarídeos, resposta a estresse, via de denitrificação, entre outros (BOBIK; MEILHOC; BATUT, 2006). Um terceiro regulador, NnrR, atua como um sensor das concentrações de NO e sua ação tem como objetivo promover a transcrição de genes de resposta a esse produto intermediário das vias metabólicas de uso de nitrato. A ativação de NnrR leva à indução de genes como *nirKV*, *napED*, *nosRZDFY* e *nor* (GÓMEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011; MEILHOC *et al.*, 2010; MESA *et al.*, 2003).

Estirpes mutantes de *B. diazoefficiens* para os genes *fixK_{1/2}*, foram incapazes de fixar nitrogênio em nódulos de soja, além de não conseguirem crescer anaerobicamente utilizando nitrato como aceptor final de elétrons. Estes fenótipos são semelhantes aos encontrados para mutantes dos genes *fixLJ* em outros organismos, o que sugere que genes fundamentais para a redução de nitrato e para a via de denitrificação estão sob regulação deste sistema (NELLEN-ANTHAMATTEN *et al.*, 1998). Deste modo, em *B. diazoefficiens*, essa cascata regulatória envolve os genes *fixLJ* como em *S. meliloti*, contudo FixJ leva à ativação dos genes *fixK_{1/2}*, sendo FixK₂ a responsável pela resposta a microaerobiose e pela ativação de NnrR. Já em *S. meliloti*, FixK não atua na indução deste regulador. Além disso, *B. diazoefficiens* também possui o sistema RegRS, o qual responde aos níveis de

oxigênio por meio de RegR, que controla a atividade transcricional da proteína RegS, agindo na indução do operon *fixR-nifA* e de genes de desnitrificação (CABRERA *et al.*, 2011; MESA *et al.*, 2003; NELLEN-ANTHAMATTEN *et al.*, 1998).

Por sua vez, *R. etli* não apresenta os genes *nap* e *nar* necessários para a redução de nitrato, sendo assim este rizóbio não possui a habilidade de crescer em microaerobiose utilizando este nutriente como receptor de elétrons. No entanto, este organismo ainda responde a esta condição através da proteína FixL, que regula FixKf através da proteína FxkR, uma vez que o gene *fixJ* está ausente (RUTTEN *et al.*, 2021; ZAMORANO-SÁNCHEZ *et al.*, 2012).

Sinorhizobium fredii NGR234, assim como *B. diazoefficiens*, apresenta o operon *napEFDABC*, com a adição do gene *napF*. Em outros organismos, o produto deste gene está envolvido no processo de maturação da nitrato redutase, sendo relacionado a uma vantagem evolutiva para os organismos que o apresentam (SPARACINO-WATKINS; STOLZ; BASU, 2014). Outros genes da via de desnitrificação são encontrados como os operons *nir* e *nor*, entretanto o operon *nos* está ausente (LIU *et al.*, 2017a). Em relação a regulação da resposta a microaerobiose em NGR234, os genes *fixLJ* estão ausentes (SCHMEISSER *et al.*, 2009), contudo, NGR234 apresenta os genes *fixK* (NGR_RS00390) e *nnrR* (NGR_RS16270). Apesar de *S. fredii* NGR234 apresentar os genes de desnitrificação, assim como alguns de seus reguladores, não há estudos a respeito das diferenças regulatórias encontradas devido à ausência de FixLJ.

5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1 PLASMÍDEOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes e plasmídeos usados neste trabalho estão listadas no quadro 1. As células de *Escherichia coli* DH10B ou S17.1 foram cultivadas em meio Luria Bertani Broth (LB) a 37°C (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). *S. fredii* foi cultivado em meio de extrato de levedura (TY) (BERINGER, 1974) a 28°C. As culturas de *S. fredii* foram usadas como inóculo para experimentos de crescimento em meio mínimo para rizóbio (RMS) (BROUGHTON *et al.*, 1986) contendo amônio ou nitrato como fonte de nitrogênio. Os antibióticos Rifampicina, Gentamicina, Canamicina e Ampicilina foram adicionados de acordo com os plasmídeos e estirpes utilizadas.

QUADRO 1 – ESTIRPES E PLASMÍDEOS UTILIZADOS NO TRABALHO

ESTIRPES	CARACTERÍSTICAS	REFERÊNCIA
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F-mrcA $\Delta\Phi80dlacZ$ $\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>endA1 recA1 deoR</i> $\Delta((ra,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL-\lambda$	INVITROGEN
<i>Escherichia coli</i> S17.1	<i>tmpR, spcR, strR, recA, pro, hsdR</i> , RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7	(SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983)
<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	Rif ^R derivado do tipo selvagem de NGR234	(TRINICK, 1980)
<i>S. fredii</i> NGR234 NGR$\Delta ntrC$	NGR234 contendo a deleção do gene <i>ntrC</i>	RACHWAL, B. Comunicação pessoal
PLASMÍDEOS		
pTZ57 R/T	Amp ^R , Vetor de clonagem método T/A	FERMENTAS
pUC4-pKIXX	Amp ^R , Km ^R , cassette Tn5 Km	(BARANY, 1985)
pK18mobsacB	Km ^R , <i>sacB, lacZa</i> , Vetor de clonagem que permite a seleção de duplos recombinantes	(SCHÄFER <i>et al.</i> , 1994)
pPROBE-GT	Gm ^R , vetor de clonagem que contém o gene <i>gfp</i> sem promotor.	(MILLER; LEVEAU; LINDOW, 2000)
pPROBE-GT'	Gm ^R , vetor de clonagem que contém o gene <i>gfp</i> sem promotor.	(MILLER; LEVEAU; LINDOW, 2000)
pNitpTZ57	Amp ^R , vetor de clonagem contendo a região promotora do operon <i>nrtCnirBDnarBcysG</i>	Este trabalho
pnarKpTZ57	Amp ^R , vetor de clonagem contendo a região promotora do gene <i>narK</i>	TOZATTO, S. Comunicação pessoal

<i>pnrtApTZ57</i>	Amp ^R , vetor de clonagem contendo a região promotora do operon <i>nrtABC</i>	TOZATTO, S. Comunicação pessoal
<i>narkpTZ57</i>	Amp ^R , vetor de clonagem contendo o gene <i>nark</i>	Este trabalho
<i>nrtApTZ57</i>	Amp ^R , vetor de clonagem contendo o gene <i>nrtA</i>	Este trabalho
<i>nasT1-2pTZ57</i>	Amp ^R , vetor de clonagem contendo o fragmento 1 de 462pb do gene <i>nasT</i>	Este trabalho
<i>nasT3-4pTZ57</i>	Amp ^R , vetor de clonagem contendo o fragmento 2 de 732pb do gene <i>nasT</i>	Este trabalho
<i>fixK1-2pTZ57</i>	Amp ^R , vetor de clonagem contendo o fragmento 1 de 534pb do gene <i>fixK</i>	Este trabalho
<i>fixK3-4pTZ57</i>	Amp ^R , vetor de clonagem contendo o fragmento 2 de 703pb do gene <i>fixK</i>	Este trabalho
<i>pnasTpGT'</i>	Gm ^R , vetor de clonagem que contém o gene <i>gfp</i> com promotor do operon <i>nasST</i>	Este trabalho
<i>pfixKpGT</i>	Gm ^R , vetor de clonagem que contém o gene <i>gfp</i> com promotor do gene <i>fixK</i>	Este trabalho
<i>pnappGT</i>	Gm ^R , vetor de clonagem que contém o gene <i>gfp</i> com promotor do operon <i>napEFDABC</i>	Este trabalho
<i>pnarkpGT'</i>	Gm ^R , vetor de clonagem que contém o gene <i>gfp</i> com promotor do gene <i>nark</i>	TOZATTO, S. Comunicação pessoal
<i>pnrtABCpGT'</i>	Gm ^R , vetor de clonagem que contém o gene <i>gfp</i> com promotor do operon <i>nrtABC</i>	TOZATTO, S. Comunicação pessoal
<i>pBCntrCpLARF</i>	Cm ^R , Tc ^R , vetor de ampla faixa hospedeira com sítio de policlonagem do vetor pTZ18R, contendo o gene <i>ntrC</i> e sua região promotora	ASSIS, 2019
<i>nasTpK18</i>	Km ^R , <i>sacB</i> , <i>lacZa</i> , Vetor de clonagem que permite a seleção de duplo recombinante contendo o gene truncado <i>nasT</i>	Este trabalho
<i>fixKpK18</i>	Km ^R , <i>sacB</i> , <i>lacZa</i> , Vetor de clonagem que permite a seleção de duplo recombinante contendo o gene truncado <i>fixK</i>	Este trabalho

FONTE: O autor (2023)

5.2 PRIMERS

A partir da plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information) a sequência do megaplasmídeo (pNGR234b) de *S. fredii* NGR234 (CP000874.1) foi acessada para construção dos *primers* (Quadro 2).

QUADRO 2 – PRIMERS UTILIZADOS NO TRABALHO

PRIMERS	SEQUÊNCIA	SÍTIOS PARA RESTRIÇÃO	TAMANHO DO AMPLIFICADO
NGR- <i>fixK</i> -Mut1	TTGCCCGA <u>ATTCC</u> GTTGC	<i>EcoRI</i>	534 pb
NGR- <i>fixK</i> -Mut2	CCTGGCTC <u>TAGAT</u> GTCCTGGTC	<i>XbaI</i>	
NGR- <i>fixK</i> -Mut3	TGCCCATC <u>TAGAG</u> GCTACGAC	<i>XbaI</i>	703 pb
NGR- <i>fixK</i> -Mut4	ACGATGC <u>CTCGAG</u> ACATTAG	<i>XhoI</i>	
NGR- <i>nasT</i> -Mut1	CGTACC <u>ATCGAT</u> TCCTCC	<i>Clal</i>	462 pb
NGR- <i>nasT</i> -Mut2	TGGCGT <u>TCTAG</u> ACAATGACTA	<i>XbaI</i>	
NGR- <i>nasT</i> -Mut3	GGCATC <u>CTAGAAA</u> ATGCG	<i>XbaI</i>	732 pb
NGR- <i>nasT</i> -Mut4	AATAGCG <u>GAGCTC</u> GTAATTG	<i>ScaI</i>	
NGR- <i>narK</i> -FOR	CGGAGTCGTCTGCATCAAG		2196 pb
NGR- <i>narK</i> -REV	GGAGCGGATCGAATAGAGC		
NGR- <i>nrtA</i> -FOR	TGTGCTATTCGTCGCAACC		1922 pb
NGR- <i>nrtA</i> -REV	ACATGCCGTTCTCCTGAGG		
NGR- <i>pNit</i>	GGATCTACAGCCAGATGGTCCG		674 pb

FOR			
NGR- <i>pNit</i> - REV	GGCATCGCCAATTCGTGC		
NGR- <i>pNap</i> - FOR	AACGAGACATACAAGGTGACG		542 pb
NGR- <i>pNap</i> - REV	AACGCCAAGACGAGAAAGG		
NGR- <i>pnrtA</i> - FOR	TGTGCTATTCGTCGCAACC		593 pb
NGR- <i>pnrtA</i> - REV	GGAGGGAAAGAGCGTCTTCG		
NGR- <i>pnarK</i> - FOR	GCGAAACAGATGGTGAAG		500 pb
NGR- <i>pnarK</i> - REV	CGGAGTCGTCTGCATCAAG		

Fonte: O autor (2023)

5.3 PREPARO DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES DH10B E S17.1

Inóculos de células das estipes DH10B e S.17 de *Escherichia coli* foram cultivados durante 12 horas em 5 mL de meio LB. Após este período, 600 µL de cada cultivo foram reinoculados em 80 mL de meio SOB (HANAHAN, 1983) em um erlenmeyer de 500 mL, e mantido sob agitação a 120 rpm e temperatura de 37°C por aproximadamente 3 horas. Em seguida a cultura foi incubada em banho de gelo por vinte minutos e distribuída em dois tubos de 40 mL para centrifugação a 5000 rpm por cinco minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspendido em 15 mL de uma solução de MgCl₂ 100 mM mantendo a refrigeração. Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições, e o *pellet* ressuspendido numa solução de CaCl₂ 100 mM em um volume de 25 mL, mantendo sempre em um banho de gelo. Por fim, uma última centrifugação foi realizada e o *pellet* ressuspendido em um volume de 800 µL de CaCl₂ 100 mM com glicerol 20% (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). As células foram distribuídas em tubos de 1,5 mL em volumes de 100µL e armazenadas a -80°C.

5.4 TRANSFORMAÇÃO ATRAVÉS DE CHOQUE TÉRMICO

As células termocompetentes foram descongeladas em banho de gelo, em seguida foram adicionados 2 µL da amostra de DNA plasmidial ou reação de ligação. As células foram mantidas por 20 minutos no gelo, seguido de choque térmico a 42°C em bloco quente por 2 minutos e novamente transferidas para o gelo por 2 minutos. Em seguida, 1 mL de meio LB adicionado e as células mantidas em estufa a 37°C por 1 hora para recuperação. Por fim, as células foram plaqueadas em meio sólido LA e a seleção dos transformantes realizada através da adição do antibiótico adequado. As placas foram mantidas em estufa 37°C por 24 horas (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

5.5 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

A obtenção de DNA plasmidial foi realizada através da centrifugação de 1,5 mL de cultura *E. coli* crescida em meio LB, descartando-se o sobrenadante e

ressuspendendo as células em 150 µL de GET (Glicose – 50mM, Tris HCl pH8,0 – 25 mM, EDTA pH 8,0 – 10 mM). As células foram lisadas com a solução de lise (100 µL NaOH 1,8 M, 100 µL SDS 10% e 800 µL H₂O) e homogeneizadas, deixando-as descansar na bancada. Após cinco minutos foi adicionado 150 µL de Kacf (Acetato de Potássio 3 M, Ácido fórmico 1,8 M) a mistura e incubada por 10 minutos no gelo. Em seguida foi adicionado 50 µL de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico com homogeneização no vortéx seguida de uma centrifugação de 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e acrescentou-se 1 mL de etanol absoluto. Uma segunda centrifugação por 10 minutos foi realizada e o sobrenadante descartado, 800µL de etanol 80% adicionado junto ao *pellet* e centrifugado por 5 minutos, ao fim sobrenadante foi descartado e a amostra levada a estufa para secagem. Após seco, o DNA foi hidratado em 15 µL de água ultrapura (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

5.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em sistemas contendo água ultrapura, MaCl₂ 25 mM, tampão 10x Taq Buffer, dNTP 5 mM, enzima Taq DNA polimerase, DNA molde e primers específicos de acordo com a finalidade de cada caso (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Para análise, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8%.

5.7 REAÇÃO DE DIGESTÃO ENZIMÁTICA E LIGAÇÃO

Para a digestão enzimática dos fragmentos de interesse foi realizada adição das enzimas de restrição, RNase, DNA, tampão adequado à(s) enzima(s) utilizadas e o sistema completado com água ultrapura. O sistema final foi incubado em estufa a 37°C por 3 horas. Os fragmentos obtidos pela digestão enzimática ou PCR foram ligados aos vetores plasmidiais em um sistema contendo 2 µL de tampão da enzima DNA ligase 5X, 0,5 µL de T4 DNA ligase, e as amostras de DNA inserto e vetor. O volume final da solução foi completado por água ultrapura, mantendo a solução a

temperatura ambiente por aproximadamente 18 horas (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

5.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

As amostras de DNA foram visualizadas através de gel de agarose a 0,8% (0,32 g de agarose e 40 mL de TBE 1x) após corrida em tampão TBE 1x (Tris 90 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM). Os géis foram corados por uma solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL e visualizado em um transiluminador com luz ultravioleta e foto documentador.

5.9 CONJUGAÇÃO E SELEÇÃO

Para a conjugação de *E. coli* S17.1 e *S. fredii* NGR234 as culturas foram crescidas em placas de petri com seu meio e antibióticos adequados. Após 24 horas, uma placa com meio TY e LA foi preparada na proporção 1:1 sem antibióticos. Com uma alça estéril, foi realizada a coleta de uma porção de cada cultura e misturadas na placa de conjugação. A placa foi incubada a 28°C por 24 horas. Para selecionar as células de *S. fredii* NGR234 transconjugantes, uma porção da mistura das células da placa de conjugação foi transferida para placa contendo meio TY sólido com antibiótico rifampicina na concentração de 100 µg/mL e o antibiótico de resistência do plasmídeo (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

5.10 ESTRATÉGIAS PARA CONSTRUÇÃO DE ESTIRPES MUTANTES

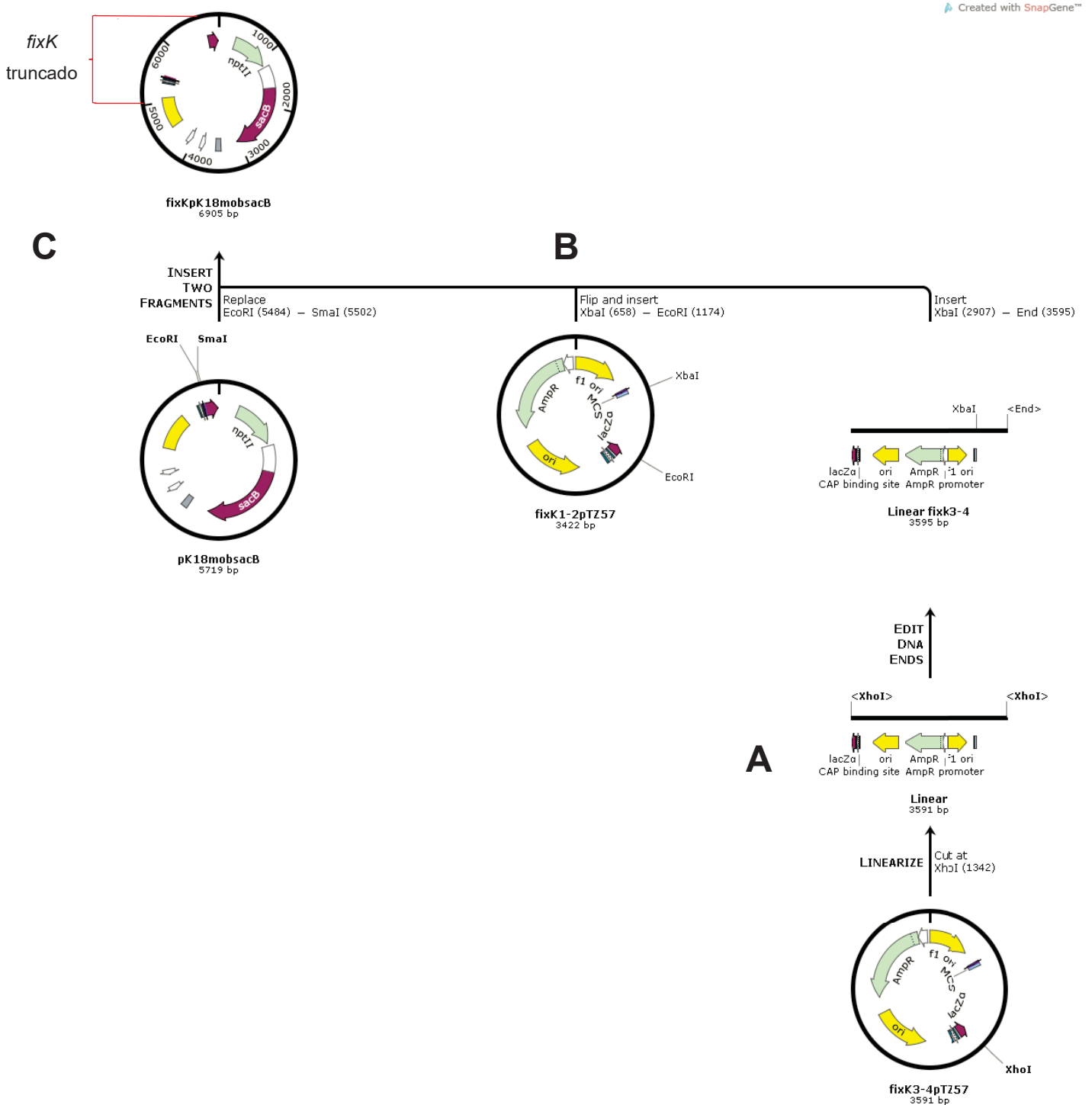
5.10.1 Mutação dos genes *nasT* e *fixK* por deleção em fase

Para obtenção das estirpes mutantes, as sequências *nasT* e *fixK* foram amplificadas a partir do DNA genômico utilizando dois pares de *primers* (quadro 2) e os fragmentos resultantes ligados ao vetor pTZ57 R/T produzindo *nasT1-2pTZ57*, *nasT3-4pTZ57*, *fixK1-2pTZ57* e *fixK3-4pTZ57*. As construções obtidas foram sequenciadas para confirmação da integridade da sequência.

