

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

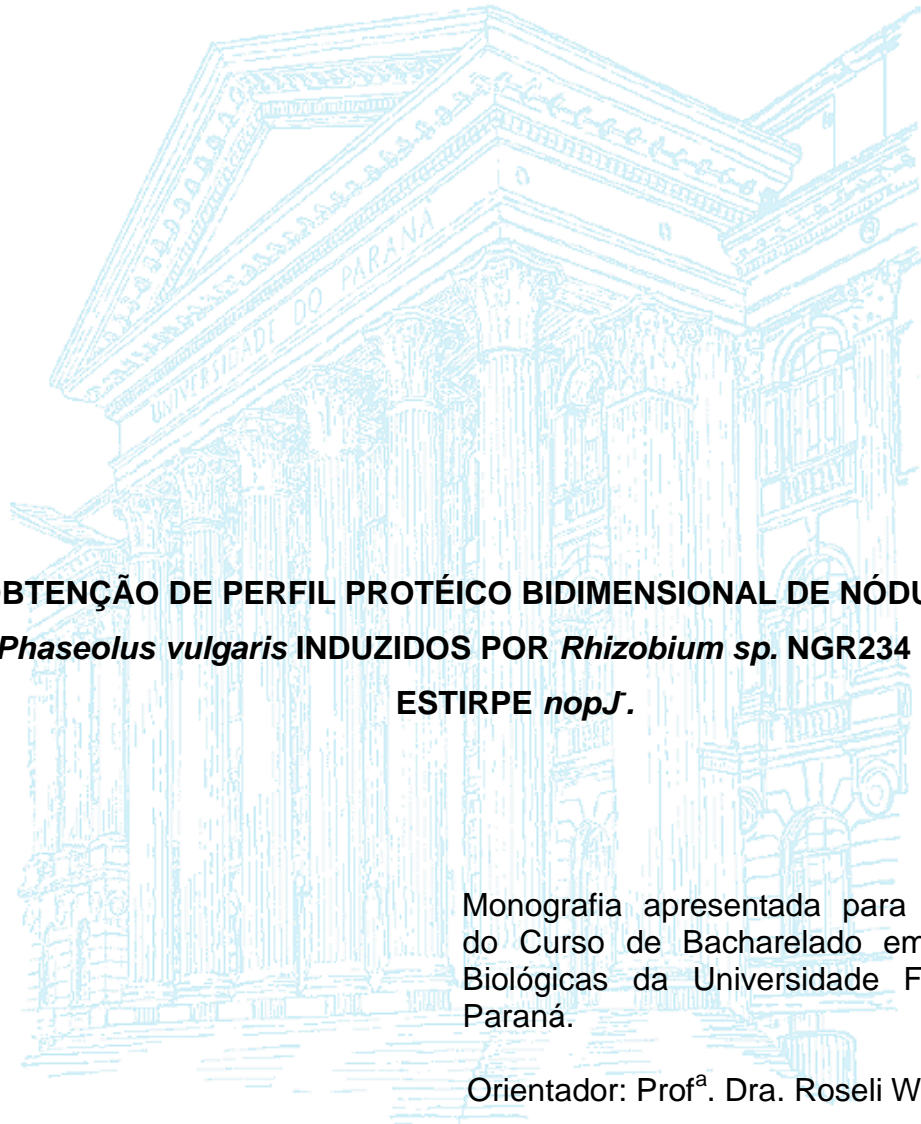
CAROLINE KUKOLJ

OBTENÇÃO DE PERFIL PROTÉICO BIDIMENSIONAL DE NÓDULOS DE  
*Phaseolus vulgaris* INDUZIDOS POR *Rhizobium sp.* NGR234 E PELA  
ESTIRPE *nopJ*.

CURITIBA

2009

CAROLINE KUKOLJ



**OBTENÇÃO DE PERFIL PROTÉICO BIDIMENSIONAL DE NÓDULOS DE  
*Phaseolus vulgaris* INDUZIDOS POR *Rhizobium sp.* NGR234 E PELA  
ESTIRPE *nopJ*.**

Monografia apresentada para conclusão  
do Curso de Bacharelado em Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do  
Paraná.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Roseli Wassem