A construção *fixK1-2pTZ57* foi digerida com *EcoRI* e *XbaI*, enquanto *fixK3-4pTZ57* foi clivado com *XhoI* e tratado com T4 DNA polimerase para formação de pontas cegas, seguida da digestão com *XbaI*. Os fragmentos liberados foram ligados ao vetor *pK18mobsacB* linearizado com *SmaI* e *EcoRI*, resultando na deleção de 402pb (figura 3). Semelhante ao realizado para *fixK*, a construção *nasT1-2pTZ57* foi clivada com a enzima *Clal* e tratada com a enzima T4 DNA polimerase e posterior corte com *XbaI*. O plasmídeo *nasT3-4pTZ57* foi digerido com *XbaI* e *HindIII*. Estes fragmentos foram ligados ao vetor *pK18mobsacB* linearizado com *SmaI* e *HindIII*, produzindo o vetor *nasTpK18mobsacB* com um gene truncado com deleção de 427pb do gene *nasT*.

As construções contendo os genes truncados estão sendo sequenciadas para confirmação da deleção e assegurar que outras mutações não foram inseridas nas regiões vizinhas aos genes de interesse. Após esta verificação, será realizada a conjugação e seleção de acordo com os itens 5.9 para obtenção dos simples recombinantes. A seleção dos duplos recombinantes será realizada pela adição de 10% de sacarose, visto que os simples recombinantes que possuem o plasmídeo integrado ao genoma serão incapazes de crescer devido a presença do gene *sacB* (SCHÄFER *et al.*, 1994).

FIGURA 3 – ESTRATÉGIA DE CLONAGEM PARA OBTENÇÃO DE MUTANTES POR DELEÇÃO EM FASE.



A) Clivagem da construção fixK3-4pTZ57 com *XhoI* e tratamento com T4 DNA polimerase, seguido de digestão com *XbaI*; B) Clivagem da construção fixK1-2pTZ57 com as enzimas *EcoRI* e *XbaI*; C) Clivagem do vetor pK18mobsacB com as enzimas *SmaI* e *EcoRI* e ligação dos insertos. A mutação para o gene *nasT* segue a mesma estratégia de clonagem.

FONTE: O autor (2023)

5.10.2 Construção de mutante *nrtA* por inserção de cassete de resistência

O gene *nrtA* foi amplificado a partir do DNA genômico e ligado ao vetor pTZ57 R/T. Esta construção foi clivada com a enzima de restrição *NarI* nas posições 610pb e 787pb do amplificado. O vetor pTZ57 R/T não possui sítio de restrição para esta enzima. Após a clivagem foi realizado o tratamento com a enzima T4 DNA polimerase, seguindo protocolo do fabricante, para edição de pontas cegas.

O cassete de resistência Tn5 Km^R foi clivado do vetor pUC4-pKIXX utilizando da enzima *SmaI*, que produz fragmento com pontas cegas. O cassete foi ligado a construção *nrtApTZ57*, interrompendo o gene. Após confirmação da interrupção por sequenciamento, o gene interrompido será clivado do vetor pTZ57 R/T com as enzimas *HindIII* e *XbaI* para ligação ao vetor pK18*mobsacB* linearizado com as mesmas enzimas. A seleção dos mutantes será realizada de acordo com o item 5.9.

5.10.3 Construção de mutante *narK* por inserção de cassete de resistência

Após a amplificação do gene *narK* e ligação ao vetor pTZ57 R/T esta construção foi clivada parcialmente com a enzima de restrição *ecoRI*. O vetor puC4-K também foi digerido com *ecoRI* para liberação do cassete de resistência Km^R. Em seguida foi realizado a ligação dos fragmentos, resultando na interrupção do gene *narK*. Esta construção será confirmada por sequenciamento. Após confirmação, o gene truncado será clonado ao vetor pK18*mobsacB* para seleção do mutante de acordo com o item 5.9.

5.11 ESTRATÉGIA DE CLONAGEM PARA FUSÃO DAS REGIÕES PROMOTORAS AO GENE REPÓRTER GFP

Para fusão dos promotores ao gene repórter GFP (Proteína de fluorescência verde) foram utilizados os vetores pPROBE-GT ou GT' que possuem o gene *gfp* sem um promotor (MILLER; LEVEAU; LINDOW, 2000). As regiões promotoras dos genes e operons (*narK*, *fixK*, *nasTS*, *nas*, *nrtABC* e *napEFDABC*) foram amplificadas do

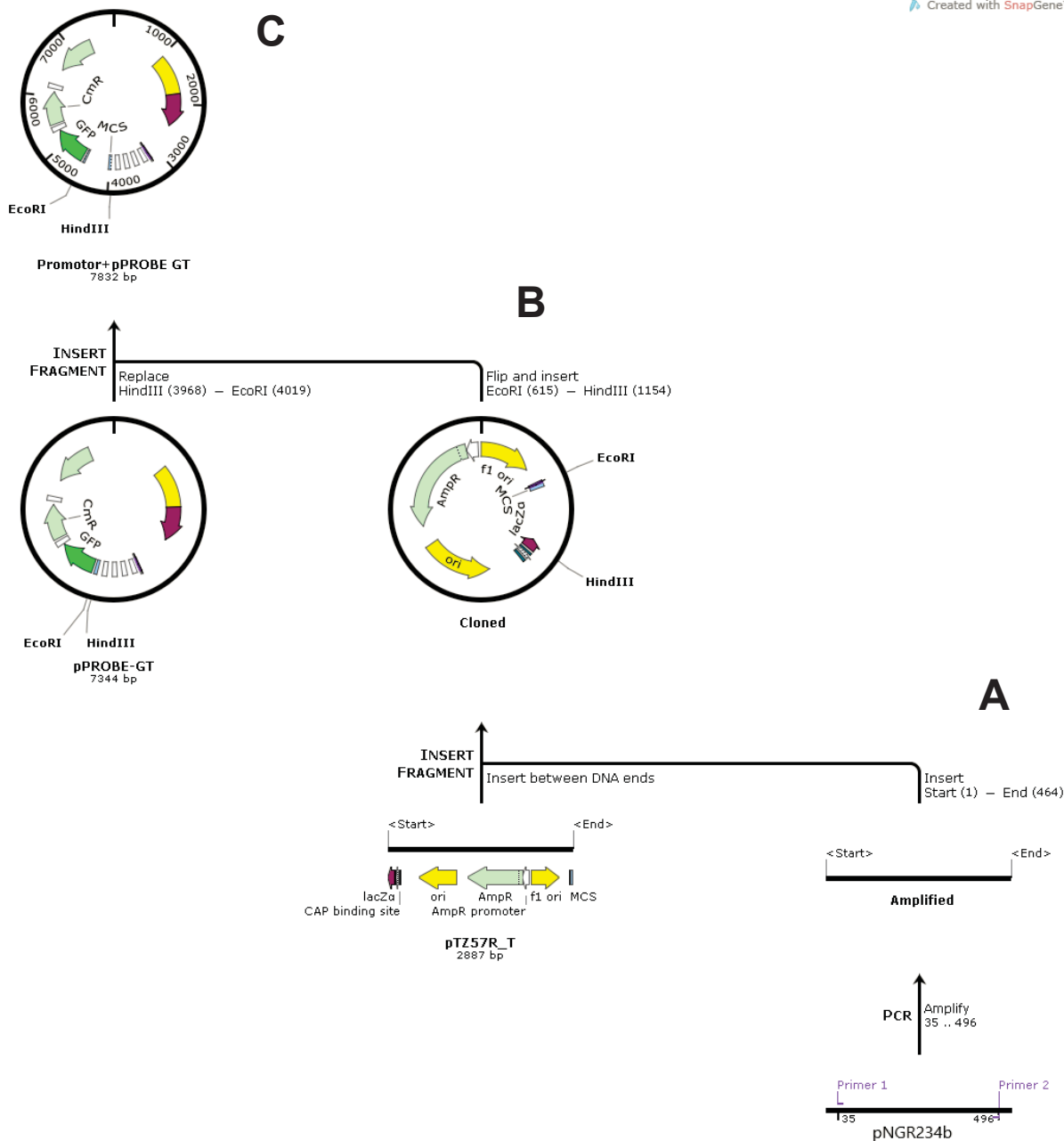
genoma utilizando os primers específicos para cada sequência (Quadro 2). Os fragmentos amplificados foram ligados ao vetor pTZ57 R/T e os clones confirmados por PCR. A integridade e a direção das sequências foram verificadas por sequenciamento com o uso dos primers universais.

O inserto referente ao promotor do *operon nap* foi clivado do pTZ57 R/T utilizando as endonucleases *HindIII* e *EcoRI* para inserção no plasmídeo pPROBE-GT, clivado com as mesmas enzimas, devido a ordem do sítio de restrição *HindIII* → *EcoRI* (Figura 4). Desta forma, a região promotora permanece no mesmo sentido de leitura que o gene GFP.

A clonagem dos promotores de *nasTS*, *nrtABC* e *narK* seguiu a mesma estratégia descrita acima, contudo os fragmentos foram ligados ao vetor pPROBE-GT' devido a direção dos sítios de restrição se encontrarem no sentido *EcoRI* → *HindIII*. Para a clonagem do promotor do gene *fixK* foram utilizadas as enzimas de restrição *PstI* e *XbaI* devido a presença de sítios de restrição *HindIII* e *EcoRI* ao longo da sequência do promotor. O plasmídeo pPROBE-GT também foi clivado com as enzimas *PstI* e *XbaI* respeitando a direção do sítio de policlonagem e sentido de leitura.

FIGURA 4 – ESTRATÉGIA DE CLONAGEM DAS REGIÕES PROMOTORAS AOS VETORES PPROBE-GT E GT'

Created with SnapGene™



A) Amplificação da região de interesse e ligação ao plasmídeo pTZ57 R/T; B) Clivagem do pTZ57 R/T e pPROBE-GT ou GT'; C) Ligação ao vetor pPROBE-GT ou GT'.

FONTE: O autor (2023)

5.12 CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE DE PROMOTOR EM VIDA LIVRE

As construções contendo as fusões dos promotores com GFP foram utilizadas para avaliar a atividade das regiões promotoras por meio de fluorescência em meio com diferentes fontes de nitrogênio. Para isso, as construções foram transformadas e conjugadas com a estirpe selvagem e mutante para *ntrC*. As células conjugantes de *S. fredii* NGR234 foram selecionadas em meio TY a 28°C por 48 horas contendo os antibióticos Rifampicina e Gentamicina. Em seguida estas células foram transferidas para o meio RMS mantendo os antibióticos por mais 24 horas. Após este período a densidade óptica (D.O.) das culturas foi determinado a um comprimento de onda de 600 nm e utilizadas em novos inóculos com D.O. inicial de 0,02 para todas as amostras, em meio RMS contendo nitrato de amônio (NH₄NO₃) ou nitrato de sódio (NaNO₃) por mais 24 horas. Por fim, a D.O.₍₆₀₀₎ e a fluorescência de GFP (Excitação 485nm e Emissão 528nm) foram medidas no equipamento Synergy LX Multi-mode reader – Biotek™.

5.13 ENSAIOS DE NODULAÇÃO

Os experimentos de nodulação realizados para avaliar os efeitos da mutação de *ntrC* ou para análise da atividade de promotor na simbiose foram executados utilizando sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* cv. BAT93). Para isso, as sementes foram esterilizadas, cultivadas e os nódulos coletados de acordo com os itens a seguir.

5.13.1 Esterilização das sementes de feijão (*P. vulgaris* cv. BAT93)

A esterilização de *P. vulgaris* foi realizada por imersão das sementes em ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) por 10 minutos com agitação manual suave. Em seguida, o ácido foi removido e as sementes imersas em água estéril repetidas vezes para remoção do ácido residual. Após serem esterilizadas as sementes foram

distribuídas em placas de petri, contendo meio B & D (BROUGHTON; DILWORTH, 1971) acrescido de 0,5% de ágar. As placas foram envolvidas com papel alumínio e incubadas a 25°C durante dois dias para germinação.

Em ambiente estéril, as sementes germinadas foram transferidas para os jarros de *Leonard*, devidamente preparados com vermiculita e meio B & D. Os potes foram fechados e levados até a câmara de vegetação, com controle de temperatura (24°C diurno e 22°C noturno), umidade (70%) e foto período de 12 horas (4 horas a 300 $\mu\text{Einstein.m}^2.\text{s}^{-1}$, 2 horas 600 $\mu\text{Einstein}$ e 6 horas 300 $\mu\text{Einstein}$). Os potes ficaram fechados na câmara de vegetação durante dois dias, até as sementes germinadas se tornarem plântulas.

5.13.2 Preparo das estirpes para inóculo na planta

Para a obtenção dos inóculos, as estirpes de *S. fredii* NGR234 selvagem e mutante *ntrC*⁻ foram cultivadas em meio TY líquido com os antibióticos adequados a cada tratamento de acordo com o vetor utilizado, sob agitação a 28°C pelo período de 24 horas. Posteriormente, as células foram inoculadas em meio RMS com antibióticos por mais 24 horas. Após este período a densidade óptica (D.O.₆₀₀) das culturas foi determinada por espectrofotometria com o equipamento Synergy LX Multi-mode reader – Biotek™. A partir da D.O.₆₀₀ obtida todas as culturas foram ressuspensas em Sulfato de Magnésio (MgSO₄) a 10 mM ajustando a D.O.₆₀₀ para 0,07. A partir das células ressuspensas foram inoculados 300 μL desta solução próximo à radícula da plântula. Para manter a umidade e evitar contaminações, foi adicionado cerca de 1 cm de esferas de polipropileno estéreis e em seguida as plantas foram devolvidas para a câmara de vegetação e mantidas por três semanas nas condições descritas no item 5.13.1. Ao fim deste período os nódulos foram coletados.

Os ensaios para avaliação da eficiência de nodulação foram realizados por meio da coleta, contagem e pesagem de nódulos e da parte aérea da planta. Os nódulos provenientes de plantas inoculadas com as construções de fusão ao GFP

foram coletados para microscopia e as análises realizadas conforme descrito a seguir.

5.13.3 Secção de nódulos e microscopia confocal

Após a coleta de nódulos frescos, estes foram seccionados utilizando o equipamento Vibratomo VT 1000S – Leica™ a 50µM de acordo com CHEN *et al.*(2005). As lâminas foram montadas e visualizadas em microscopia confocal no equipamento Confocal A1R MP+ Nikon com a objetiva de 20x e abertura de 0.75. A excitação foi realizada com laser a 488nm (um fóton) com exposição e detecção para contraste de interferência diferencial (DIC), além de 450/50 (425-475) para DAPI e 525/50 (500-550) para GFP.

5.13.4 Análise das imagens de microscopia

A intensidade de fluorescência foi medida utilizando o programa ImageJ (Fiji) utilizando as ferramentas de seleção a mão livre e análises de medida. Para obtenção da fluorescência real, os valores de fluorescência de plano de fundo foram subtraídos dos pontos de fluorescência avaliados (SCHINDELIN *et al.*, 2019). As medições foram realizadas em imagens não tratadas. Por outro lado, para melhorar a ilustração das imagens, as fotos foram ajustadas para brilho, contraste e remoção de ruído.

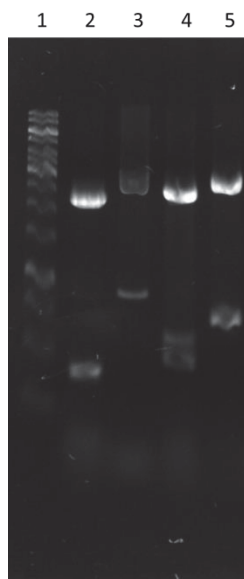
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 OBTENÇÃO DAS CONSTRUÇÕES PARA OS MUTANTES

6.1.1 Deleção em fase dos genes *fixK* e *nasT*

As construções *nasT1-2pTZ57* e *nasT3-4pTZ57* foram clivadas utilizando as enzimas *Clal-XbaI* e *XbaI-HindIII*, respectivamente. Enquanto as construções *fixK1-2pTZ57* e *fixK3-4pTZ57* foram digeridas com as enzimas *EcoRI-XbaI* e *XhoI-XbaI*. A confirmação das restrições foi realizada por eletroforese em gel de agarose (Figura 5). Após a confirmação do tamanho dos fragmentos, as construções foram sequenciadas para verificar a integridade da sequência.

FIGURA 5 – CONFIRMAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DE *nasT* E *fixK* EM pTZ57



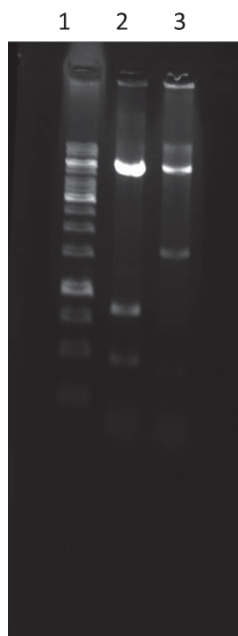
1) Marcador 1Kb; 2) *nasT1-2pTZ57*, fragmento de ≈ 462 pb; 3) *nasT3-4pTZ57* fragmento de ≈ 732 pb; 4) *fixK1-2pTZ57* fragmento de ≈ 534 pb e 5) *fixK3-4pTZ57* fragmento de ≈ 703 pb.

Fonte: O autor (2023)

Após a confirmação os fragmentos foram ligados, gerando os vetores *nasT1-4pK18* e *fixK1-4pK18*. A construção *nasT1-4pK18* foi confirmada por restrição com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* liberando dois fragmentos, um de 794pb e outro de 431pb, enquanto a construção *fixK1-4pK18* clivada com *EcoRI* e *BamHI* libera um

fragmento de 1,2 Kb (Figura 6). Após confirmadas estas construções foram sequenciadas para averiguar a correta ligação dos fragmentos.

FIGURA 6 – CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DE *nasT* E *fixK* TRUNCADOS EM pK18*mobsacB*



1) Marcador 1Kb; 2) *nasT*1-4pK18, fragmento de \approx 431pb e 794pb; 2) *fixK*1-4pK18 fragmento de \approx 1,2Kb

Fonte: O autor (2023)

As construções obtidas no vetor pK18*mobsacB* foram transformadas em células S17.1 de *E. coli* para conjugação com NGR234 selvagem e posterior seleção dos duplos recombinantes.

6.1.2 Mutação por inserção dos genes *nrtA* e *nark*

O gene *nrtA* de NGR234 foi amplificado e clonado no vetor pTZ57 R/T e esta construção foi confirmada por PCR. Após a confirmação, o plasmídeo *nrtA*pTZ57 foi clivado com a enzima *NarI* para linearização do vetor e tratado com T4 DNA polimerase. O cassete de resistência Km^R (Canamicina) foi clivado do vetor puC4-K1XX com a enzima *SmaI*. Em seguida, foi realizada a ligação do cassete à construção *nrtA*pTZ57 linearizada, gerando o plasmídeo *nrtA*ΩKm pTZ57. Esta

construção foi confirmada através de restrição e eletroforese em gel de agarose (Figura 7).