CURITIBA

2009

## RESUMO

O cultivo de leguminosas de interesse agrícola depende de associações simbióticas com microorganismos capazes de fixar nitrogênio atmosférico, chamados rizóbios. O cultivo de feijão no Brasil apresenta uma produtividade média baixa, com amplitude de variação muito alta: desde 400 kg/ha até mais de 3000 kg/ha. Além disso, é essencialmente dependente de fertilizantes nitrogenados químicos, cuja fabricação demanda um alto custo. Considerando que o feijão constitui importante fonte de proteína da alimentação humana, principalmente em países pobres da África e América do Sul, é notável a importância do desenvolvimento de tecnologias de baixo custo que aumentem a produtividade e não causem prejuízos ao meio ambiente. O uso de inoculantes microbianos no cultivo de soja aproxima-se de 100% e representa uma economia anual de 8 bilhões de reais por ano no Brasil com fertilizantes químicos. No entanto, em outras leguminosas o uso de inoculantes ainda é limitado, devido ao desconhecimento dos fatores importantes para o estabelecimento de uma interação eficiente. O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é colonizado pelo *Rhizobium sp.* NGR234, em um processo que envolve a ação sincronizada de genes de nodulação, fixação de nitrogênio e do sistema de secreção do tipo III (T3SS). NopJ é uma proteína efetora secretada pelo T3SS em NGR234 e é diretamente injetada no citoplasma da célula vegetal, mas sua função ainda é desconhecida. Curiosamente, uma estirpe mutante *nopJ* nodula o *Phaseolus* mais eficientemente que a estirpe selvagem. A fim de entender o efeito do NopJ na interação entre *Rhizobium sp.* NGR234 e *P. vulgaris*, foram cultivados feijões sob condições estéreis e inoculados com as estirpes selvagem e *nopJ* de NGR234. Os nódulos foram coletados 4 e 6 semanas após a inoculação. Extratos protéicos foram obtidos para análises em géis de eletroforese bidimensional, utilizando tiras de gradiente de pH imobilizado e SDS-PAGE. Os géis foram corados com Coomassie Blue G-250, e os perfis protéicos analisados. A posterior identificação das proteínas através de MALDI-TOF, irá contribuir com a elucidação dos mecanismos de interação entre *Rhizobium-Phaseolus*.

Palavras-chave: Rizóbio. NGR234. *nopJ*. Proteoma. Fixação do nitrogênio.

## ABSTRACT

The productivity of leguminous crops is dependent on symbiotic associations between plants and microorganisms able to fix atmospheric nitrogen, called rhizobia. Productivity of cultivated beans in Brazil is low and exhibit very high amplitude of variation; ranging from 400 kg/ha to more than 3,000 kg/ha. Furthermore, productivity is mainly dependent on the use of chemical nitrogen fertilizers, which have high manufacturing costs. Since beans are an important source of protein for human consumption, it is imperative the development of low-cost and environmentally friendly technologies to increase productivity. Although the use of rhizobial inoculants on soybean is widely spread in Brazil, their use in other legumes is limited, due to poor understanding of biological factors important for the establishment of an effective interaction. Common beans (*Phaseolus vulgaris*) are colonized by *Rhizobium sp.* NGR234, in a process involving the concerted action of genes for nodulation, nitrogen fixation and type three secretion system (T3SS). NopJ is a protein effector secreted by NGR234 through the T3SS and is directly injected into the plant cell cytoplasm, but its function is still unknown. Interestingly, a *nopJ* mutant strain nodulates *Phaseolus* more efficiently than the wild type strain. In order to understand the effect of NopJ on the interaction between *Rhizobium sp.* NGR234 and *P. vulgaris*, beans were grown under sterile conditions and inoculated with wild type or *nopJ* strains of NGR234. The nodules were harvested 4 and 6 weeks after inoculation. Protein extracts were obtained for analysis in two-dimensional electrophoresis gels by using strips of immobilized pH gradient followed by SDS-PAGE. The gels were stained with Coomassie Blue G-250, and the protein profiles analyzed. Protein identification of differential spots, using MALDI-TOF, will allow us to identify potential plant targets during the interaction and may contribute to the elucidation of *Rhizobium-Phaseolus* mechanism of interaction.

Key-words: Rhizobia. NGR234. *nopJ*. Proteome. Nitrogen fixation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b> - FRASCO MAGENTA PREPARADO PARA RECEBER SEMENTE PRÉ-GERMINADA .....	19
<b>FIGURA 2</b> - PLANTAS AOS 45 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO.....	30
<b>FIGURA 3</b> - PERFIL PROTÉICO OBTIDO DE NÓDULOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO 1 DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E AO PROGRAMA 1 DE ISOELETROFOCALIZAÇÃO .....	31
<b>FIGURA 4</b> - PERFIL PROTÉICO DE NÓDULOS INDUZIDOS POR NGR234...	32
<b>FIGURA 5</b> - PERFIL PROTÉICO DE NÓDULOS INDUZIDOS POR <i>nopJ</i> .....	33

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	- SOLUÇÕES ESTOQUE PARA O PREPARO DE B&D .....	20
<b>TABELA 2</b>	- ESTIRPES UTILIZADAS E SUAS CARACTERÍSTICAS .....	21
<b>TABELA 3</b>	- COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA TY (TRIPTONE-YEAST) .....	21
<b>TABELA 4</b>	- SOLUÇÕES ESTOQUE PARA PREPARO DE RMS .....	22
<b>TABELA 5</b>	- TAMPÃO DE EXTRAÇÃO PARA MÉTODO COM FENOL .....	23
<b>TABELA 6</b>	- SOLUÇÃO DE REHIDRATAÇÃO DA TIRA IPG .....	24
<b>TABELA 7</b>	- PROGRAMA PARA ISOELETROFOCALIZAÇÃO NO IPGPHOR UTILIZADO COM AS AMOSTRAS SUBMETIDAS AO PRIMEIRO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO .....	25
<b>TABELA 8</b>	- PROGRAMA PARA ISOELETROFOCALIZAÇÃO NO IPGPHOR UTILIZADO COM AS AMOSTRAS SUBMETIDAS AO SEGUNDO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO .....	25
<b>TABELA 9</b>	- TAMPÃO DE EQUILÍBRIO DAS TIRAS IPG .....	25
<b>TABELA 10</b>	- TAMPÃO DE CORRIDA 1X (LAEMMLI BUFFER) .....	26
<b>TABELA 11</b>	- COMPOSIÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA PARA SEGUNDA DIMENSÃO .....	26
<b>TABELA 12</b>	- COOMASSIE COLOIDAL .....	27
<b>TABELA 13</b>	- COMPARAÇÃO DO PESO MÉDIO DAS PARTES AÉREAS E NÓDULOS POR PLANTA ENTRE AS DIFERENTES ESTIRPES UTILIZADAS .....	29
<b>TABELA 14</b>	- CONCETRAÇÃO DE PROTEÍNAS DOS EXTRATOS PROTÉICOS OBTIDOS .....	31