FIGURA 7 – CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DE *nrtA*ΩKm

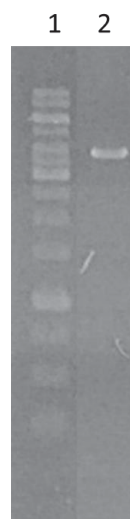


1) Marcador 1Kb; 2 e 3) fragmento contendo gene *nrtA* interrompido pela inserção do cassete de Km ≈3122Kb

Fonte: O autor (2023)

O gene *narK* clonado no vetor pTZ57 R/T foi digerido parcialmente com *EcoRI*. A digestão também foi realizada para o vetor pUC4-K para liberação do cassete de resistência. Em seguida, os fragmentos foram ligados, gerando um inserto contendo o gene *narK* interrompido pela sequência do cassete. A confirmação da clonagem foi realizada por PCR (Figura 8).

FIGURA 8 – CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DE *narK*ΩKm



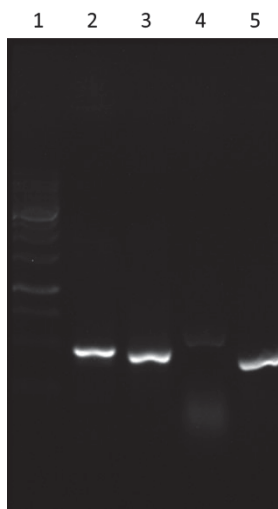
1) 1Kb; 2) gene *narK* interrompido pela inserção do cassete de Km ≈3500Kb

Fonte: O autor (2023)

6.2 FUSÃO DE REGIÕES PROMOTORAS AO GENE GFP

Os promotores dos genes/operons *napEFDABC*, *ntrCnirBDnarBCysG*, *nasTS* e *fixK* foram amplificados a partir do DNA genômico utilizando os *primers* listados no quadro 2 e ligados ao vetor pTZ57 R/T. Cada clonagem foi confirmada através de PCR e eletroforese em gel de agarose. Os clones confirmados foram sequenciados para averiguar a orientação da inserção no vetor pTZ57 e possíveis mutações. O promotor do operon *nasTS* inserido no sentido *EcoRI*→*HindIII* do sítio de policlonagem do pTZ57 foi clivado com estas enzimas e ligado ao vetor pPROBE-GT'. O promotor dos operons *nap* e *pNit* inseridos no sentido *HindIII*→*EcoRI* foram clivados e ligados ao vetor pPROBE-GT. A confirmação da clonagem foi realizada por PCR. Para o promotor de *fixK*, a clonagem foi realizada com as enzimas *PstI* e *XbaI* no vetor pPROBE-GT (Figura 9).

FIGURA 9 – CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM DAS REGIÕES PROMOTORAS EM pPROBE-GT OU GT'



1) 1Kb; 2) promotor de *fixK* ≈534pb; 2) promotor de *nasT* ≈462pb; 3) promotor de *pNit* ≈674pb; 4) promotor de *nap* ≈542pb

Fonte: O autor (2023)

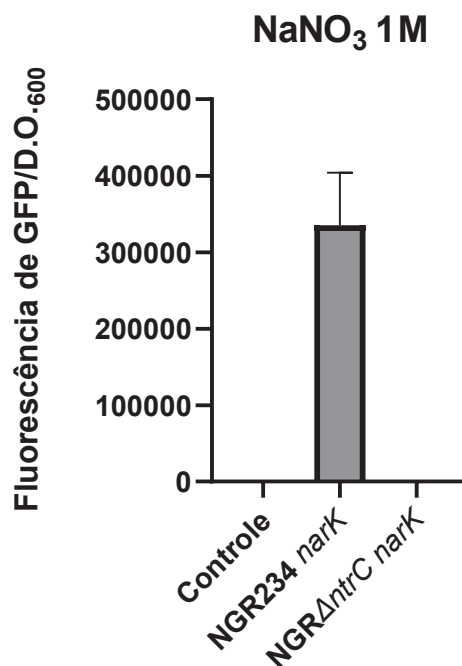
6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS PROMOTORES EM CULTIVO EM VIDA LIVRE

6.3.1 Atividade dos promotores dos genes *narK* e *nrtABC* em vida livre

Utilizando a coleção de reguladores transcricionais reunidos na base de dados RegPrecise (NOVICHKOV *et al.*, 2013), foi possível identificar a presença da sequência consenso para o regulador NtrC na região promotora do gene *narK* e do operon *nrtABC* de NGR234, que codificam para possíveis transportadores de nitrato. Portanto para avaliar a possível atividade regulatória de NtrC sobre estes genes as construções *pnarKpGT'* e *pnrtABCpGT'* (TOZATTO, 2023) foram transformadas em células S17.1 de *E. coli* e conjugadas com as estirpes selvagem e mutante para *ntrC*-de NGR234. Em seguida, as células conjugantes foram crescidas em meio RMS contendo amônio (NH_4NO_3) ou nitrato (NaNO_3) e a fluorescência analisada.

Após 24 horas de crescimento em NH_4NO_3 a fluorescência de GFP para o gene *narK* não foi detectada independentemente da estirpe. No entanto, no crescimento em NaNO_3 a fluorescência foi observada para a estirpe selvagem, enquanto para a estirpe mutante *ntrC*⁻ não foi obtida. Sendo assim, estes resultados sugerem que a fonte de N possui influência na atividade do promotor, no qual amônio pode possivelmente atuar como um repressor na expressão deste gene. Aliado a isto, a ausência de fluorescência no mutante *ntrC*⁻ sugere que é necessário a presença da proteína NtrC funcional para ligação à região promotora, e consecutivamente ativação transcricional do gene. Os controles contendo apenas o plasmídeo pPROBE-GT vazio não apresentaram fluorescência em ambas as fontes de nitrogênio (Gráfico 1).

GRÁFICO 1 – EXPRESSÃO DA FUSÃO *pnarKpGT'* EM MEIO CONTENDO NaNO₃



Os dados são referentes as médias \pm o desvio padrão de três tratamentos independentes testados em triplicata para as estirpes selvagem e mutante *ntrC*⁻ em meio contendo NaNO₃ 1M.

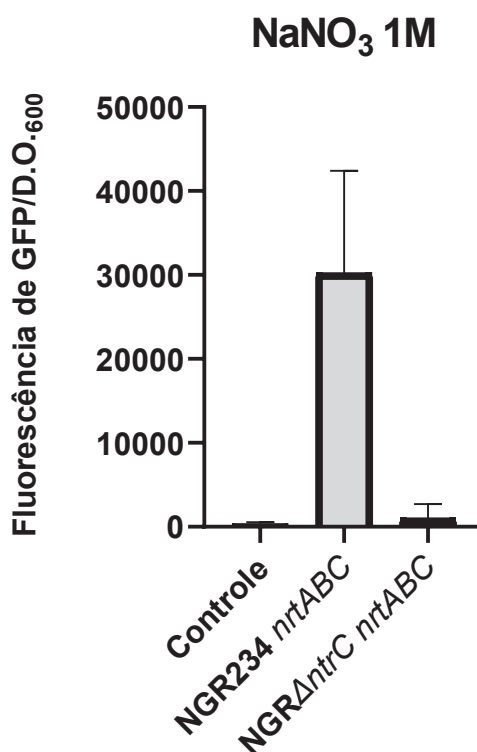
FONTE: O autor (2023)

Embora em *S. fredii* NGR234 o gene *narK* não esteja contido em operon junto a genes da via assimilatória, como ocorre em *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Herbaspirillum seropedicae*, os resultados de expressão de GFP sugerem a ativação transcricional de *narK* por NtrC, assim como ocorre nestes organismos. Em *B. diazoefficiens*, a análise de expressão do operon *narKbjgbflpnas*, por meio da fusão ao gene *lacZ* demonstrou um significativo decréscimo na expressão em mutantes *ntrC* e *RpoN* crescidos em meio mínimo contendo 10 mM de NaNO₃ (LÓPEZ *et al.*, 2017). Além disso, em *Herbaspirillum seropedicae*, análises de RNA-seq indicaram a expressão do operon *narK_{nir}BDH_{sero}_RS14545_{nasA}* na presença de nitrato (BONATO *et al.*, 2016). Estes resultados foram reforçados por ensaios da atividade da β -galactosidase, através da fusão de *pnarK-lacZ*, onde foi observado um aumento de 50 vezes na expressão deste operon em meio utilizando nitrato como fonte de nitrogênio (BONATO *et al.*, 2016). De modo semelhante em *Burkholderia cenocepacia* H111 os transportadores de nitrato/nitrito também demonstrarem uma queda de expressão em mutantes *ntrC*⁻, sugerindo que a inabilidade do mutante em

utilizar nitrato e outras fontes alternativas de N se deve à ausência deste regulador (LIU *et al.*, 2017b).

O operon *nrtABC* de *S. fredii* NGR234 apresentou expressão de acordo com o observado em outras bactérias, inclusive em rizóbios, pois demonstra ser regulado por NtrC, apesar das diferenças observadas quanto a organização dos genes no genoma. O gráfico 2 retrata este cenário onde é possível observar que em mutantes para *ntrC* se obteve baixos níveis de fluorescência de GFP, enquanto o oposto é observado na estirpe selvagem para este gene. O crescimento também foi realizado em NH_4NO_3 e assim como em *narK*, a fluorescência não foi obtida para nenhuma das estirpes testadas. Os controles não apresentaram expressão, indicando que o presente resultado na estirpe selvagem e mutante se deve a regulação mediada através da região promotora do operon *nrtABC*.

GRÁFICO 2 – EXPRESSÃO DA FUSÃO *pnrtApGT'* EM MEIO NaNO_3



Os dados são referentes as médias \pm o desvio padrão de três tratamentos independentes testados em triplicata para as estirpes selvagem e mutante *ntrC* em meio contendo NaNO_3 1M.

FONTE: O autor (2023)

Assim como *narK*, o operon *nrtABC* codifica para um possível sistema de transporte de nitrato em *S. fredii* NGR234. Este sistema também encontrado em

cianobactérias como *Synechococcus elongatus* PCC7942 é homólogo aos transportadores codificados por *nasFED* de *Klebsiella oxytoca* M5a1 (LIN; GOLDMAN; STEWART, 1994). A regulação desse sistema de transportadores na cianobactéria ocorre por meio do regulador NtcA, de maneira equivalente ao sistema NtrBC. Neste caso, NtcA é responsável por regular genes da assimilação de nitrato e nitrito, enquanto os transportadores estão sob regulação da proteína PII (GlnB), regulada pelos níveis de 2-oxoglutarato, refletindo a disponibilidade de amônio (HERRERO; FLORES; IMPERIAL, 2019a; HUERGO; DIXON, 2015). Em *K. oxytoca*, os genes *nasFED* estão presentes no mesmo operon que enzimas estruturais NR e NiR, desta forma são regulados em conjunto pelo sistema NTR, através de NtrC e pelo regulador sensor de nitrato/nitrito NasR (WU; STEWART, 1998; WU *et al.*, 1999). Em *Pseudomonas stutzeri* A1501 os genes *nasFED* também demonstraram ser dependentes de NtrC, neste caso o aumento da expressão destes genes ocorreu tanto em condições de assimilação como durante a fixação biológica de nitrogênio (YANG *et al.*, 2021). A expressão de *nrtA* se mostrou dependente de NtrC também em *B. diazoefficiens*, corroborando com hipótese de regulação pelo sistema NTR, visto que o mutante *ntrC*⁻ em *B. diazoefficiens* apresentou déficit de crescimento quando cultivado com nitrato ou nitrito como fontes de N (FRANCK *et al.*, 2015).

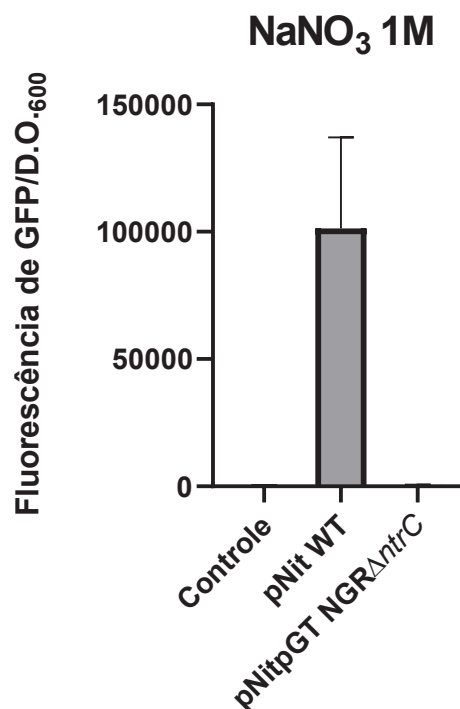
Os resultados referentes ao crescimento em NH₄NO₃ mostram a ausência de expressão dos genes *narK* e *nrtA* tanto na estirpe selvagem como no mutante *ntrC*⁻. Esta ausência de expressão corrobora com a regulação sendo mediada pelo sistema NTR, visto que na presença de NH₄NO₃ este sistema é reprimido, impedindo a ativação dos genes e operons sob regulação do sistema de dois componentes NtrBC. Isto ocorre devido a vantagem energética do uso de amônio, que leva a uma maior taxa de crescimento celular, frente a outros compostos nitrogenados (DIXON; KAHN, 2004; HUERGO; DIXON, 2015; REITZER, 2003).

6.3.2 Atividade do promotor do operon *pNit* em vida livre

Os genes estruturais contidos no operon *ntrCnirBDnarBCysG* (*pNit*), também foram avaliados. A sequência consenso para NtrC foi encontrada pelo banco de dados RegPrecise, logo a região promotora foi fusionada ao gene *gfp* e a construção nomeada de pNitpGT. Os resultados de crescimento utilizando amônio como fonte

de N indicaram que não houve atividade do operon nestas condições, assim como observado para os genes *nrtABC* e *nark*. Por outro lado, no teste de crescimento realizado em meio contendo nitrato, a expressão do operon pNit foi observada na estirpe selvagem, enquanto na estirpe mutante *ntrC*⁻ não apresentou atividade da região promotora, como pode ser visualizado no gráfico abaixo.

GRÁFICO 3 – EXPRESSÃO DA FUSÃO pNitpGT EM MEIO NaNO₃



Os dados são referentes as médias \pm o desvio padrão de três tratamentos independentes testados em triplicata para as estirpes selvagem e mutante *ntrC*⁻ em meio contendo NH₄NO₃ 1M.

FONTE: O autor (2023)

Este padrão de expressão para os genes que codificam a nitrato e nitrito redutase é também observado *P. stutzeri* A1501 dado que análises de qRT-PCR demonstraram que mutantes *ntrC*⁻ crescidos em meio mínimo contendo nitrato demonstraram um decréscimo de expressão para os genes *nasG* (nitrato redutase) e *nasBC* (nitrito redutase) em comparação à estirpe selvagem. O mesmo ocorreu para os genes que codificam para os transportadores destes nutrientes (YANG *et al.*, 2021). Em *B. diazoefficiens* novamente NtrC mostrou desempenhar um papel fundamental na utilização de nitrato, dado que o mutante para este gene teve uma menor taxa de crescimento em nitrato, além de apresentar uma menor cinética de

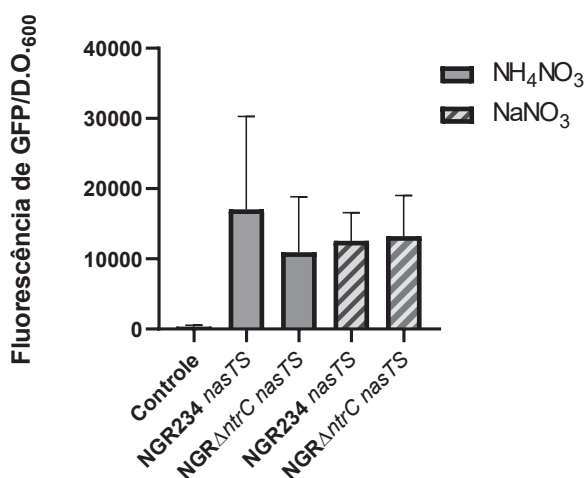
formação de colônia nos primeiros dias de inoculação em comparação a estirpe selvagem. Portanto, a atividade de NtrC sob os genes para nitrato e nitrito redutase foi avaliada pela fusão das regiões promotoras destes genes ao gene *lacZ*, e assim como esperado nitrato foi responsável por induzir a expressão destes nas estirpes selvagens, enquanto nas estirpes mutantes *ntrC* a atividade da β -galactosidase foi praticamente indetectável (LÓPEZ *et al.*, 2017). *Paraburkholderia phymatum* também apresentou baixo crescimento em nitrato para mutante *ntrB*, indicando que o sistema de regulação *ntrBC* também está envolvido na regulação da via assimilatória nesta bactéria (LARDI *et al.*, 2018).

6.3.3 Atividade do promotor do operon *nasTS* em vida livre

Ainda de acordo com o banco de dados RegPrecise a sequência consenso de NtrC está presente em outros genes/operons associados a via assimilatória de nitrogênio. A sequência pode ser encontrada nos promotores dos operons associados a redução de nitrato e nitrito, bem como de promotores de transporte de ureia e amônio. Por outro lado, para os genes *nasTS* que codificam para o sistema regulatório de dois componentes NasTS a sequência consenso não foi encontrada, sugerindo que para estes genes, NtrC não possui efeito regulador em condições de privação de nitrogênio.

Desta forma, para avaliar se há ação de NtrC sob este sistema, o promotor do operon *nasTS* foi fusionado ao gene *gfp*. Os resultados obtidos de expressão por meio da construção *pnasTpGT'* demonstram que estes genes não estão sob regulação de NtrC devido a expressão na estirpe selvagem e mutante, tanto em células crescidas em meio contendo amônio, quanto em células crescidas em meio contendo nitrato. O que sugere que amônio não atua como um repressor como esperado para genes e operons regulados pelo sistema NTR, indicando que *nasTS* possui expressão constitutiva como pode ser analisado através do gráfico 4.

GRÁFICO 4 – EXPRESSÃO DA FUSÃO *pnasTpGT'*



Os dados são referentes as médias \pm o desvio padrão de três tratamentos independentes testados em triplicata para as estirpes selvagem e mutante *ntrC* em meio contendo NH₄NO₃ ou NaNO₃.

FONTE: O autor (2023)

Em *A. vinelandii* este mesmo padrão de regulação foi observado, neste caso os testes de fusão da região promotora do operon *nasST* ao gene *lacZ* demonstraram que *nasST* não está sob controle do sistema NTR, NtrA (σ^{54}) ou de alguma fonte de nitrogênio, seja nitrato ou amônio (GUTIERREZ *et al.*, 1995). Em *K. oxytoca* e *P. denitrificans* entretanto, o sistema NTR tem ação sobre a regulação dos genes *nasR* e *nasTS*, respectivamente. A fusão *nasR-lacZ* indicou um aumento na expressão deste gene em condições limitantes de nitrogênio. Além disso, foi observada a diminuição na expressão em estirpes mutantes para *ntrC* e *rpoN* (σ^{54}), sugerindo que a expressão de *nasR* é dependente de NtrC e σ^{54} . Todavia, apesar dos resultados obtidos para NtrC, a sequência consenso de ligação deste regulador a região promotora de *nasR* não foi detectada, o que sugere que NtrC não precisa de uma região específica para controle deste gene (FERRO-LUZZI AMES; NIKAIDO, 1985; WU *et al.*, 1999).