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	7
1.1	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	7
1.2	INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA	8
1.3	RHIZOBIUM	12
1.4	PROTEOMA	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	18
3.1	ESTRATÉGIA GERAL	18
3.2	CULTIVO DAS PLANTAS PARA OBTENÇÃO DOS NÓDULOS	18
3.2.1	Composição do B&D	20
3.3	CULTURA DAS BACTÉRIAS	20
3.3.1	Meios de cultivo	21
3.4	PREPARO DOS EXTRATOS PROTÉICOS	22
3.5	OBTENÇÃO DE PERFIL ELETROFORÉTICO BIDIMENSIONAL	24
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	28
4.1	OBTENÇÃO DOS NÓDULOS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> INOCULADOS COM <i>Rhizobium</i> sp.	28
4.2	ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS	30
4.3	ANÁLISE DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS	32
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	35
	<b>REFERÊNCIAS</b>	36

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

O nitrogênio constitui o nutriente mais importante para o crescimento de plantas em ambiente natural (FRANCO & DOBEREINER, 1994). As principais moléculas que compõem a matéria viva, como proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos, apresentam nitrogênio em sua composição, além de carbono e hidrogênio. Apesar da relevância para organismos vivos, a maior parte desse elemento encontra-se na natureza sob forma de dinitrogênio, indisponível para os seres vivos. O  $N_2$  compõe cerca de 78% do ar atmosférico e, devido à sua tripla ligação, corresponde a uma forma de gás quimicamente muito estável sob condições ambiente (SPRENT & SPRENT, 1990; EVANS & BURRIS, 1992).

Para que o nitrogênio atmosférico seja incorporado à biomassa, é necessário transformá-lo em uma forma combinada que possa ser assimilada pelos seres vivos. Este processo denomina-se Fixação Biológica do Nitrogênio (STRYER, 1994) e é realizado por bactérias de vida livre ou simbióticas.

A fixação química do nitrogênio é o processo pelo qual os fertilizantes nitrogenados são sintetizados. O método industrial foi desenvolvido para que a produção de alimentos pudesse acompanhar o crescimento da população no século XX. Embora eficiente, a utilização desses compostos na agricultura depende de altos investimentos, encarecendo o produto final. Além disso, o alto consumo de combustíveis fósseis, requerido para atingir as condições necessárias para fixar o nitrogênio artificialmente, a contaminação da água e de alimentos por nitrato e nitrito e as alterações no desenvolvimento de plantas pelo excesso desse nutriente (BOHLOOL *et al.*, 1992; DOBEREINER, 1992; BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1997; SPRENT & SPRENT, 1990), tornam a fixação química do nitrogênio ecologicamente e economicamente desfavorável.

Como alternativa ao uso de fertilizantes químicos, a fixação biológica do nitrogênio contribui com a preservação ambiental, eliminando o impacto negativo causado pelos produtos químicos (STRALIOTTO *et al.*, 2002).



Os organismos capazes de assimilar o nitrogênio atmosférico e incorporá-lo à matéria viva, ou seja, fixá-lo, são denominados diazotróficos. Essas bactérias apresentam o complexo enzimático nitrogenase, que catalisa a reação de redução do nitrogênio gasoso à amônia, um composto nitrogenado disponível para outros seres vivos liberado diretamente no solo.

Bactérias fixadoras de nitrogênio podem ser de vida livre, que fixam nitrogênio para o próprio uso, ou se associarem a vegetais. Dessas, algumas são capazes de estabelecer uma complexa relação simbiótica com a planta hospedeira e formar estruturas diferenciadas, denominadas nódulos, onde é realizada a fixação do nitrogênio (EVANS & BURRIS, 1992). Esses microorganismos simbióticos são chamados coletivamente de rizóbios e constituem objeto do presente estudo.

## 1.2 INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

A interação com os rizóbios e consequente formação de nódulos ocorre em plantas pertencentes à família *Fabaceae*, que correspondem às leguminosas (VIPREY et al., 2000), e em alguns vegetais do gênero *Parasponia*. A denominação rizóbio refere-se aos microorganismos fixadores de nitrogênio que estabelecem uma relação simbiótica com a planta infectada quando sinais moleculares trocados entre o vegetal e a bactéria, são compatíveis (DILWORTH; GLENN, 1991; PATRIARCA; TATE; LACCARINO, 2002; DIXON; KAHN, 1994), e engloba os gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Bradyrhizobium*.

Nas raízes das plantas infectadas, ocorre a formação de nódulos onde o microssimbionte permanece e fixa o nitrogênio, disponibilizando-o para planta e contribuindo para sua produtividade (PERRET; STAEHELIN; BROUGHTON, 2000; LOH; STACEY, 2003). A taxa de fixação dos rizóbios varia conforme a espécie e as condições abióticas do solo, mas com a aplicação do inoculante adequado e a correção de outros nutrientes, é possível obter altas taxas de fixação.

Comparativamente a outras leguminosas, o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta uma das mais baixas taxas de fixação de nitrogênio após inoculação (STRALIOTTO; TEIXEIRA, 2000). A necessidade de pesquisas visando a otimização da fixação biológica do nitrogênio para aumento da produtividade do feijoeiro, é

evidente devido ao valor econômico e social atribuído a essa planta. Várias espécies de rizóbios podem infectar o feijoeiro, incluindo *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. tropici*, *R. gallicum*, *R. giardini* e *R. etli* (AMARGER *et al.*, 1997; CHUEIRE, 2000).

A formação do nódulo é um processo que envolve múltiplas etapas e requer uma troca de sinais moleculares altamente precisos entre planta e microorganismo. A compatibilidade entre os simbioses é essencial para que ocorra a interação. Compostos orgânicos, importantes para o desenvolvimento de microorganismos na rizosfera, são naturalmente liberados pelas plantas. Dentre estes, os flavonóides são os mais relevantes para a simbiose. Quando liberados pelas raízes das leguminosas, os flavonóides geram um gradiente químico capaz de atrair o rizóbio para sua superfície radicular, fenômeno conhecido como quimiotaxia. Essa etapa é chamada de pré-infecção e inicia a comunicação molecular entre os simbioses.

Na superfície radicular, o rizóbio se prolifera e adere aos pêlos radiculares da planta hospedeira. Essa adesão envolve duas etapas, sendo a primeira uma ligação fraca mediada pela proteína ricadesina (SMIT *et al.*, 1989) e a segunda uma ligação forte através de fibrilas de celulose (CHUMAKOV, 1996). De acordo com Smit *et al.* (1987), a primeira fase da adesão é a mais importante, pois as fibrilas de celulose não são indispensáveis à infecção, enquanto que, mutantes deficientes em ricadesina funcional não aderem às raízes das plantas (SWART *et al.*, 1994).

Os rizóbios induzem o encurvamento dos pêlos radiculares das plantas hospedeiras, gerando um ponto de infecção. Nesse ponto, ocorre a degradação da parede celular e inicia-se a formação do cordão de infecção, uma estrutura tubular que se desenvolve por dentro do pêlo radicular, em direção ao córtex da raiz, ramificando-se. As bactérias então se multiplicam e induzem a multiplicação das células corticais, dando origem ao nódulo. O microsimbionte diferencia-se em uma forma endo-simbótica, denominada bacteróide, capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia, que será disponibilizada à planta hospedeira (BROUGHTON *et al.*, 2006). Os nódulos ativos apresentam coloração rosada devido à presença de leghemoglobina, responsável por manter os níveis de oxigênio adequados para a atividade da nitrogenase.

A interação entre rizóbios e leguminosas é complexa e parcialmente desconhecida, chegando a envolver mais de 50 genes bacterianos e mais de 40 genes vegetais (SIQUEIRA *et al.*, 1991). A especificidade da interação depende de

compostos fenólicos sintetizados e exsudados pela planta. Esses compostos determinam a faixa hospedeira, pois apenas os microorganismos que reconhecerem o flavonóide poderão colonizar a planta.

O processo se inicia com a ativação das proteínas NodD do rizóbio pelos flavonóides da planta. Essas proteínas pertencem à família LysR de reguladores transcricionais e formam com os flavonóides um complexo capaz de ligar-se a sítios conservados chamados *nod boxes*, que estão presentes em regiões promotoras dos genes *nod*. Apesar das proteínas NodD ligarem-se naturalmente à *nod boxes*, o gene *nod* correspondente só será expresso na presença do flavonóide (FISHER & LONG, 1993).

Quando ativados, os genes *nod* codificam proteínas responsáveis pela síntese de fatores Nod, que são lipo-quitto-oligossacarídeos importantes para indução do desenvolvimento dos nódulos. Um controle altamente preciso da transcrição dos genes *nod* pode estar associado a variações nas seqüências dos *nod boxes* (FREIBERG *et al.*, 1997). Os fatores Nod facilitam a entrada do rizóbio nas raízes do vegetal, porém, outras moléculas também são necessárias para sinalizar a formação do nódulo.

Em *Rhizobium* sp. NGR234, a maioria dos genes responsáveis pela produção de fatores Nod está distribuída em cinco operons, cada um controlado por um *nod-box* diferente (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Esses genes são altamente conservados tanto na seqüência de DNA como na sua função (MARTÍNEZ *et al.*, 1990), a produção de fatores Nod. De acordo com Rélic e colaboradores (1994), esses compostos são sinais essenciais no desenvolvimento da simbiose, pois sem eles o rizóbio não consegue entrar nas raízes da leguminosa.