Em *P. denitrificans*, células crescidas em diferentes fontes de nitrogênio (nitrato, glutamato, amônio e amônio acrescido de nitrato) apresentaram expressão em todas as ocasiões, embora em níveis muito baixos em amônio, portanto não houve expressão constitutiva e a fonte de nitrogênio desempenhou um papel regulatório neste organismo. O sistema NtrBC desempenhou um papel regulatório sob estes genes, pois a estirpe mutante para *ntrB* apresentou a expressão diminuída em análises de RT-qPCR e o mesmo resultado foi observado em análises de

expressão por atividade da β -galactosidase. Além do mais, a presença da sequência consenso de NtrC no promotor de *nasTS* foi indicada pelo programa RegPrecise e a mutação desta região levou a perda do aumento da expressão destes genes em células crescidas em meios com nitrato ou glutamato (LUQUE-ALMAGRO *et al.*, 2017). O mesmo ocorre para *B. cenocepacia* H111 e *P. stutzeri* A1501 no qual os mutantes *ntrC*⁻ tiveram um decréscimo na expressão do gene *nasT* (LIU *et al.*, 2017b; YANG *et al.*, 2021).

6.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROMOTOR DURANTE A NODULAÇÃO

Os resultados observados nos ensaios de atividade dos promotores em vida livre sugerem a participação de NtrC na regulação dos genes da via assimilatória (*narK*, *nrtABC* e *pNit*). Para verificar se esta regulação também ocorre durante a simbiose, a atividade destes promotores também foi avaliada em nódulos e primórdios de nódulos de *P. vulgaris* inoculado com as estirpes selvagem e mutante *ntrC*⁻ de *S. fredii* NGR234 carregando as fusões com GFP. Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia descrita no item 5.13, com a adição da coleta de primórdio de nódulos (Figura 10).

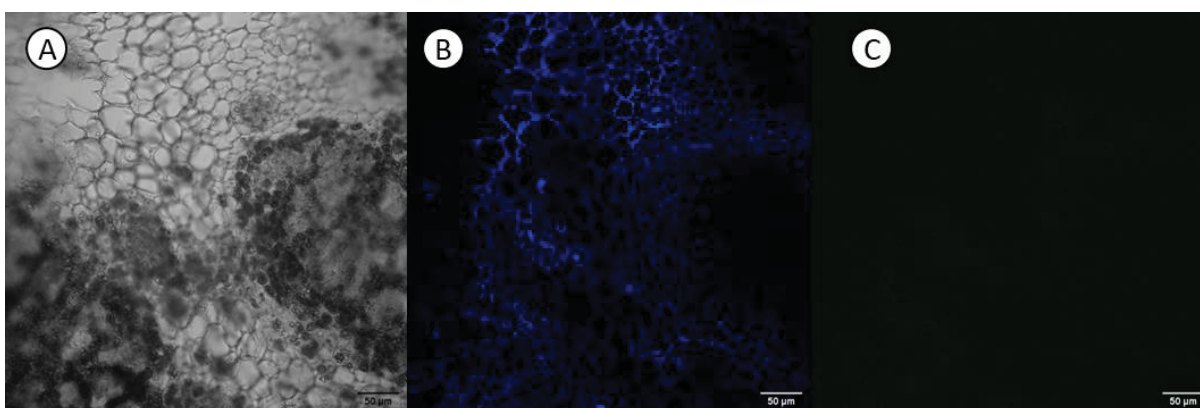
FIGURA 10 – RAIZ DE *P. vulgaris* EM SIMBIOSE COM *S. fredii* NGR234 APRESENTANDO NÓDULOS E PRIMÓRDIOS DE NÓDULOS



Setas amarelas indicam os nódulos; seta vermelhas indicam primórdios de nódulos.
FONTE: O autor (2023)

Uma estirpe contendo apenas o plasmídeo pPROBE-GT vazio foi crescida e inoculada em *P. vulgaris*, servindo como grupo controle, demonstrando que a fluorescência de GFP não é emitida na ausência de um promotor, como pode ser observado na figura 11. A primeira imagem apresenta o córtex do nódulo em contraste de interferência diferencial (DIC), na imagem B é possível observar a autofluorescência da parede celular em azul, e por fim, a imagem C gerada para detecção da fluorescência verde de GFP.

FIGURA 11 – SECÇÕES DE NÓDULOS DE *P. vulgaris* cv. BAT93 INOCULADAS COM *S. fredii* NGR234



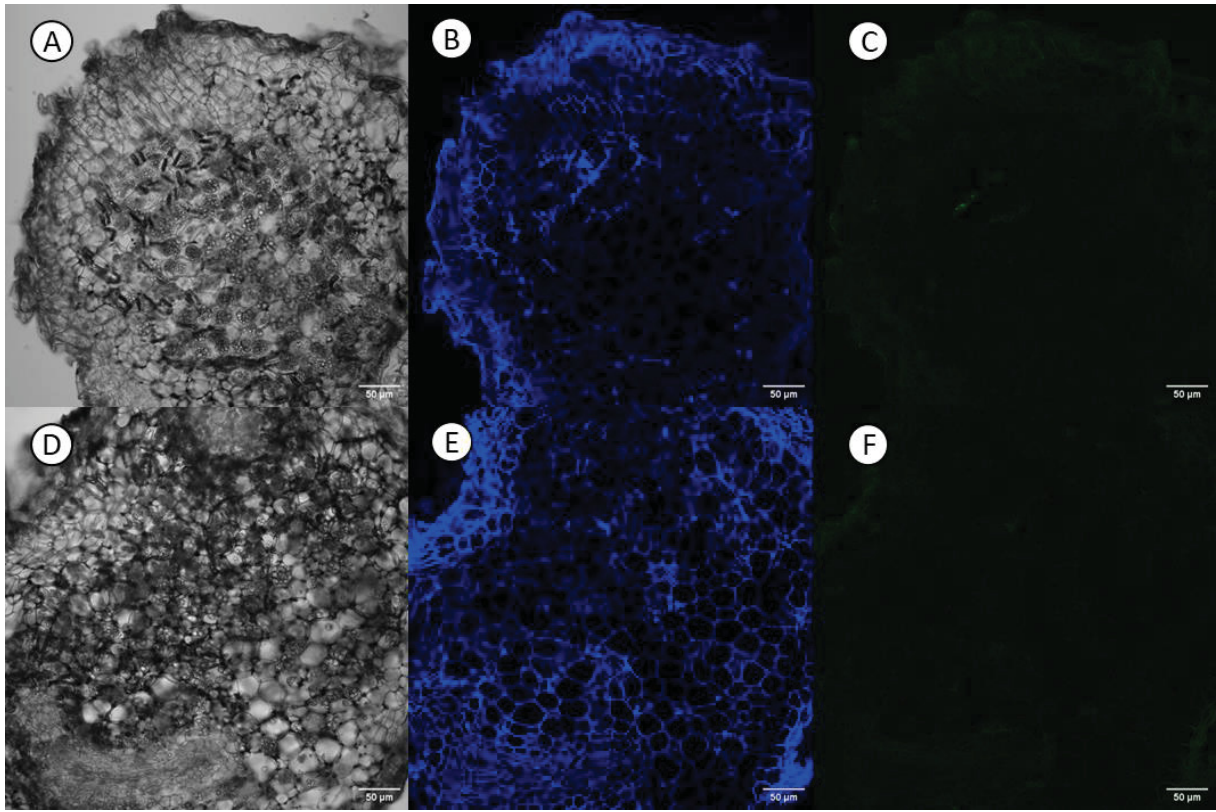
A) Imagem gerada em contraste de interferência diferencial (DIC); B) Detecção com filtro DAPI; C) Detecção com filtro GFP. A barra de escala indica 50 µm.

FONTE: O autor (2023)

6.4.1 Atividade de promotores de genes da via assimilatória em nódulos

Os resultados obtidos para a atividade da região promotora dos genes que codificam para transportadores (*narK* e *nrtABC*) durante o estágio inicial de nodulação, sugerem que estes genes não estão expressos em primórdios de nódulos, dado que a fluorescência de GFP não foi observada nas estirpes de NGR234 selvagem e mutante *ntrC*⁻. As figuras 12 e 13 ilustram esse resultado.

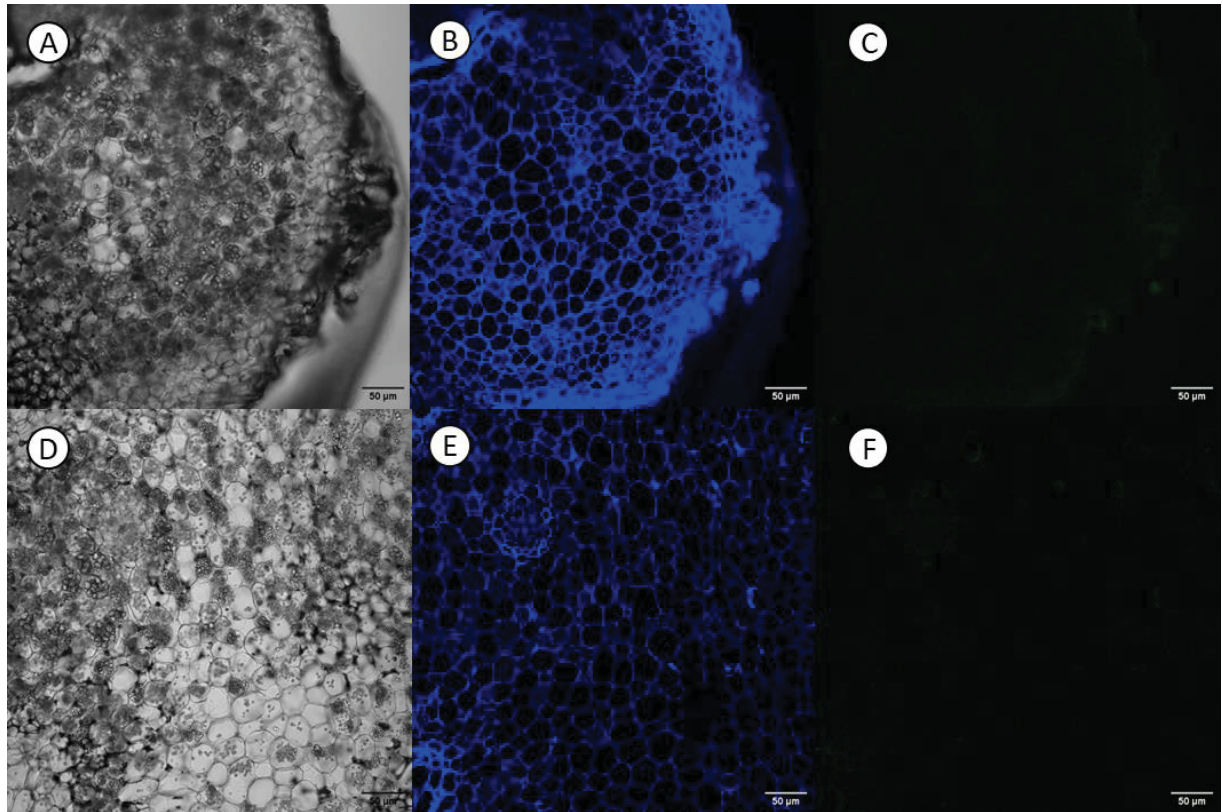
FIGURA 12 – SECÇÕES DE PRIMÓRDIOS DE NÓDULOS DE *P. vulgaris* cv. BAT93 INOCULADAS COM *S. fredii* NGR234 CONTENDO A CONSTRUÇÃO *pnarKpGT'*



A-C) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP de plantas inoculadas com NGR234 selvagem; D-F) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP de plantas inoculadas com NGR234 Δ *ntrC*. A barra de escala indica 50 μ m.

FONTE: O autor (2023)

FIGURA 13 – SECÇÕES DE PRIMÓRDIOS DE NÓDULOS DE *P. vulgaris* cv. BAT93 INOCULADAS COM *S. fredii* NGR234 CONTENDO A CONSTRUÇÃO *pnrtABCpGT'*

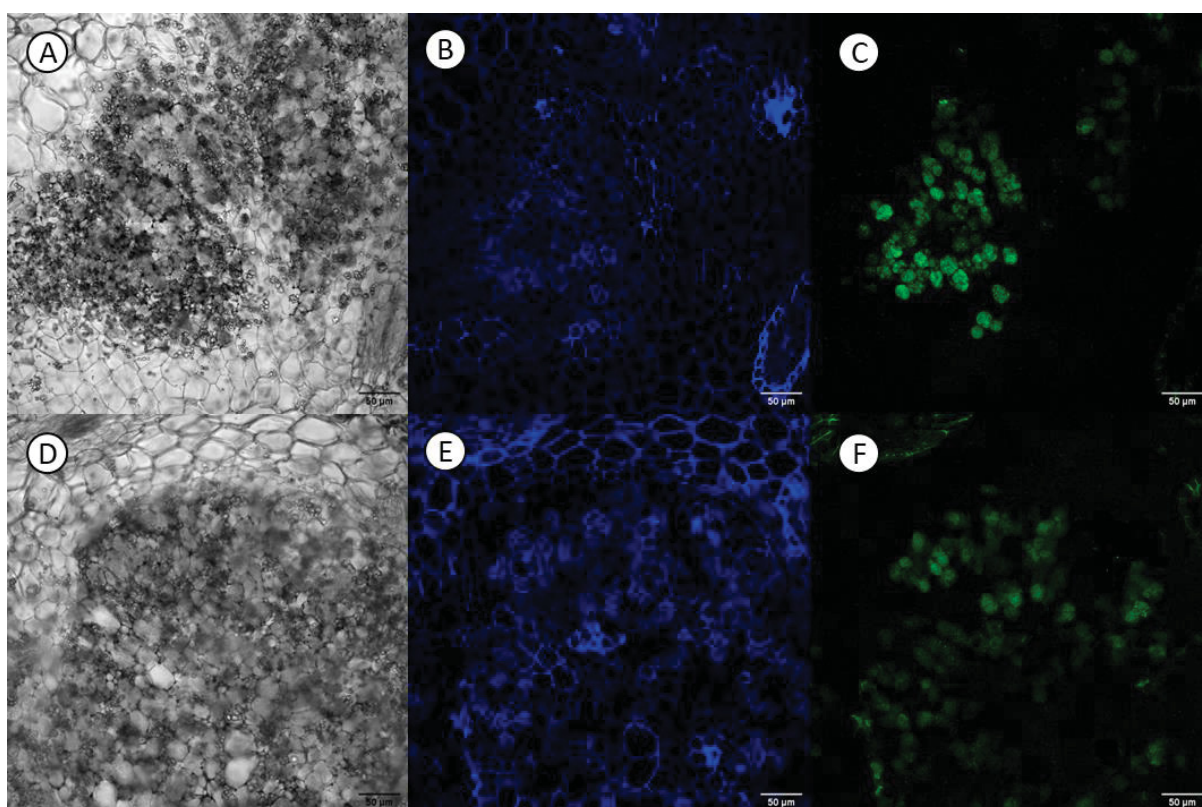


A-C) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP de plantas inoculadas com NGR234 selvagem; D-F) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP de plantas inoculadas com NGR234 $\Delta ntrC$. A barra de escala indica 50 μ m.

FONTE: O autor (2023)

Embora os resultados em primórdios não indiquem atividade dos promotores, as imagens obtidas a partir de nódulos maduros das estirpes selvagem e mutante *ntrC* sugerem que há expressão dos transportadores nestas condições, uma vez que a fluorescência de GFP foi detectada em ambos os casos, independente da estirpe (Figuras 14 e 15).

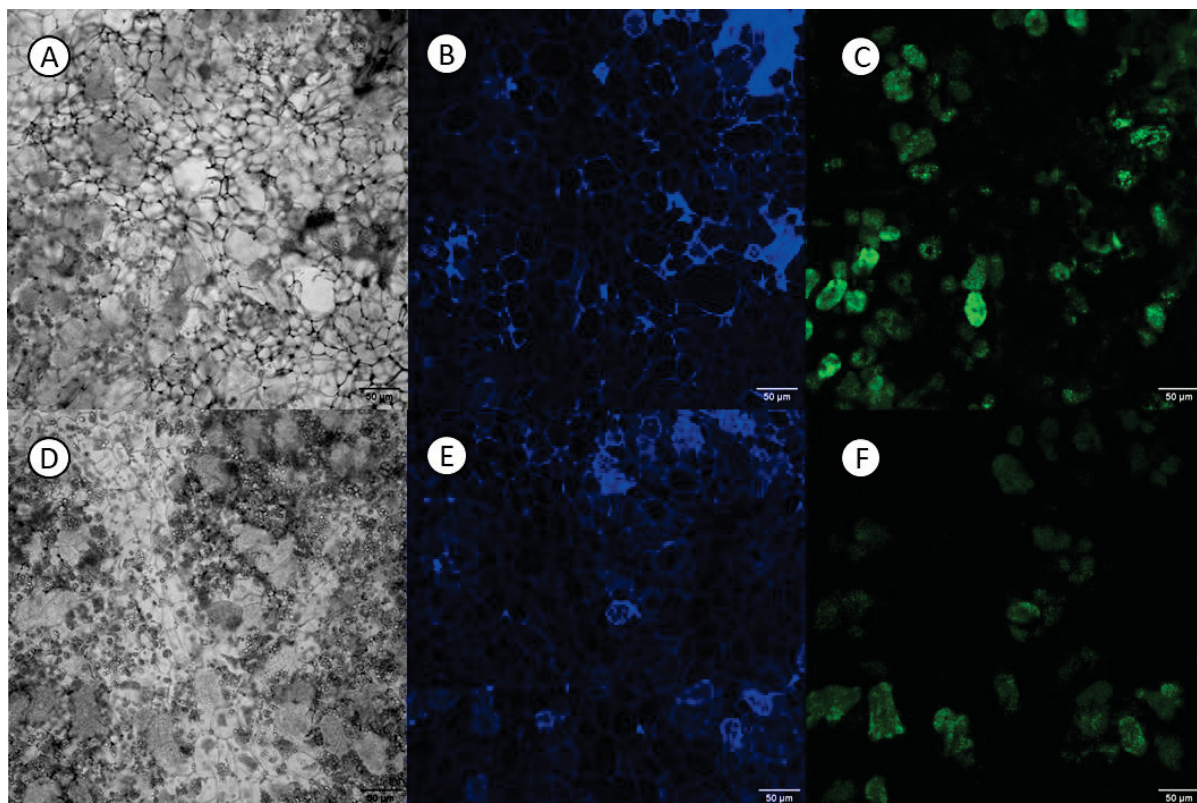
FIGURA 14 – SECÇÕES DE NÓDULOS DE *P. vulgaris* cv. BAT93 INOCULADAS COM *S. fredii* NGR234 CONTENDO A CONSTRUÇÃO *pnarKpGT*'



A-C) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP de plantas inoculadas com NGR234 selvagem; D-F) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP de plantas inoculadas com NGR234 Δ *ntrC*. A barra de escala indica 50 μ m.

FONTE: O autor (2023)

FIGURA 15 – SECÇÕES DE NÓDULOS DE *P. vulgaris* cv. BAT93 INOCULADAS COM *S. fredii* NGR234 CONTENDO A CONSTRUÇÃO *pnrtABCpGT'*



A-C) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP de plantas inoculadas com NGR234 selvagem; D-F) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP de plantas inoculadas com NGR234 $\Delta ntrC$. A barra de escala indica 50 μ m.

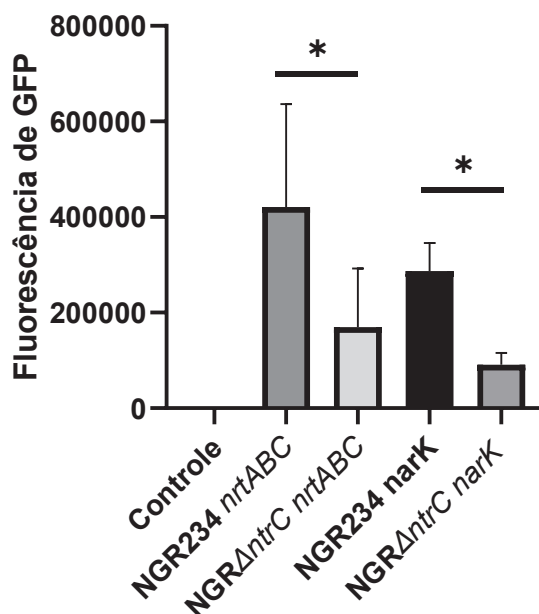
FONTE: O autor (2023)

A partir dos resultados de imagem foi realizada a quantificação de fluorescência utilizando o *software* imageJ como descrito no item 5.13.4. Após a quantificação, os dados foram analisados quanto a sua normalidade por meio do método de Shapiro-Wilk. Os resultados do teste informam a distribuição normal ($p > 0,05$) para o gene *nark* para as estirpes selvagem e mutante *ntrC*⁻, enquanto para *nrtABC* a normalidade foi confirmada apenas para a estirpe selvagem. Sendo assim, para comparação das fluorescências emitidas pelas diferentes estirpes contendo a construção *pnarkKpGT'* foi utilizado um teste t *student*, informando um $p < 0,05$ e, portanto, as fluorescências entre estirpe selvagem e mutante nestes nódulos são estatisticamente diferentes.