Os fatores Nod vão induzir algumas respostas na planta, tais como deformação dos pêlos radiculares, despolarização das membranas e flutuações nos níveis de cálcio intracelular das raízes, alterações no citoesqueleto das células radiculares, formação do cordão de pré-infecção, multiplicação das células corticais e desenvolvimento do nódulo (BARTSEV *et al.*, 2004). A relação entre fatores Nod e especificidade da simbiose tem sido muito estudada nas últimas décadas, mas permanece parcialmente desconhecida. O número de diferentes fatores Nod produzidos por uma estirpe de rizóbio é amplamente variável. Segundo Móron *et al.* (2005), a estirpe CIAT899 de *Rhizobium tropici* produz 52 fatores Nod diferentes sob condições ácidas, e apenas 29 em pH neutro, sugerindo a interferência do ambiente

na síntese desses compostos. No entanto, há ainda muitos genes e mecanismos regulatórios desconhecidos envolvidos na produção de fatores Nod (KANNENBERG & CARLSON, 2005), implicando em uma interação muito mais detalhada do que se imaginava anteriormente.

Além de ativar os genes *nod* na presença de flavonóides, a proteína NodD também regula a expressão de genes que codificam para o sistema de secreção do tipo III, ou TTSS, presente no rizóbio. Patógenos frequentemente apresentam esse sistema e o utilizam para injetar proteínas efetoras na célula invadida. O reconhecimento dessas proteínas pelo sistema de defesa da planta gera uma resposta hipersensitiva que induz a morte celular programada para evitar que a infecção se espalhe (VIBOUD & BLISKA, 2005; BÜTTNER & BONAS, 2006). Porém, em *Rhizobium*, o TTSS secreta proteínas externas de nodulação, ou Nop's (*nodular outer proteins*), cuja função é a supressão da defesa basal da planta. Em uma planta hospedeira compatível, as proteínas efetoras do TTSS apresentam uma atividade avirulenta, bloqueando o sistema imune da planta. A determinação da faixa hospedeira que pode interagir com o rizóbio está intimamente relacionada às proteínas secretadas por esse sistema. Dependendo da planta, a inibição de uma Nop pode melhorar ou bloquear a simbiose (MARIE *et al.*, 2001).

Assim como em patógenos de plantas, a expressão dos genes TTSS em rizóbio é induzida por sinais moleculares provenientes do vegetal, em um processo similar ao que controla a expressão dos genes *nod*. A proteína NodD reconhece os flavonóides exudados pela planta e estimula a expressão do regulador TtsI, o qual modula a expressão dos genes do TTSS através da ligação a regiões conservadas, denominadas *tts-boxes*, presentes na região promotora desses genes. Dessa forma, o TTSS é ativado e passa a secretar proteínas efetoras (MARIE *et al.*, 2004). O rizóbio produz diversas Nop's que, dependendo do hospedeiro, podem desencadear uma resposta imune na planta ou permitir a invasão do microssimbionte. Portanto, essas proteínas interferem diretamente no processo de nodulação, podendo apresentar efeitos positivos, negativos ou mesmo não interferir na formação do nódulo, variando conforme a planta hospedeira (VIPREY *et al.*, 1998).

Componentes da parede celular da bactéria, formam um complexo macromolecular na interface planta-microorganismo, responsável pelo reconhecimento do hospedeiro e essencial para que a simbiose seja bem sucedida. Essas moléculas incluem exopolissacarídeos (EPS), lipopolissacarídeos (LPS),

polissacarídeos capsulares (CPS ou antígenos-K),  $\beta$ -1,2 glucanas e polissacarídeos extracelulares (EPS). Rizóbios mutantes, não produtores de polissacarídeos de superfície, apresentam problemas para infectar plantas hospedeiras e formar nódulos funcionais, pois essas moléculas são responsáveis pela formação de um biofilme no pêlo radicular. Além disso, os polissacarídeos de parede são importantes para o processo de invasão da leguminosa, pois desencadeiam uma resposta de defesa basal na planta. Um mecanismo semelhante ocorre nas células de mamíferos e insetos, que reconhecem o LPS de patógenos e desenvolvem uma resposta imune. Os polissacarídeos de superfície fazem parte de um grupo de moléculas sinalizadoras chamadas MAMP's (*microbe-associated molecular patterns*), que desencadeiam uma resposta de defesa na planta (DE TORRES *et al.*, 2006). Para que o rizóbio possa invadir o hospedeiro sem ser reprimido, as proteínas efetoras do seu TTSS agem sobre proteínas alvo de defesa da planta, resultando na supressão da resposta imune e consequente colonização da bactéria (KESHAVARZI, 2004). Portanto, organismos patogênicos e simbioses desenvolveram estratégias similares para estabelecer associações compatíveis com suas plantas hospedeiras.

### 1.3 RHIZOBIUM

*Rhizobium sp.* NGR234 é uma bactéria gram-negativa do solo capaz de se associar às leguminosas formando nódulos onde fixa nitrogênio atmosférico. Essa estirpe é capaz de nodular as raízes de mais de 112 gêneros de plantas da família *Fabaceae*, além do gênero *Parasponia*. Devido à larga faixa hospedeira, o NGR234 é um modelo de estudos em mecanismos moleculares que controlam a cascata regulatória da nodulação. A capacidade de interação das proteínas NodD de NGR234 com diversos flavonóides, entre outros fatores, possibilita que este apresente a maior faixa hospedeira já descrita em rizóbios.

O genoma de *Rhizobium sp.* NGR234 é dividido em três replicons: um cromossomo, um megaplasmídeo e um plasmídeo simbiótico (FREIBERG *et al.*, 1997; SCHMEISSER *et al.*, 2009). Este último, chamado de pNGR234a, possui 536 Kb e apresenta a maioria dos genes relacionados à nodulação e fixação de N. Além

disso, seu sequenciamento confirmou a existência de um sistema de secreção do tipo III completo e ativo. O megaplasmídeo, ou pNGR234*b*, contém os genes responsáveis pela síntese dos polissacarídeos de superfície (FLORES *et al.*, 1998) e possui mais de 2 Mb. Análises comparativas indicam que NGR234 pode ter incorporado grande parte do conteúdo genético do pNGR234*b* de outros microorganismos do solo que se associam a plantas (STREIT *et al.*, 2004).

Mutações nos genes do TTSS de NGR234 não apresentam resposta padrão, podendo aumentar ou diminuir a capacidade de formação de nódulos. Dessa forma, estudos funcionais das proteínas secretadas pelo TTSS, podem elucidar e otimizar etapas importantes da interação planta-bactéria, principalmente relacionadas à faixa hospedeira. Análises de mutantes para Nop's específicas indicaram que essas proteínas modulam a formação de nódulos em determinadas plantas (MARIE *et al.*, 2003). Em NGR234 já foram detectadas 8 Nop's, dentre as quais, as Nop's A, B e X correspondem à parte estrutural do pilus do TTSS, através do qual as proteínas efetoras são injetadas nas células eucarióticas (DEAKIN *et al.*, 2005) e as demais, NopJ, NopL, NopP, NopT e NopM, são provavelmente proteínas efetoras, importantes para determinação das plantas hospedeiras.

A regulação da secreção de Nop's em NGR234 é dependente de flavonóides e NodD1, além do ativador transcricional TtsI. Este se liga a regiões conservadas chamadas *tts-boxes*, que estão nos promotores dos genes do TTSS. Dessa forma, inicia-se o processo de secreção das Nop's.

O *Phaseolus vulgaris*, feijoeiro comum, apresenta um pequeno número de nódulos e baixa produtividade, quando inoculado com NGR234. Entretanto, estirpes de NGR234 contendo mutações em genes do TTSS induzem a formação de um grande número de nódulos. A inativação completa do TTSS, através da mutação do gene *rhcN*, que codifica para uma ATPase essencial à secreção, promove a formação de um grande número de nódulos em feijão. Para identificar se uma ou mais proteínas efetoras são as responsáveis por tal fenótipo, mutantes sítio dirigidos em cada um dos genes codificadores de Nop's foram obtidos. Diversas variedades de feijão foram utilizadas e os dados sugerem que NopJ e NopL são efetores negativos, uma vez que sua remoção produz estirpes com melhor capacidade de nodular feijão que a selvagem. Por outro lado, NopP é um efector positivo, pois sua remoção torna a estirpe resultante ainda menos eficiente na nodulação de feijão.

NopM e NopT ainda não tem seu efeito completamente esclarecido, uma vez que as respostas são variáveis em função da variedade utilizada como hospedeira.

A caracterização das proteínas secretadas por mutantes de NGR234 responde questões envolvidas diretamente com a faixa hospedeira e a nodulação. No entanto, apenas o mutante para o gene NopJ será tratado no presente trabalho, além da estirpe selvagem NGR234. Estudos proteômicos das diferentes estirpes de NGR234, através da construção de mapas protéicos e da comparação entre esses, são importantes na determinação de proteínas do TTSS envolvidas na interação com proteínas alvo do hospedeiro.

#### 1.4 PROTEOMA

O termo proteoma refere-se ao conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo em determinado momento da sua vida (HAYNES & YATES, 2000; ABBOT, 1999).

Apesar da importância atribuída nos últimos anos ao sequenciamento do genoma, este estudo resulta em uma grande quantidade de informação, mas que não explica a expressão e atuação das proteínas nos seres vivos (WILKINS & HOCHSTRASSER, 1996). Contrariamente ao genoma, o proteoma responde a essas questões sob uma forma dinâmica, pois o mapeamento das proteínas varia de acordo com a idade do organismo, fatores ambientais, diferença de estirpes etc. (CAHILL *et al.*, 2001). Por isso, diz-se que o genoma é estático, enquanto o proteoma está sujeito a variações, permitindo parâmetros de comparação.

As informações contidas nas proteínas, as atividades que desempenham e os níveis em que são expressas são fatores essenciais para descrição dos sistemas biológicos (AEBERSOLD, 2003).