Já no caso das estirpes contendo a construção *pnrtABCpGT'* o teste de normalidade apresentou $p > 0,05$ apenas para a estirpe selvagem, desta forma os grupos foram comparados utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Os

resultados demonstram que há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a fluorescência das estirpes selvagem e mutante em nódulos maduros. Assim, a atividade dos promotores de *narK* e *nrtABC* observada em nódulos foi menor na estirpe mutante *ntrC*⁻, sugerindo que a expressão destes genes depende parcialmente de NtrC durante a simbiose. O gráfico 5 resume este resultado.

GRÁFICO 5 – FLUORESCÊNCIA MÉDIA PARA A FUSÃO *pnarKpGT'* e *pnrtABCpGT'* EM NÓDULOS DE *P. vulgaris*.

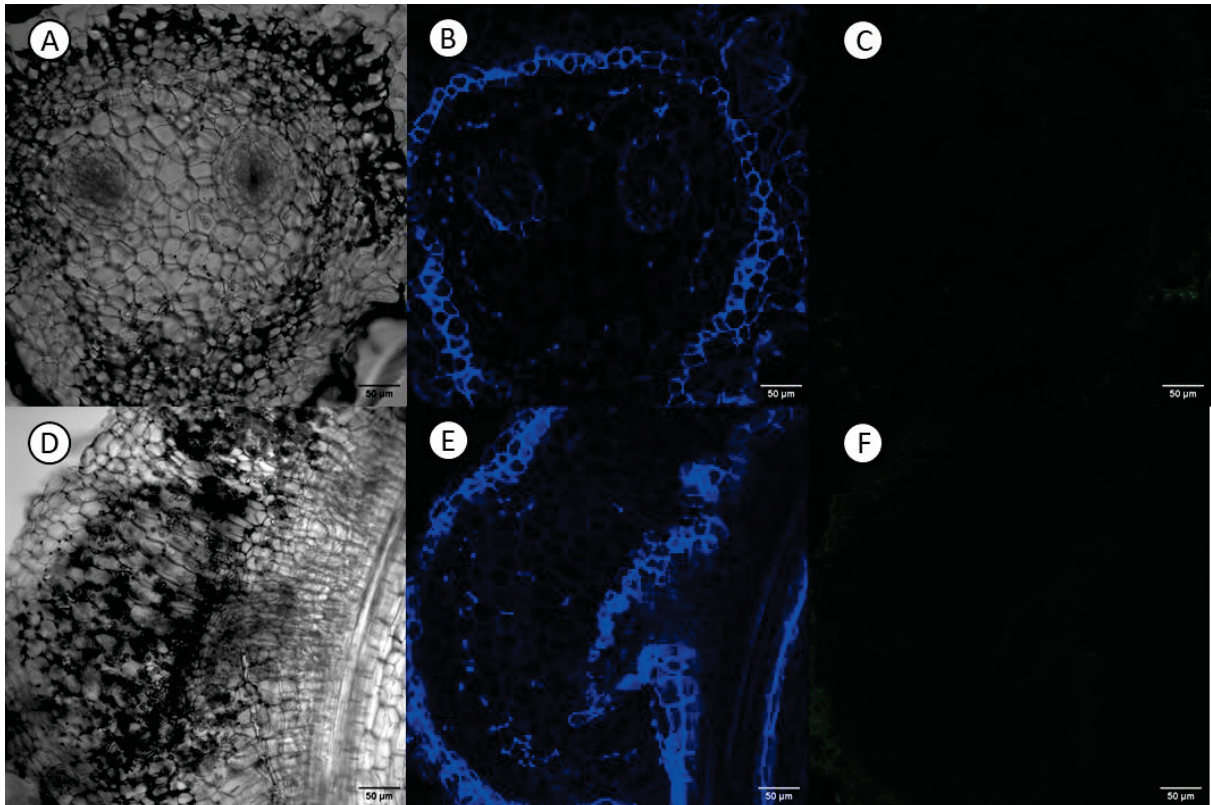


Os dados são referentes as médias da fluorescência \pm o desvio padrão para as estirpes selvagem e mutante *ntrC*⁻ de NGR234. * representa diferença significativa para $\alpha = 0,05$.

FONTE: O autor (2023)

A fluorescência de primórdios e nódulos também foi avaliada para o operon denominado pNit. Da mesma forma que os transportadores, a atividade da região promotora deste operon não foi detectada em primórdios de plantas inoculadas com as estirpes selvagem ou mutante *ntrC*⁻ de NGR234 (Figura 16).

FIGURA 16 – SECÇÕES DE PRIMÓDIOS DE NÓDULOS DE *P. vulgaris* cv. BAT93 INOCULADAS COM *S. fredii* NGR234 CONTENDO A CONSTRUÇÃO pNitpGT'

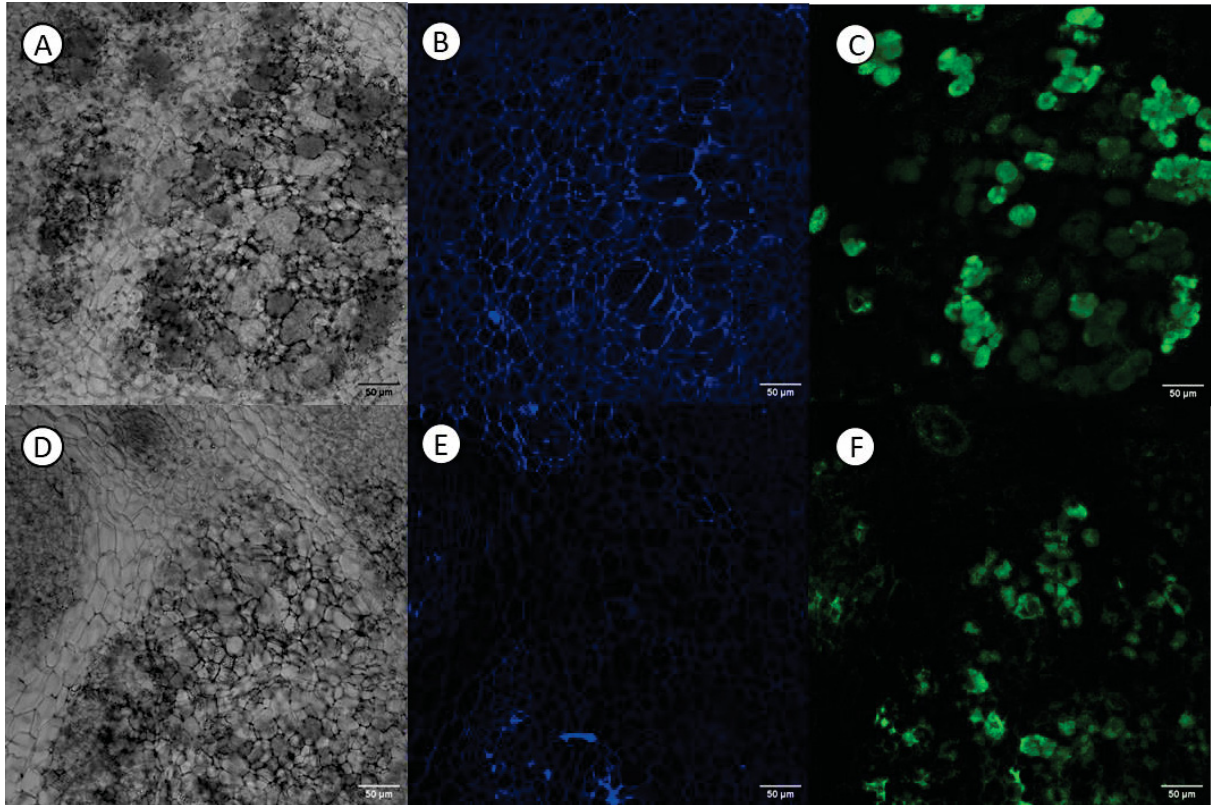


A-C) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP de plantas inoculadas com NGR234 selvagem; D-F) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP de plantas inoculadas com NGR234 Δ ntrC. A barra de escala indica 50 μ m.

FONTE: O autor (2023)

Já nos nódulos, a fluorescência foi observada para plantas inoculadas com ambas as estirpes (Figura 17) e a quantificação foi realizada.

FIGURA 17 – SECÇÕES DE NÓDULOS DE *P. vulgaris* cv. BAT93 INOCULADAS COM *S. fredii* NGR234 CONTENDO A CONSTRUÇÃO pNitpGT'

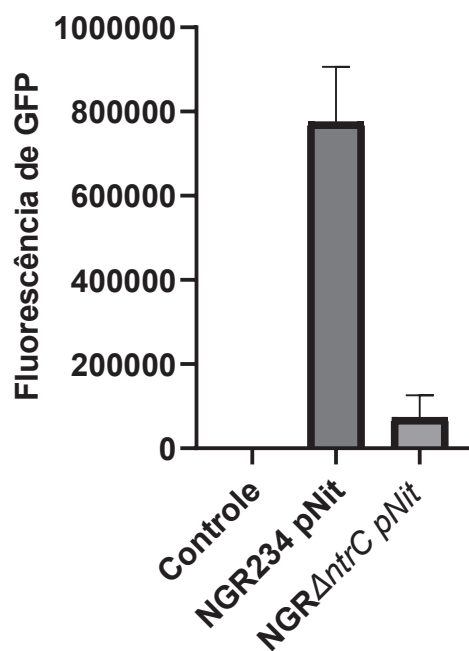


A-C) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP de plantas inoculadas com NGR234 selvagem; D-F) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP de plantas inoculadas com NGR234 Δ ntrC. A barra de escala indica 50 μ m.

FONTE: O autor (2023)

Os dados obtidos pela medição de fluorescência foram avaliados e o teste de normalidade indicou que a estirpe selvagem segue a distribuição normal ($p > 0,05$) diferente do que foi obtido para a estirpe mutante ($p < 0,05$). Desta forma, foi empregado o teste de Mann-Whitney, o qual entregou um $p < 0,05$, sugerindo que há diferenças na fluorescência emitida entre as estirpes selvagem e o mutante *ntrC*- de NGR234 em nódulos maduros (Gráfico 6).

GRÁFICO 6 – EXPRESSÃO DAS FUSÕES pNiptGT EM NÓDULOS DE *P. vulgaris*

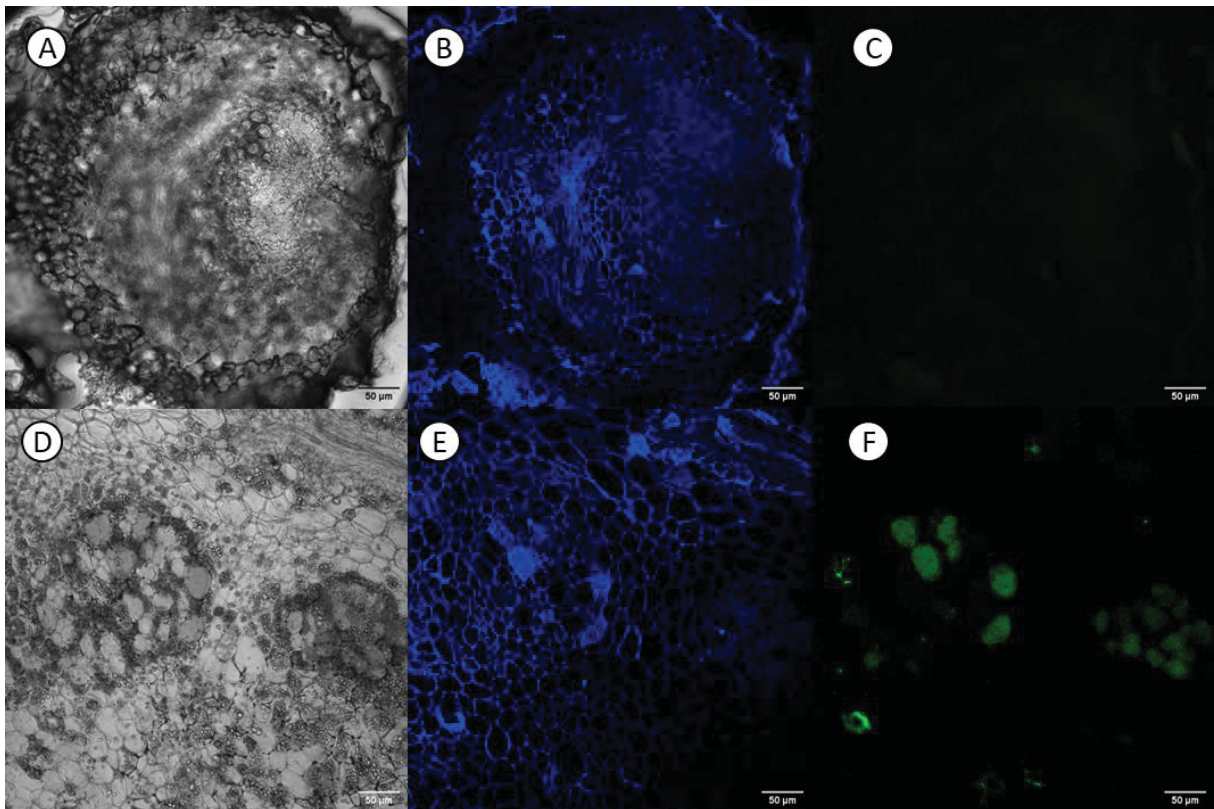


Os dados são referentes as médias da fluorescência \pm o desvio padrão para as estirpes selvagem e mutante *ntrC*- de NGR234. * representa diferença significativa para $\alpha = 0,05$.

FONTE: O autor (2023)

Por fim, a atividade na região promotora do operon *nasTS* foi avaliada apenas para a estirpe selvagem, dado que a regulação em vida livre indicou ausência de efeitos de NtrC sob este promotor. A fluorescência de GFP foi observada apenas em nódulos em uma média de intensidade de 101844 ± 28512 de modo semelhante aos outros promotores avaliados (Figura 18).

FIGURA 18 – SECÇÕES DE PRIMÓRDIO E NÓDULOS DE *P. vulgaris* cv. BAT93 INOCULADAS COM *S. fredii* NGR234 SELVAGEM CONTENDO A CONSTRUÇÃO *pnasTpGT*.



A-C) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP em primórdios de nódulos; D-F) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP em nódulos maduros. A barra de escala indica 50µm.

Fonte: O autor (2023)

Este perfil de expressão observado em nódulos se assemelha aos resultados obtidos para simbiose entre diferentes rizóbios e plantas hospedeiras. A exemplo de análises de transcriptoma de bacterióides de *Rhizobium leguminosarum* em ervilha e feijão, no qual foi observado um aumento na expressão de genes que codificam para transporte e redução de nitrato e nitrito em cerca de 10 a 30 vezes, enquanto os genes que codificam para os reguladores NtrB, NtrC e NasT apresentaram aumento de expressão em até 4 vezes. Em nódulos de feijão a expressão destes genes foi detectada embora não tenha sido observado um aumento de expressão como ocorreu em ervilha (GREEN *et al.*, 2019).

Análises de microarranjo para bacterióides de *B. diazoefficiens* em soja em comparação a culturas de vida livre crescidas em MM-glicerol indicaram a repressão de *nrtA* e *narK* (CHANG *et al.*, 2007). Por outro lado, uma segunda avaliação realizada por Pessi *et al.* (2007) também em comparação com hábito de vida livre, mas em outra fonte nutricional (meio peptona-arabinose) evidenciou um aumento de expressão de *nrtAB* e um decréscimo para os genes que codificam para os reguladores *ntrBC* e *nasST*. Já os dados apresentados por Franck *et al.* (2014) mostram um aumento de expressão de *nasA* que codifica para a nitrato redutase assimilatória em bacterióides comparado a células crescidas em meio HM-arabinose. Entretanto em uma análise utilizando estes três perfis de expressão, os genes da via assimilatória não apresentaram um aumento de expressão considerável e, portanto, foram classificados como não centrais para simbiose (FRANCK *et al.*, 2014).

Em comparações de bacterióides de *Azorhizobium caulinodans* ORS571 obtidos de nódulos de *Sesbania rostrata*, genes para transportadores de nitrato e nitrito apresentaram um leve aumento de expressão em nódulos, embora não tenham sido considerados diferencialmente expressos estatisticamente em relação a células crescidas em vida livre com meio mínimo, o mesmo ocorre para o gene da enzima nitrito redutase. Enquanto, para os genes da enzima nitrato redutase e dos reguladores NtrBC foi observado uma leve repressão (TSUKADA *et al.*, 2009). Em contrapartida, a partir de análise do perfil proteico de nódulos, o regulador NtrC foi detectado em bacterióides de *S. meliloti* provenientes de nódulos de *Medicago truncatula* (DJORDJEVIC *et al.*, 2003). Da mesma forma, a avaliação do RNA-seq indicou a expressão dos genes *ntrBC* na zona de fixação de nitrogênio do nódulo.

Além destes reguladores, os genes *narB*, *nirB* e *nirD* que codificam para nitrato e nitrito redutase, também tiveram sua expressão aumentada na zona de fixação de nódulos de *M. truncatula* (ROUX *et al.*, 2014). Contudo, apesar deste aumento de expressão dos genes estruturais da via assimilatória, a mutação de *nirB* e *narB* em *S. meliloti*, não afetou o processo simbiótico (RUIZ *et al.*, 2019).

Utilizando como base a expressão em bacterióides, é notável a frequente expressão de genes associados a via assimilatória. Este registro, aliado ao aumento de expressão de genes de transporte e redução de nitrato da planta hospedeira, em especial na região de fixação, pode indicar que sob certas condições há uma concentração significativa de nitrato em nódulos (GREEN *et al.*, 2019; MURRAY *et al.*, 2017; ROUX *et al.*, 2014).

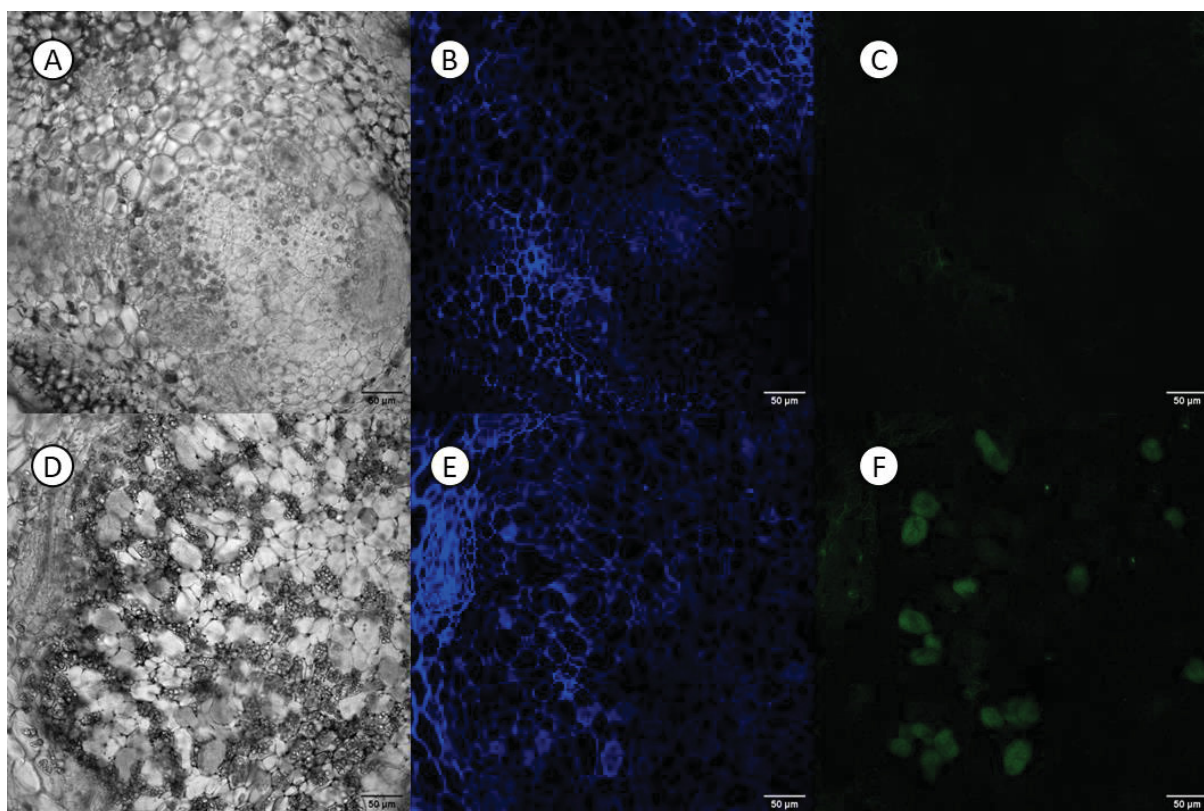
Apesar dos níveis de expressão encontrados para absorção e redução de nitrato em bacterióides e na planta hospedeira, os possíveis efeitos da ação destes genes não estão esclarecidos, dado que a ação do nitrato é comumente relacionada a inibição da nodulação e senescência de nódulos, através de um sistema complexo de sinalização da presença de nitrato, resultando no *feedback* negativo na regulação da simbiose (CABEZA *et al.*, 2014; MURRAY *et al.*, 2017).

Nesse sentido, Wheatley *et al.* (2020) propuseram uma classificação na qual os genes *nasA*, *nasD*, *nirD*, *narK*, *nasT* e transportadores de nitrato da família ABC, possivelmente *ntrABC*, são classificados como neutros em bacterióides e portanto a mutação destes genes teria um impacto mínimo na nodulação, ou ainda, resultaria numa vantagem adaptativa em um determinado ambiente, dado que não haveria gasto energético em vias metabólicas ou na expressão de genes que não são necessários. Por outro lado, levando em consideração solos onde a concentração de nitrato supera a de amônio e outros compostos nitrogenados (MILLER *et al.*, 2007), bactérias capazes de utilizar NO_3^- eficientemente podem apresentar uma maior sobrevivência do que bactérias incapazes de utilizar este composto de forma eficiente. Nestes casos, NtrC é necessário, já que rizóbios mutantes para *ntrC*, apresentam uma menor taxa de crescimento em meios contendo nitrato como fonte de nitrogênio.

6.4.2 Atividade dos promotores de genes da via dissimilatória em nódulos

Na avaliação dos promotores de genes associados à via de desnitrificação como *fixK* e operon *nap*, a atividade promotora se assemelhou aos outros genes avaliados, apresentando ausência de fluorescência durante as fases iniciais de desenvolvimento do nódulo e fluorescência de GFP em nódulos maduros. Em média *fixK* apresentou uma intensidade de 237142 ± 55644 e o operon *nap* 417413 ± 186697 , como pode ser observado nas imagens abaixo (Figuras 19 e 20).

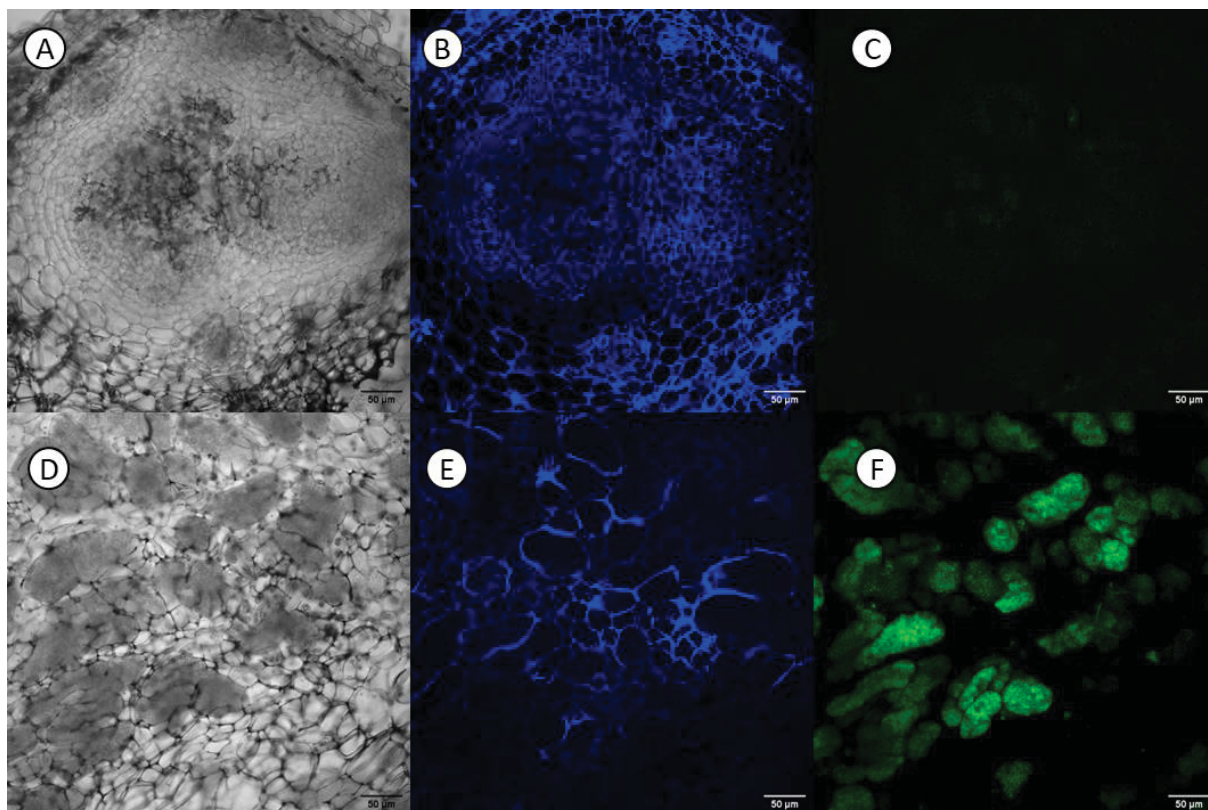
FIGURA 19 – SECÇÕES DE PRIMÓRDIOS E NÓDULOS DE *P. VULGARIS* CV. BAT93 INOCULADAS COM *S. fredii* NGR234 SELVAGEM CONTENDO A CONSTRUÇÃO *fixKpGT*



A-C) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP em primórdios de nódulos; D-F) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP em nódulos maduros. A barra de escala indica 50µm.

Fonte: O autor (2023)

Figura 20 – SECÇÕES DE PRIMÓRDIOS E NÓDULOS DE *P. vulgaris* cv. BAT93 INOCULADAS COM *S. fredii* NGR234 SELVAGEM CONTENDO A CONSTRUÇÃO *pnappGT*



A-C) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP em primórdios de nódulos; D-F) Imagens geradas em contraste de interferência diferencial (DIC), filtro DAPI e filtro GFP em nódulos maduros. A barra de escala indica 50µm.

Fonte: O autor (2023)

A transição do hábito de vida-livre para simbiose é acompanhada de uma série de alterações na expressão gênica. Estas alterações são coordenadas por diversos mecanismos, entre estes a regulação por oxigênio, o qual possui um papel regulatório central, dado que a concentração de O_2 diminui ao longo da nodulação até a fase de fixação de nitrogênio com condições próximas a anoxia, sendo estas condições necessárias devido ao efeito inibitório causado pelo oxigênio na enzima nitrogenase (RUTTEN; POOLE, 2019). Em contrapartida, a fixação de N é altamente custosa energeticamente, desta forma bacterióides suprem esta demanda energética por meio da ação de FixNOQP, um terminal oxidativo *cbb₃* de alta afinidade à O_2 necessário para respiração em microaerofilia em rizóbios (MARCHAL; VANDERLEYDEN; JANSSENS, 2000; PAREJO *et al.*, 2022; UDVARDI; POOLE, 2013).

Nesse sentido, a expressão de *fixK* em nódulos já foi relatada em *S. meliloti* por AMPE *et al.* (2003), CHANG *et al.* (2007) e ROUX *et al.* (2014), e em *B.*

diazoefficiens por CABRERA *et al.* (2021), NELLEN-ANTHAMATTEN *et al.* (1998) e PAREJO *et al.*, (2022). Sendo o regulador FixK conhecido por atuar na regulação de *fixNOPQ* e de outros genes associados a respiração e a desnitrificação (BOBIK; MEILHOC; BATUT, 2006; CABRERA *et al.*, 2021). Neste contexto, FixK é elencado como um possível regulador dos gene *nap* também em NGR234, uma vez que a sequência consenso TTG[A/C]-N6-[T/G]CAA (BONNET *et al.*, 2013), é encontrada na região promotora do operon, segundo o banco de dados RegPrecise.

O operon *nap*, juntamente com outro genes de denitrificação, foi descrito como um importante fator durante a simbiose de *Sinorhizobium fredii* CCBAU45436 com *Glycine max* (LIU *et al.*, 2017a), indicando que este operon está expresso em nódulos de soja. Além disso, em análises de transcriptoma de *Vigna unguiculata* e *Leucaena leucocephala*, as enzimas NapABC e NirK (nitrito e nitrito redutase periplásmica) apresentaram expressão aumentada em bacterióides de NGR234 (LI *et al.*, 2013). Em *S. meliloti*, a expressão do operon *nap* também foi reportada, embora neste caso a mutação deste operon não resultou em prejuízos na nodulação de *Medicago trunculata* (RUIZ *et al.*, 2022).

Desta forma, os resultados observados pela microscopia de nódulos de feijão BAT93, sugerem que a expressão do regulador FixK e da enzima nitrito redutase periplásmica (*napEFDABC*) é similar ao observado em outros organismos. Por fim, apesar do mutante *fixK*⁻ em NGR234 não ter sido obtido, é possível que a regulação de *nap* também seja mediada por FixK em NGR234.

6.5 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO MUTANTE *ntrC*⁻ NA SIMBIOSE

Além dos ensaios de expressão gênica para os hábitos de vida livre e simbiose, também foi realizado a análise dos possíveis efeitos da mutação de *ntrC* durante o processo de nodulação. Para isso as sementes de feijão BAT93 foram esterilizadas, germinadas e plantadas em jarros de Leonard. Nestas plantas foram inoculadas as estirpes selvagem, mutante *ntrC*⁻ e mutante *ntrC*⁻ complementada com o plasmídeo *pBCntrCpLAFR*, que expressa o gene *ntrC* a partir do seu próprio promotor. As plantas foram crescidas por três semanas e ao final deste período foi realizada a coleta e pesagem da parte aérea das plantas e nódulos (Tabela 1).

TABELA 1 – NODULAÇÃO de *Phaseolus vulgaris* por *S. fredii* NGR234 SELVAGEM, MUTANTE *ntrC*⁻ E COMPLEMENTADO

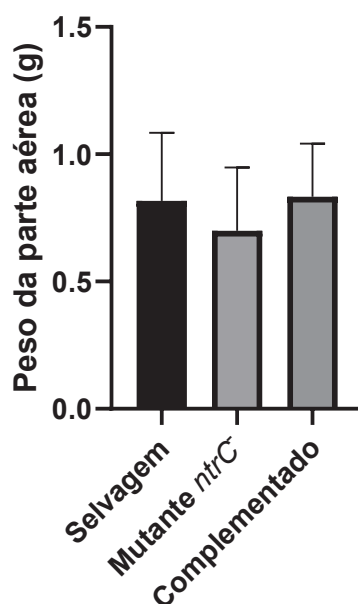
	Peso da parte aérea (g)		Número de nódulos		Peso de nódulos (g)	
	Soma total	Média ± desvio padrão	Soma total	Média ± desvio padrão	Soma total	Média ± desvio padrão
Selvagem	9,8	0,8167 ± 0,2682	150	12,5 ± 5,231	1,42	0,1183 ± 0,05915
Mutante <i>ntrC</i> ⁻	8,9	0,6992 ± 0,2496	23	1,917 ± 2,021	0,373	0,03108 ± 0,07887
Complementado	10	0,8333 ± 0,2087	100	8,333 ± 4,638	0,789	0,06575 ± 0,04144

Os dados são referentes soma e as médias de 12 plantas ± o desvio padrão para cada tratamento.

FONTE: O autor (2023)

O peso da parte aérea das plantas foi similar para os três tratamentos (selvagem, mutante *ntrC*⁻ e complementado). Os dados foram testados quanto a sua normalidade e apresentaram distribuição do tipo normal (ou gaussiana) devido ao $p > 0,05$. Assim, para avaliar as diferenças entre os tratamentos foi realizado o teste ANOVA *one-way* resultando em um valor de $p > 0,05$ e valor de $F(2,33) = 1,083$. Portanto, conclui-se que não há diferença significativa entre as médias calculadas para nenhum dos três tratamentos. Os dados obtidos podem ser visualizados no gráfico 7.

GRÁFICO 7 – PESO MÉDIO (g) DA PARTE AÉREA DAS PLANTAS PARA OS TRÊS TRATAMENTOS



Os dados são referentes as médias \pm o desvio padrão de doze repetições independentes.
 FONTE: O autor (2023)

O número de nódulos observado em plantas inoculadas com o mutante *ntrC* foi significativamente menor que o observado para a estirpe selvagem, sugerindo que a proteína NtrC é necessária para o processo de nodulação em *S. fredii* NGR234. Além disso, a expressão plasmidial de *ntrC* restaurou o fenótipo da estirpe mutante. O peso dos nódulos foi proporcional ao número de nódulos de cada tratamento.

Para os dados referentes ao número e peso de nódulos a distribuição normal também foi avaliada. Os resultados podem ser observados na tabela 2.

TABELA 2 – RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA O TESTE DE SHAPIRO-WILK PARA NÚMERO E PESO DE NÓDULOS

	Número de nódulos		Peso dos nódulos	
	Estatística W	Valor de p	Estatística W	Valor de p
Selvagem	0,916	0,2546	0,8403	0,0279*
Mutante <i>ntrC</i>	0,8094	0,012*	0,4351	<0,0001*
Complementado	0,953	0,6811	0,8992	0,1551

FONTE: O autor (2023)

Dados marcados com * apresentam diferença significativa para $\alpha=0,05$

Como pode ser observado na tabela acima para a análise de número de nódulos, as estirpes selvagem e complementada apresentaram um valor de $p > 0,05$ e, portanto, apresentam uma distribuição do tipo normal, enquanto a estirpe mutante não segue este tipo de distribuição dado que possui um valor de $p < 0,05$. No caso de peso dos nódulos, as estirpes selvagem e mutante não apresentaram distribuição do tipo normal devido ao valor de $p < 0,05$. O mesmo não ocorre para a estirpe complementada ($p > 0,05$).

Uma vez que a distribuição de parte dos dados não é do tipo gaussiana para as análises posteriores, foi escolhido o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Desta forma, o resultado do teste indicou para ambos os índices, número e peso dos nódulos, uma diferença significativa entre pelo menos um dos tratamentos (selvagem, mutante *ntrC*⁻ e complementado), dado o valor de $p < 0,0002$ e $p < 0,0001$ respectivamente.

Para verificar entre quais tratamentos esta diferença indicada pelo teste de Kruskal-Wallis ocorre, foi realizado o teste de *post-hoc* de Dunn para dados não-paramétricos. Os resultados obtidos podem ser visualizados na tabela 3.

TABELA 3 – RESUMO DAS COMPARAÇÕES DOIS A DOIS PELO TESTE DE *POST-HOC* DE DUNN PARA NÚMERO E PESO DOS NÓDULOS

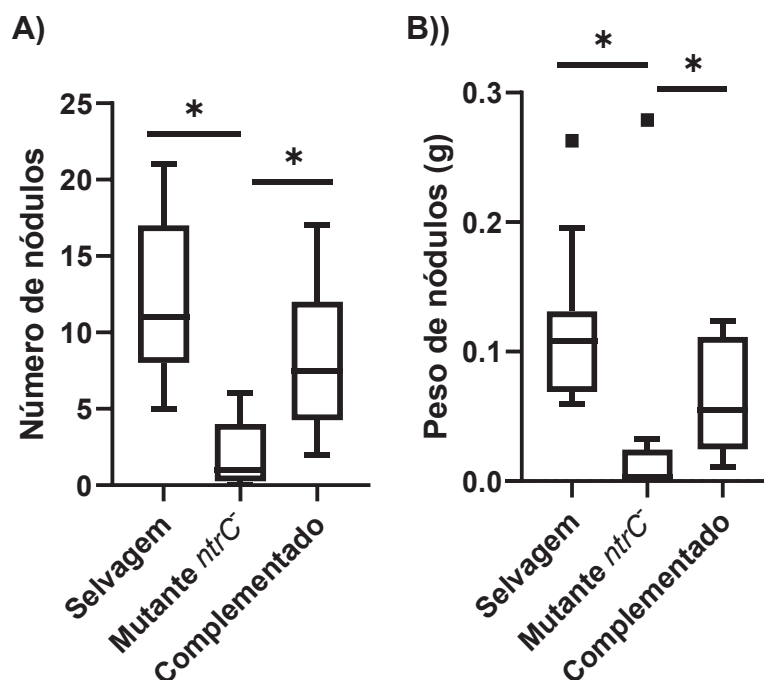
Número / Peso	Diferença entre as médias	Valor de p
Selvagem vs. Mutante <i>ntrC</i> ⁻	19,42 / 17,79	$< 0,0001^* / 0,0001^*$
Selvagem vs. Complementado	6,083 / 7,208	0,4674 / 0,2808
Mutante <i>ntrC</i> ⁻ vs. Complementado	-13,33 / -10,58	$0,0056^* / 0,0001^*$

FONTE: O autor (2023)

Dados marcados com * apresentam diferença significativa para $\alpha = 0,05$

Os resultados obtidos pelo teste de Dunn indicam que as diferenças observadas ocorrem entre o tratamento com a estirpe mutante *ntrC*⁻ e os tratamentos com as estirpes selvagem e complementado para os índices número e peso dos nódulos devido aos valores de $p > 0,05$. Estes resultados também podem ser observados graficamente pela análise dos gráficos *boxplot* (Gráficos 8), nos quais os dados de número e peso de nódulos se concentram em valores abaixo do primeiro quartil em comparação aos tratamentos com as estirpes selvagem e complementada.

GRÁFICO 8 – BOXPLOT PARA NÚMERO E PESO DE NÓDULOS



Dados marcados com * apresentam diferença significativa para $\alpha=0,05$. ■: Valores discrepantes (outliers)

FONTE: O autor (2023)

De modo geral, entre dados obtidos para número e peso de nódulos as plantas inoculadas com a estirpe mutante apresentaram os menores valores. As análises estatísticas realizadas para comparação dos tratamentos confirma essa observação, demonstrando que as diferenças obtidas entre plantas inoculadas com a estirpe mutante *ntrC*⁻ e as inoculadas com as estirpe selvagem e complementada não são devido ao acaso, o que sugere que a ausência de gene *ntrC* interfere na eficiência de nodulação da raiz de feijões BAT93. Este resultado é reforçado pela análise do tratamento com a estirpe complementada, na qual a presença do gene *ntrC* foi capaz de induzir o retorno ao fenótipo selvagem, visto que entre os tratamentos selvagem e complementado não houve diferenças estatisticamente significativas.