Com o seqüenciamento do genoma de um organismo podem-se prever quadros de leitura aberta, ou ORF's (*open reading frames*), que são regiões candidatas a codificar uma proteína. Genes pequenos ou que apresentem pouca semelhança com genes já conhecidos, são difíceis de serem identificados. Estudos proteômicos complementam o genoma, pois podem comprovar a existência de um produto gênico para essas regiões candidatas (PANDEY & MANN, 2000). As ORF's

identificadas pelo sequenciamento do genoma podem ser confirmadas através da determinação do proteoma do organismo. Em trabalho publicado por Cash e colaboradores em 1998, dezenove ORF's preditas de *Haemophilus influenzae*, foram confirmadas através do proteoma, pela identificação das 19 proteínas hipotéticas que codificavam.

Devido às diversas modificações que as proteínas estão sujeitas após sua tradução, como metilação, fosforilação, clivagem proteolítica, entre outras, não é possível definir uma proteína pela sequência nucleotídica que a codifica (CAHILL *et al.*, 2001). Dessa forma, um genoma pode gerar um grande número de proteomas, ou seja, um gene pode codificar mais de uma proteína (WILKINKS *et al.*, 1996). Um exemplo é o *Mycoplasma genitalium*, que apresenta 24% mais proteínas que genes (ABBOT, 1999).

A proteômica possibilita uma análise ao nível de expressão, distribuição e função celular das proteínas sob determinadas condições (CASH, 1998). Assim, as modificações pós-traducionais e os mecanismos regulatórios também estão inclusos (BLACKSTOCK & WEIR, 1999). Os perfis protéicos obtidos a partir de extratos de células, sob diferentes condições fisiológicas, podem ser comparados entre si, possibilitando a identificação de proteínas específicas de estados patológicos e fisiológicos diversos (GRAVES & HAYSTEAD, 2002).

Os estudos proteômicos são realizados em duas fases, a separação e a identificação das proteínas, normalmente feitas por eletroforese bidimensional e espectrometria de massa respectivamente (JOCELYN & ILAG, 2002). A eletroforese bidimensional é o modo mais direto para mapear o proteoma de um organismo (LOPEZ, 1999; CAHILL *et al.*, 2001), consiste em duas etapas: focalização isoelétrica (IEF) e eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Na focalização isoelétrica, as moléculas migram sob ação de um campo elétrico em um gel contendo um gradiente de pH. Ao atingirem seu ponto isoelétrico, ou seja, de carga líquida zero, as moléculas interrompem a migração. A IEF corresponde à primeira dimensão de corrida das proteínas, separando-as de acordo com seu ponto isoelétrico. Atualmente, essa etapa é realizada principalmente através de tiras IPGs (*immobilised pH gradients*), que contêm gradientes de pH imobilizados em gel de poliacrilamida contendo grupos tamponantes. Esse método é altamente reprodutível e propicia uma alta capacidade de aplicação da amostra além de uma baixa condutividade durante a focalização. A segunda dimensão separa as



proteínas por massa molecular, através da eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

Apesar de antiga, a eletroforese bidimensional é eficiente na separação de proteínas em uma amostra. Além disso, fornece informações importantes sobre essas moléculas, como ponto isoelétrico, massa molecular, expressão e abundância relativa e modificações pós-traducionais, que alteram a mobilidade eletroforética (PANDEY & MANN, 2000). De acordo com Jungblut (2001), alterações em um único aminoácido podem mudar a posição de uma proteína em um gel bidimensional. No entanto, esse método é incapaz de detectar proteínas com baixo número de cópias, ou seja, apenas as proteínas abundantes na célula são identificadas (HAYNES & YATES, 2000).

Há também uma dificuldade em separar proteínas extremamente básicas ou ácidas (PI <3,5 ou >9,5), assim como as de membranas (SHEN & SMITH, 2002; HERBERT *et al.*, 2001), que são muito hidrofóbicas. Alternativas para minimizar esses problemas podem ser empregadas, como fracionamento (celular, cromatográfico ou eletroforético) da amostra, diminuição do gradiente de pH na focalização e remoção das proteínas mais abundantes da amostra (HANCOCK *et al.*, 2002).

Estudos proteômicos já realizados sobre a interação planta-bactéria, revelaram mecanismos importantes para o estabelecimento da simbiose. O método de eletroforese bidimensional foi utilizado por Natera e colaboradores (2000) para diferenciar perfis protéicos expressos durante a interação entre o microssimbionte *Sinorhizobium meliloti* e a leguminosa *Melilotus alba*. Comparações entre mapas 2D da bactéria em cultura e na forma bacterióide, também foram feitas. Em *Azospirillum brasilense*, a indução de proteínas por exsudatos de trigo, milho, feijão e alfafa, foi demonstrada por Bastelaere e colaboradores (1993), através de análises comparativas em géis bidimensionais. Através do proteoma também foi possível demonstrar que moléculas sinalizadoras do tipo “quorum sensing” das bactérias *S. meliloti* e *Pseudomonas aeruginosa*, alteraram mais de 150 proteínas do macrossimbionte *Medicago truncatula* (ROLFE *et al.*, 2003).