Entretanto, apesar do menor número de nódulos nas plantas inoculadas com o mutante *ntrC*⁻, não houve alterações significativas no peso da parte aérea da planta. Sugerindo que a fixação biológica de nitrogênio não foi afetada pela ausência do gene *ntrC*. Desta forma, percebe-se que os mutantes *ntrC* possuem fenótipo de fixação biológica (Fix⁺) e de nodulação (Nod⁺).

Por outro lado, a mutação do gene *ntrC* em outros rizóbios levou a resultados de fenótipo de nodulação diferentes dos observados em NGR234. A mutação em *B. diazoefficiens* não apresentou resultados significativos para número e peso de nódulos, assim como peso da parte aérea após quatro semanas de nodulação em soja (*Glycine max* [L.]) (MARTIN; CHAPMAN; CHELM, 1988a). De modo semelhante, em *S. meliloti* a ausência de NtrC funcional levou ao fenótipo de nodulação sem diferenças significativas em comparação com a estirpe selvagem (SZETO *et al.*, 1987). Ainda de acordo com estudos realizados em *R. Etli*, mutantes *ntrC* mostraram uma invasão mais rápida da raiz em feijão-comum (*P. vulgaris*), além de apresentar um maior acúmulo de N fixado do que em comparação à estirpe selvagem (PATRIARCA; TATÈ; IACCARINO, 2002).

Diferente do que foi observado nos resultados comentados acima, em *P. phymatum* a mutação de *ntrB* resultou em menor número de nódulos, porém com um maior peso comparado a estirpe selvagem. Já a atividade da nitrogenase apresentou uma redução de 36%, embora não fosse estatisticamente significativo. Estes resultados indicam que *ntrB*, do sistema de dois componentes *ntrBC*, desempenha um papel complementar no estabelecimento da simbiose de *P. phymatum* com feijão (LARDI *et al.*, 2018). De modo semelhante, testes de INSeq (*Insertion sequencing*) em *Rhizobium leguminosarum* classificaram diferentes genes essenciais ao longo de estágios distintos da simbiose (Crescimento na rizosfera, ligação a raiz, nodulação e diferenciação em bacterióide). Entre os 390 genes elencados como necessários à nodulação competitiva está o sistema NtrBC, associados como fundamentais durante o crescimento na rizosfera, mas também ao longo dos estágios subsequentes (LEDERMANN; SCHULTE; POOLE, 2021; WHEATLEY *et al.*, 2020).

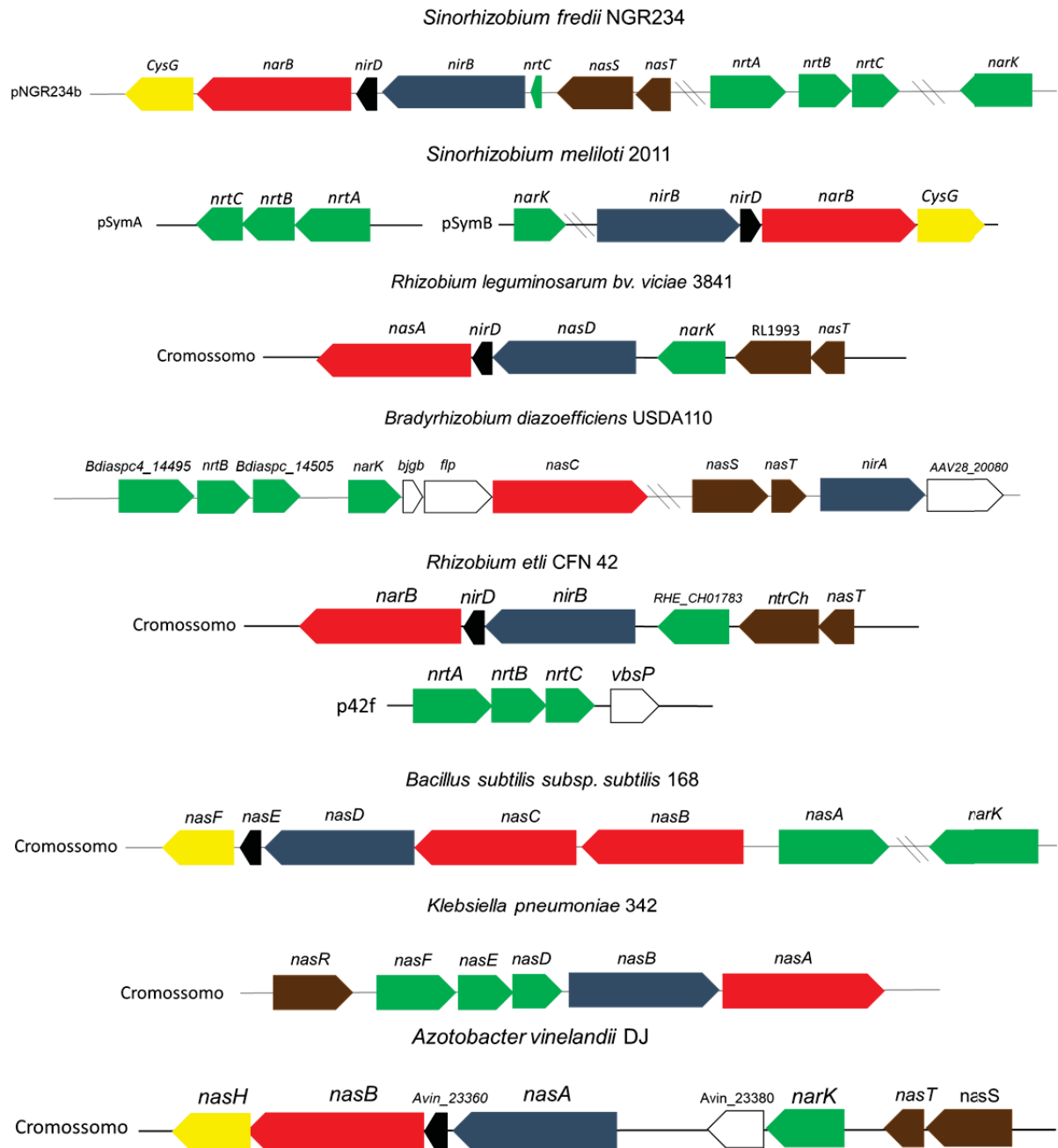
Portanto, os resultados observados em *S. fredii* NGR234, *R. leguminosaum* e *P. phymatum* sugerem que NtrBC podem ser importantes durante os estágios que antecedem a nodulação, como ao longo da sobrevivência na rizosfera e ligação a raiz. Sendo assim, a ausência de NtrC pode implicar em uma menor taxa de nodulação resultante de uma menor taxa de crescimento na rizosfera. Entre os genes que possivelmente poderiam levar a um prejuízo de crescimento em solos contendo nitrato, estão os genes da via assimilatória, uma vez que mutantes *ntrC*⁻ são

impossibilitados de reduzir nitrato e nitrito para incorporação a biomassa de maneira eficiente.

6.6 ORGANIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE NITRATO

Os avanços da genômica evidenciam a presença de genes associados a diversas vias do ciclo de nitrogênio em uma grande variedade de grupos de bactérias. Esse entendimento levou a superação da antiga classificação de microrganismos baseados apenas nos três processos clássicos: fixação biológica, nitrificação e desnitrificação, passando a incluir outros cinco fluxos de transformação do nitrogênio, entre estes, a assimilação de nitrato/nitrito (STEIN; KLOTZ, 2016). Para além disto, análises de diferentes genomas mostram a presença de vias metabólicas de nitrogênio de forma completa ou incompleta. A exemplo da classe das Alphaproteobacteria, no qual a via de assimilação de nitrato/nitrito é comumente encontrada incompleta, possivelmente pelo número de genes que compõe a via ou por estes não estarem agrupados. Por outro lado, a via de desnitrificação tende a ser predominantemente completa neste grupo (ALBRIGHT *et al.*, 2019). Apesar disso, a via assimilatória em *S. fredii* NGR234 é encontrada completa e com os genes agrupados, esta organização também é observada em *Sinorhizobium meliloti* 2011 no plasmídeo pSymB, embora os genes do sistema de transporte NrtABC estejam presentes no pSymA. Já em *B. diazoefficiens* os genes que codificam para nitrato e nitrito redutase encontram-se em operons distintos, contudo apesar das diferenças na distribuição dos genes a regulação da via também ocorre por meio de NtrC assim como em *S. fredii* e *S. meliloti* (FRANCK *et al.*, 2015; LÓPEZ *et al.*, 2017). A figura 21 mostra estes arranjos e de outros tipos de bactérias, incluindo genes que codificam para enzimas catalíticas, transportadores e reguladores que participam da assimilação de nitrato e nitrito, enquanto a figura 22 apresenta as diferentes configurações encontradas para os genes catalíticos e regulatórios associados ao crescimento em microaerofilia.

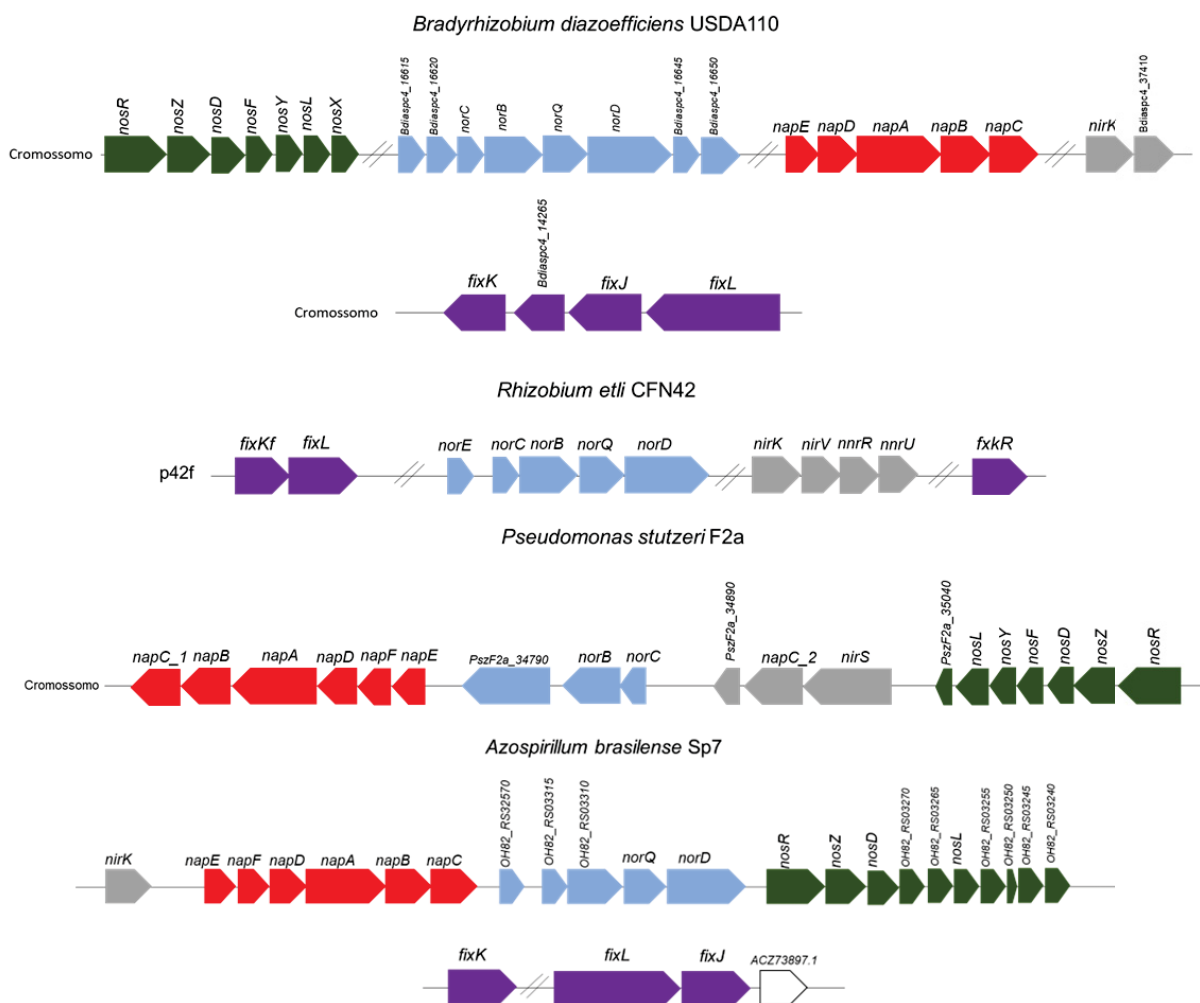
FIGURA 21 – ARRANJO GENÔMICO DE GENES ENVOLVIDOS NA ASSIMILAÇÃO DE NITRATO E NITRITO



Genes codificando para nitrato redutase (vermelho); nitrito redutase sub. maior (azul); nitrito redutase sub. menor (preto); transportadores (verde); reguladores (marrom) e proteínas possivelmente envolvidas na síntese do grupo sirohaemo (amarelo).

Fonte: O autor (2023)

Figura 22 – ARRANJO GENÔMICO DE GENES ENVOLVIDOS NA DESNITRIFICAÇÃO



Genes codificando para nitrito redutase periplásmica (vermelho); nitrito redutase (cinza); óxido nítrico redutase (azul); óxido nítrico redutase (verde) e reguladores (roxo).

Fonte: O autor (2023)

A via de desnitrificação não está completa em NGR234, visto que o operon *nos* não está presente, sendo, portanto, um desnitrificador incompleto. O mesmo ocorre para *Rhizobium etli* CFN42 pois apresenta apenas os genes responsáveis pela redução do nitrito e óxido nítrico (operons *nir* e *nor*). Em contrapartida, rizóbios como *S. meliloti* e *B. diazoefficiens* possuem todos os genes necessários para redução completa do nitrito a gás de dinitrogênio em condições de microaerofilia. Já no que diz respeito aos genes que regulam a via há uma maior variação na organização e presença de reguladores. Em *S. meliloti* e *B. diazoefficiens* tanto o sistema FixLJ como FixK são encontrados no seu genoma e a associação com a regulação de genes da desnitrificação foi descrita (BOBIK; MEILHOC; BATUT, 2006; MESA *et al.*, 2003). No caso do *R. etli* apenas os genes *fixL* e *fixKf* são encontrados,

todavia o produto do gene *fxkR* atua na ativação transcricional de *fixKf* na ausência de FixJ. Em *R. leguminosarum* bv. *viciae* os três reguladores estão presentes (*fixL*, *fixJ* e *fxkR*) e ensaios de complementação em demonstraram que o gene *fxkR* de *R. leguminosarum* é capaz substituir o controle transcricional em *R. etli* (ZAMORANO-SÁNCHEZ *et al.*, 2012). No entanto, em NGR234, os genes que codificam para o sistema FixLJ não estão presentes, sendo encontrado apenas o possível regulador FixK no megaplasmídeo, desta forma a cadeia de regulação da via de desnitrificação e de outros genes associados ao crescimento em baixas concentrações de O₂ não está completamente esclarecida, embora os resultados obtidos por este trabalho indiquem a regulação do operon *nap* durante o processo simbiótico.

7 CONCLUSÕES

- Ensaios de crescimento de *S. fredii* NGR234 em vida livre sugerem que a expressão dos promotores dos genes da via assimilatória (*narK*, *nrtABC* e *ntrCnirBDnarBCysG*) ocorreram na ausência de amônio e de forma dependente de NtrC. Já o promotor do operon *nasTS* apresentou expressão constitutiva.
- Em simbiose com *Phaseolus vulgaris* BAT93 (feijão comum), a atividade dos promotores dos genes da via assimilatória de *S. fredii* NGR234 foi observada apenas em nódulos maduros e a expressão total foi dependente de NtrC.
- Foram obtidas construções para obtenção de estirpes mutantes para os genes *narK*, *nrtABC*, *nasTS* e *fixK* de *S. fredii* NGR234.
- A atividade do promotor do operon *napEFDABC* foi observada durante a nodulação, sugerindo que há redução de nitrato em nódulos também pela via de desnitrificação em *S. fredii* NGR234.
- A atividade do promotor do gene *fixK* foi observada em nódulos maduros, sugerindo que este regulador pode estar relacionado com a simbiose em NGR234, assim como ocorre em outro rizóbios.
- Na ausência de NtrC foi observada uma menor capacidade de nodulação de feijão BAT93 por NGR234 comparada à nodulação pela estirpe selvagem. Além disso, com a complementação do mutante o fenótipo selvagem foi restaurado, sugerindo que em NGR234, NtrC é necessário para a nodulação eficiente.

8 REFERÊNCIAS

- A.BARTSEV, H.KOBAYASHI, W. J. Broughto. Plant Microbiology. *In: Plant Microbiology*. [S. l.: s. n.]. p. 20–33. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.4324/9780203506608>
- AHMED, Moddassir *et al.* Excessive use of nitrogenous fertilizers: an unawareness causing serious threats to environment and human health. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 24, n. 35, p. 26983–26987, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0589-7>
- ALBRIGHT, Michaeline B. N. *et al.* Comparative Genomics of Nitrogen Cycling Pathways in Bacteria and Archaea. **Microbial Ecology**, [S. l.], v. 77, n. 3, p. 597–606, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1239-4>
- AMPE, Frederic *et al.* Transcriptome analysis of Sinorhizobium meliloti during symbiosis. **Genome biology**, [S. l.], v. 4, n. 2, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-2-r15>
- ASSIS, Mateus Vinicius da Mata de. Análise Funcional do Gene ntrC de Sinorhizobium fredii NGR234. **Universidade Federal do Paraná**, [S. l.], p. 37, 2019.
- BARANY, Francis. Single-stranded hexameric linkers: a system for in-phase insertion mutagenesis and protein engineering. **Gene**, [S. l.], v. 37, n. 1–3, p. 111–123, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90263-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90263-X)
- BATISTA, Marcelo Bueno; DIXON, Ray. Manipulating nitrogen regulation in diazotrophic bacteria for agronomic benefit. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 603–614, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST20180342>
- BEDMAR, E. J.; ROBLES, E. F.; DELGADO, M. J. The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium Bradyrhizobium japonicum. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 141–144, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST0330141>
- BOBIK, Christine; MEILHOC, Eliane; BATUT, Jacques. FixJ: A major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of Sinorhizobium meliloti. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 188, n. 13, p. 4890–4902, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.00251-06>
- BONATO, Paloma *et al.* RNA-seq analyses reveal insights into the function of respiratory nitrate reductase of the diazotroph Herbaspirillum seropedicae. **Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 18, n. 8, p. 2677–2688, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13422>
- BONNET, Mariette *et al.* The structure of Bradyrhizobium japonicum transcription factor FixK 2 unveils sites of DNA binding and oxidation. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 288, n. 20, p. 14238–14246, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.465484>
- BROUGHTON, W. J. *et al.* Identification of Rhizobium plasmid sequences involved in recognition of Psophocarpus, Vigna, and other legumes. **The Journal of cell biology**, [S. l.], v. 102, n. 4, p. 1173–1182, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.102.4.1173>
- BROUGHTON, W. J.; DILWORTH, M. J. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. **The Biochemical journal**, [S. l.], v. 125, n. 4, p. 1075–1080, 1971. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj1251075>
- BURRIS, R. H.; ROBERTS, G. P. Biological Nitrogen Fixation. **Annual Review of Nutrition**,

[S. I.], v. 13, n. 1, p. 317–335, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.13.070193.001533>

CABEZA, Ricardo *et al.* An RNA sequencing transcriptome analysis reveals novel insights into molecular aspects of the nitrate impact on the nodule activity of *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, [S. I.], v. 164, n. 1, p. 400–411, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.113.228312>

CABRERA, Juan J. *et al.* The nitric oxide response in plant-associated endosymbiotic bacteria. **Biochemical Society Transactions**, [S. I.], v. 39, n. 6, p. 1880–1885, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST20110732>

CABRERA, Juan J. *et al.* An integrated biochemical system for nitrate assimilation and nitric oxide detoxification in *Bradyrhizobium japonicum*. **Biochemical Journal**, [S. I.], v. 473, n. 3, p. 297–309, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BJ20150880>

CABRERA, Juan J. *et al.* Dissection of FixK2 protein–DNA interaction unveils new insights into *Bradyrhizobium diazoefficiens* lifestyles control. **Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 23, n. 10, p. 6194–6209, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15661>

CAGE, Daniel J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and molecular biology reviews**, [S. I.], v. 68, n. 2, p. 280–300, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>

CHAI, Weihang; STEWART, Valley. NasR, a novel RNA-binding protein, mediates nitrate-responsive transcription antitermination of the *Klebsiella oxytoca* m5al nasF operon leader in *Vitro* 1 1 Edited by M. Gottesman. **Journal of Molecular Biology**, [S. I.], v. 283, n. 2, p. 339–351, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2105>

CHANG, Woo Suk *et al.* An oligonucleotide microarray resource for transcriptional profiling of *bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. I.], v. 20, n. 10, p. 1298–1307, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-10-1298>

CHEN, Wen Ming *et al.* Proof that Burkholderia strains form effective symbioses with legumes: A study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 71, n. 11, p. 7461–7471, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7461-7471.2005>

CHERKASOV, N.; IBHADON, A. O.; FITZPATRICK, P. A review of the existing and alternative methods for greener nitrogen fixation. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, [S. I.], v. 90, p. 24–33, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2015.02.004>

DELGADO, María J.; CASELLA, Sergio; BEDMAR, Eulogio J. Denitrification in Rhizobia-Legume Symbiosis. *In*: BOTHE, Hermann; FERGUSON, Stuart J.; NEWTON, William E. (org.). **Biology of the Nitrogen Cycle**. 1. ed. [S. I.]: Elsevier, 2007. p. 83–91. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50007-2>. Acesso em: 30 jul. 2021.

DIXON, Ray; KAHN, Daniel. GENETIC REGULATION OF. **Nature**, [S. I.], v. 2, n. August, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro954>

DJORDJEVIC, Michael A. *et al.* A Global Analysis of Protein Expression Profiles in *Sinorhizobium meliloti*: Discovery of New Genes for Nodule Occupancy and Stress Adaptation. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, [S. I.], v. 16, n. 6, p. 508–524, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.6.508>

DOWNIE, J. Allan; WALKER, Simon A. Plant responses to nodulation factors. **Current Opinion in Plant Biology**, [S. I.], v. 2, n. 6, p. 483–489, 1999. Disponível em:

[https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00018-7)

DUIN, Hilke Johanna. **Symbiotic plasmid (pNGR234 a) copy number in the broad host range bacterium Sinorhizobium fredii NGR234 depends on quorum sensing and phenotypic heterogeneity**. 2021. - Universität Hamburg, [S. l.], 2021.

FERRO-LUZZI AMES, G.; NIKAIDO, K. Nitrogen regulation in Salmonella typhimurium. Identification of an ntrC protein-binding site and definition of a consensus binding sequence. **The EMBO journal**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 539–547, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1985.tb03662.x>

FISCHER, Hans-Martin. Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. **Microbiological reviews**, [S. l.], v. 58, n. 3, p. 352–386, 1994. Disponível em: [https://doi.org/0146-0749/94/\\$04.00+0](https://doi.org/0146-0749/94/$04.00+0)

FISHER, Robert F.; LONG, Sharon R. **Interactions of NodD at the nod box: NodD binds to two distinct sites on the same face of the helix and induces a bend in the DNA**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1515>

FLORES, Enrique *et al.* Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. **Photosynthesis Research**, [S. l.], v. 83, n. 2, p. 117–133, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11120-004-5830-9>

FRANCK, Sooyoung *et al.* Comparative transcriptomic analysis of symbiotic Bradyrhizobium japonicum. **Symbiosis**, [S. l.], v. 63, n. 3, p. 123–135, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13199-014-0294-y>

FRANCK, William L. *et al.* DNA Microarray-Based Identification of Genes Regulated by NtrC in Bradyrhizobium japonicum. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 81, n. 16, p. 5299–5308, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00609-15>

GANGESWARAN, Rathi; EADY, Robert R. Flavodoxin 1 of Azotobacter vinelandii: Characterization and role in electron donation to purified assimilatory nitrate reductase. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 317, n. 1, p. 103–108, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj3170103>

GÓMEZ-HERNÁNDEZ, Nicolás *et al.* Regulation and symbiotic role of nirK and norC expression in Rhizobium etli. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 233–245, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-10-0173>

GREEN, R. T. *et al.* Transcriptomic analysis of Rhizobium leguminosarum bacteroids in determinate and indeterminate nodules. **Microbial Genomics**, [S. l.], v. 5, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000254>

GROTE, Jessica *et al.* The absence of the N-acyl-homoserine-lactone autoinducer synthase genes tral and ngrl increases the copy number of the symbiotic plasmid in Sinorhizobium fredii NGR234. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. NOV, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01858>

GUTIERREZ, Juan-Carlos *et al.* nasST, two genes involved in the induction of the assimilatory nitrite-nitrate reductase operon (nasAB) of Azotobacter vinelandii. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 579–591, 1995. Disponível em: https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18030579.x

HANAHAN, Douglas. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 166, n. 4, p. 557–580, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)

HERRERO, Antonia; FLORES, Enrique; IMPERIAL, Juan. Nitrogen Assimilation in Bacteria. *In: Reference Module in Life Sciences*. [S. l.]: Elsevier, 2019 a. p. 280–300. *E-book*.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20680-8>

HERRERO, Antonia; FLORES, Enrique; IMPERIAL, Juan. **Nitrogen assimilation in bacteria**. 4. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019 b. v. 3E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20680-8>

HUERGO, Luciano F.; DIXON, Ray. The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 79, n. 4, p. 419–435, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mnbr.00038-15>

JAVELLE, A.; MERRICK, M. Complex formation between AmtB and GlnK: An ancestral role in prokaryotic nitrogen control. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 170–172, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST0330170>

JONES, Kathryn M. *et al.* How rhizobial symbionts invade plants: The Sinorhizobium - Medicago model. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 5, n. 8, p. 619–633, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1705>

KUYPERS, Marcel M. M.; MARCHANT, Hannah K.; KARTAL, Boran. The microbial nitrogen-cycling network. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 263–276, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>

LARDI, Martina *et al.* Metabolomics and transcriptomics identify multiple downstream targets of paraburkholderia phymatum σ 54 during symbiosis with phaseolus vulgaris. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 4, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19041049>

LEDERMANN, Raphael; SCHULTE, Carolin C. M.; POOLE, Philip S. How rhizobia adapt to the nodule environment. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 203, n. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.00539-20>

LI, Yan *et al.* High-Resolution Transcriptomic Analyses of Sinorhizobium sp. NGR234 Bacteroids in Determinate Nodules of Vigna unguiculata and Indeterminate Nodules of Leucaena leucocephala. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 8, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070531>

LIN, J. T.; GOLDMAN, B. S.; STEWART, V. The nasFEDCBA operon for nitrate and nitrite assimilation in Klebsiella pneumoniae M5a1. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 176, n. 9, p. 2551–2559, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.176.9.2551-2559.1994>

LIU, Li Xue *et al.* The nitrate-reduction gene cluster components exert lineage-dependent contributions to optimization of Sinorhizobium symbiosis with soybeans. **Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 19, n. 12, p. 4926–4938, 2017 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13948>

LIU, Yilei *et al.* NtrC-dependent control of exopolysaccharide synthesis and motility in Burkholderia cenocepacia H111. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. e0180362, 2017 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180362>

LÓPEZ, María F. *et al.* Dissecting the role of NtrC and RpoN in the expression of assimilatory nitrate and nitrite reductases in Bradyrhizobium diazoefficiens. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S. l.], v. 110, n. 4, p. 531–542, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0821-3>

LUQUE-ALMAGRO, Victor M. *et al.* Transcriptional and translational adaptation to aerobic nitrate anabolism in the denitrifier Paracoccus denitrificans. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 474, n. 11, p. 1769–1787, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BCJ20170115>

LUQUE-ALMAGRO, Víctor M. *et al.* Bacterial nitrate assimilation: Gene distribution and regulation. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 1838–1843, 2011.

Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST20110688>

MARCHAL, Kathleen; VANDERLEYDEN, Jos; JANSSENS, F. A. The “oxygen paradox” of dinitrogen-fixing bacteria. **Biology and Fertility of Soils**, [S. l.], v. 30, n. 5–6, p. 363–373, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s003740050017>

MARTIN, G. B.; CHAPMAN, K. A.; CHELM, B. K. Role of the Bradyrhizobium japonicum ntrC gene product in differential regulation of the glutamine synthetase II gene (glnII). **Journal of bacteriology**, [S. l.], v. 170, n. 12, p. 5452–5459, 1988 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.170.12.5452-5459.1988>

MARTIN, G. B.; CHAPMAN, K. A.; CHELM, B. K. Role of the Bradyrhizobium japonicum ntrC gene product in differential regulation of the glutamine synthetase II gene (glnII). **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 170, n. 12, p. 5452–5459, 1988 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.170.12.5452-5459.1988>

MARTINEZ, Esperanza; ROMERO, David; PALACIOS, Rafael. The Rhizobium Genome. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 59–93, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07352689009382282>

MEILHOC, Eliane *et al.* The Response to Nitric Oxide of the Nitrogen-Fixing Symbiont Sinorhizobium meliloti. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 748–759, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-6-0748>

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in Bacteria. **Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 59, n. 4, p. 604–622, 1995.

MESA, Socorro *et al.* Bradyrhizobium japonicum NnrR, a denitrification regulator, expands the FixLJ-FixK2 regulatory cascade. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 185, n. 13, p. 3978–3982, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.185.13.3978-3982.2003>

MILLER, Anthony J. *et al.* Nitrate transport and signalling. **Journal of Experimental Botany**, [S. l.], v. 58, n. 9, p. 2297–2306, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/erm066>

MILLER, W. G.; LEVEAU, J. H. J.; LINDOW, S. E. Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. 1243–1250, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.11.1243>

MORENO-VIVIÁN, Conrado *et al.* Prokaryotic nitrate reduction: Molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 181, n. 21, p. 6573–6584, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.181.21.6573-6584.1999>

MORENO-VIVIÁN, Conrado; FLORES, Enrique. Nitrate Assimilation in Bacteria. *In*: BOTHE, Hermann; FERGUSON, Stuart J.; NEWTON, William E. (org.). **Biology of the Nitrogen Cycle**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier, 2007. p. 263–282. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50018-7>

MOROZKINA, E. V.; ZVYAGILSKAYA, R. A. Nitrate reductases: Structure, functions, and effect of stress factors. **Biochemistry (Moscow)**, [S. l.], v. 72, n. 10, p. 1151–1160, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S0006297907100124>

MURRAY, Jeremy D. *et al.* Nitrogen sensing in legumes. **Journal of experimental botany**, [S. l.], v. 68, n. 8, p. 1919–1926, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/erw405>

MUS, Florence *et al.* Exploring the alternatives of biological nitrogen fixation. **Metallomics**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 523–538, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c8mt00038g>

NELLEN-ANTHAMATTEN, D. *et al.* Bradyrhizobium japonicum FixK2, a crucial distributor in the FixLJ- dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels.

Journal of Bacteriology, [S. l.], v. 180, n. 19, p. 5251–5255, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.180.19.5251-5255.1998>

NOVICHKOV, Pavel S. *et al.* RegPrecise 3.0 - A resource for genome-scale exploration of transcriptional regulation in bacteria. **BMC Genomics**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-745>

OLDROYD, Giles E. D.; DOWNIE, J. Allan. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 5, n. 7, p. 566–576, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm1424>

OLDROYD, Giles E. D.; DOWNIE, J. Allan. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. **Annual Review of Plant Biology**, [S. l.], v. 59, p. 519–546, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>

PAREJO, Sergio *et al.* Fine-Tuning Modulation of Oxidation-Mediated Posttranslational Control of Bradyrhizobium diazoefficiens FixK2 Transcription Factor. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 9, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23095117>

PARKS, Donovan H. *et al.* A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. **Nature Biotechnology**, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 996, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.4229>

PATRIARCA, Eduardo J.; TATÈ, Rosarita; IACCARINO, Maurizio. Key Role of Bacterial NH₄⁺ Metabolism in Rhizobium-Plant Symbiosis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 66, n. 2, p. 203–222, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mubr.66.2.203-222.2002>

PAWLOWSKI, K.; KLOSSE, U.; DE BRUIJN, F. J. Characterization of a novel Azorhizobium caulinodans ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. **MGG Molecular & General Genetics**, [S. l.], v. 231, n. 1, p. 124–138, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00293830>

PERRET, Xavier; STAEHELIN, Christian; BROUGHTON, William J. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 64, n. 1, p. 180–201, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mubr.64.1.180-201.2000>

PESSI, Gabriella *et al.* Genome-wide transcript analysis of Bradyrhizobium japonicum bacteroids in soybean root nodules. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 20, n. 11, p. 1353–1363, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-11-1353>

PETERSEN, Katrin. **Quorum sensing - dependent expression of small proteins and structural analysis of new class of quorum quenching enzymes**. 2019. - University of Hamburg, [s. l.], 2019.

POOLE, Robert K. **Microbiology of Metal Ions**. [S. l.: s. n.]. E-book.

PUEPPKE, Steven G.; BROUGHTON, William J. Rhizobium sp. strain NGR234 and R. fredii USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 293–318, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.4.293>

REITZER, Larry. Nitrogen Assimilation and Global Regulation in Escherichia coli. **Annual Review of Microbiology**, [S. l.], v. 57, p. 155–176, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090820>

ROB J.M. VAN SPANNING, David J. Richardson and Stuart J. Ferguson. Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification. *In*: BOTHE, Hermann; FERGUSON, Stuart J.; NEWTON, William E. (org.). **Biology of the Nitrogen Cycle**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier,

2007. p. 453. *E-book*.

ROUX, Brice *et al.* An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. **The Plant Journal**, [S. l.], v. 77, n. 6, p. 817–837, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tpj.12442>

RUIZ, Bryan *et al.* The Nitrate Assimilatory Pathway in *Sinorhizobium meliloti*: Contribution to NO Production. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. JUL, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01526>

RUIZ, Bryan *et al.* Rhizobia: Highways to NO. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 49, n. 1, p. 495–505, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST20200989>

RUIZ, Bryan *et al.* Role of Nitric Oxide of Bacterial Origin in the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* Symbiosis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 35, n. 10, p. 887–892, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-22-0118-SC>

RUTTEN, Paul J. *et al.* Multiple sensors provide spatiotemporal oxygen regulation of gene expression in a *Rhizobium*-legume symbiosis. **PLoS Genetics**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 1–27, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1009099>

RUTTEN, Paul J.; POOLE, Philip S. **Oxygen regulatory mechanisms of nitrogen fixation in rhizobia**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2019. v. 75 *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2019.08.001>

SALDAÑA, Gustavo *et al.* Genetic diversity of fast-growing rhizobia that nodulate soybean (*Glycine max* L. Merr). **Archives of Microbiology**, [S. l.], v. 180, n. 1, p. 45–52, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0559-y>

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. **Molecular Cloning : A Laboratory Manual**. Thrid Edit ed. New York: CSHL PRESS, 2001. *E-book*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24532655>

SCHÄFER, Andreas *et al.* Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. **Gene**, [S. l.], v. 145, p. 69–73, 1994.

SCHINDELIN, Johannes *et al.* Fiji : an open-source platform for biological-image analysis. [S. l.], v. 9, n. 7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

SCHMEISSER, Christel *et al.* *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 75, n. 12, p. 4035–4045, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00515-09>

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. **Bio/Technology**, [S. l.], v. 1, n. 9, p. 784–791, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>

SPARACINO-WATKINS, Courtney; STOLZ, John F.; BASU, Partha. Nitrate and periplasmic nitrate reductases. **Chem. Soc. Rev.**, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 676–706, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C3CS60249D>

STEIN, Lisa Y.; KLOTZ, Martin G. The nitrogen cycle. **Current Biology**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. R94–R98, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021>

SZETO, W. W. *et al.* Identification and characterization of the *Rhizobium meliloti* ntrC gene: *R. meliloti* has separate regulatory pathways for activation of nitrogen fixation genes in free-living and symbiotic cells. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 169, n. 4, p. 1423–1432, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.169.4.1423-1432.1987>

TIMMUSK, Salme *et al.* Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 8, n. February, p. 1–10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049>

TKACZ, Andrzej *et al.* Stability and succession of the rhizosphere microbiota depends upon plant type and soil composition. **ISME Journal**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 2349–2359, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.41>

TORRES, María J. *et al.* Denitrification in *Sinorhizobium meliloti*. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 1886–1889, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST20110733>

TOZATTO, SAMARA DE AGUIAR. **MUTAGÊNESE E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES y4aM E y4fQ DE *Sinorhizobium fredii* NGR234**. Curitiba: UFPR, 2023.

TRINICK, M. J. Relationships Amongst the Fast-growing Rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their Affinities with Other Rhizobial Groups. **Journal of Applied Bacteriology**, [S. l.], v. 49, n. 1, p. 39–53, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1980.tb01042.x>

TSUKADA, Shuhei *et al.* Comparative genome-wide transcriptional profiling of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 grown under free-living and symbiotic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 75, n. 15, p. 5037–5046, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00398-09>

UDVARDI, Michael; POOLE, Philip S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. **Annual Review of Plant Biology**, [S. l.], v. 64, p. 781–805, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120235>

UNAY, Jovelyn; PERRET, Xavier. A minimal genetic passkey to unlock many legume doors to root nodulation by rhizobia. **Genes**, [S. l.], v. 11, n. 5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes11050521>

VEITCH, Nigel C. Isoflavonoids of the Leguminosae. **Natural Product Reports**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 776–802, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b616809b>

WALKER, Travis S. *et al.* Root Exudation and Rhizosphere Biology. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 132, n. May, p. 44–51, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.102.019661>. Although

WHEATLEY, Rachel M. *et al.* Lifestyle adaptations of *Rhizobium* from rhizosphere to symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 117, n. 38, p. 23823–23834, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2009094117>

WILLEMS, Anne *et al.* Description of new Ensifer strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an Opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 53, n. 4, p. 1207–1217, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02264-0>

WU, Qitu; STEWART, Valley. NasFED Proteins Mediate Assimilatory Nitrate and Nitrite Transport in *Klebsiella oxytoca* (*pneumoniae*) M5a1. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 180, n. 5, p. 1311–1322, 1998. Disponível em: [https://doi.org/0021-9193/98/\\$04.00](https://doi.org/0021-9193/98/$04.00)≤0

WU, Stephen Qitu *et al.* General Nitrogen Regulation of Nitrate Assimilation Regulatory Gene *nasR* Expression in *Klebsiella oxytoca* M5a1. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 181, n. 23, p. 7274–7284, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.181.23.7274-7284.1999>

YANG, Zhimin *et al.* Master regulator NtrC controls the utilization of alternative nitrogen sources in *Pseudomonas stutzeri* A1501. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 37, n. 10, p. 1–12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03144-w>

YOUNG, J. M. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen *et al.* 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang *et al.* 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination “*Sinorhizobium adhaerens*” (Casida 1982) Willems *et al.* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 53, n. 6, p. 2107–2110, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02665-0>

ZAMORANO-SÁNCHEZ, David *et al.* FxkR provides the missing link in the fixI-fixK signal transduction cascade in *Rhizobium etli* CFN42. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [S. l.], v. 25, n. 11, p. 1506–1517, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-12-0136-R>

ZIMMER, Daniel P. *et al.* Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: Scavenging as a defense against nitrogen limitation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 97, n. 26, p. 14674–14679, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14674>