Em *Rhizobium leguminosarum*, estudos proteômicos foram realizados para elucidar os efeitos de mutações em genes regulatórios e genes envolvidos na síntese de polissacarídeos (GUERREIRO *et al.*, 2000).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho é estabelecer condições para obtenção de extratos protéicos a partir de nódulos de *Phaseolus vulgaris* induzidos por *Rhizobium* sp. NGR234 e sua estirpe isogênica *nopJ* e separar as proteínas em gel bidimensional.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar *Phaseolus vulgaris* mantendo as raízes isentas de bactérias e induzir a formação de nódulos através de inoculação com por *Rhizobium* sp. NGR234 e estirpe *nopJ*.
- Produzir extratos protéicos dos nódulos obtidos 30 e 45 dias após inoculação.
- Obter o perfil protéico através de géis de eletroforese bidimensionais

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 ESTRATÉGIA GERAL

As proteínas efetoras T3SS de diversos organismos interagem com proteínas alvo dos hospedeiros, podendo alterar suas atividades ou modificar as proteínas alvo (fosforilação, desfosforilação, proteólise) ou sofrer modificações. A expressão de proteínas durante a interação entre o *Phaseolus vulgaris* e *Rhizobium* sp. foi analisada através da obtenção de géis bidimensionais, a partir de extratos protéicos de nódulos inoculados com a estirpe selvagem NGR234 e uma estirpe mutante *nopJ*-.

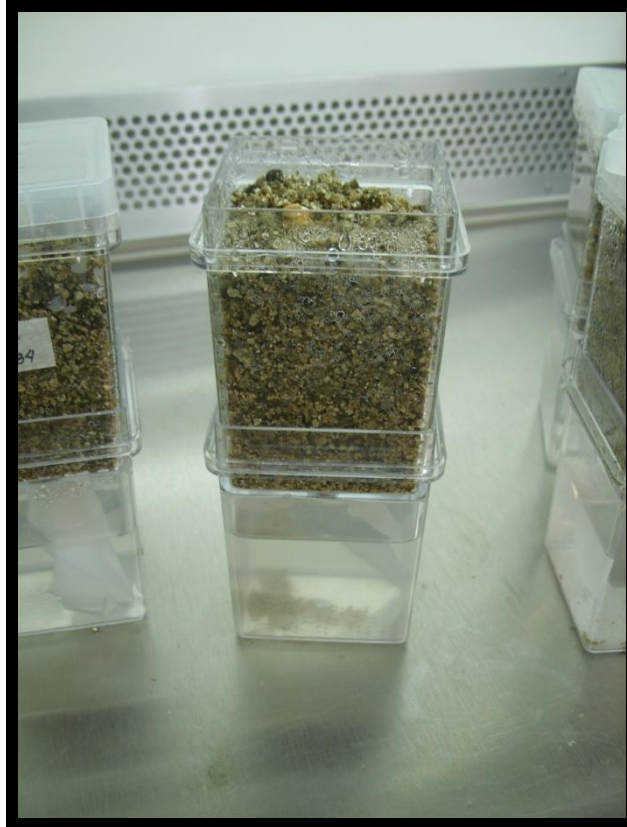
#### 3.2 CULTIVO DAS PLANTAS PARA OBTENÇÃO DOS NÓDULOS

Para o cultivo das plantas, sementes de *Phaseolus vulgaris* BAT93 (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT) foram esterilizadas por imersão em ácido sulfúrico concentrado por 10 minutos, com agitação manual suave. Em seguida, foram lavadas com água ultra pura (Milli-Q) estéril por no mínimo 6 vezes para remoção do ácido. Uma vez esterilizadas, as sementes foram transferidas para placas de petri contendo B&D + ágar (BROUGHTON & DILWORTH, 1971) e estas foram envolvidas com papel alumínio para manter condições de pouca luz e incubadas a temperatura de 27° C. Após três dias, as raízes já estavam com cerca de 3 cm e as plântulas foram transferidas para frascos Magenta previamente preparados (FIGURA 1).

Os frascos Magenta apresentam um compartimento superior e outro inferior, que foram preenchidos com vermiculita previamente lavada em água corrente por 5 horas e B&D, respectivamente. A umidade foi mantida durante o desenvolvimento da planta através de uma tira de papel filtro parcialmente imersa no B&D, atravessando um orifício no frasco em direção ao compartimento superior. Após a montagem

desse sistema, os frascos foram tampados e autoclavados por 20 minutos a 120° C, para então estarem prontos para receber as sementes germinadas.

**FIGURA 1** - FRASCO MAGENTA PREPARADO PARA RECEBER SEMENTE PRÉ-GERMINADA



FONTE: O autor (2009)

Com auxílio de pinça estéril, as sementes foram cuidadosamente transferidas e acomodadas na vermiculita, mantendo as raízes voltadas para baixo. Os frascos foram novamente tampados e colocados em casa de vegetação por dois dias. Após esse período, com aproximadamente 5 cm e folhas desenvolvidas, as plantas foram destampadas, cobertas com uma camada de cerca de 1 cm de partículas de polipropileno estéreis para evitar contaminação externa, e inoculadas com bactérias das estirpes *Rhizobium sp.* NGR234 ou o mutante *nopJ*.

Foram cultivados dois lotes de plantas. O primeiro constituído por 13 mudas, das quais 8 foram inoculadas com NGR234, 4 com o mutante *nopJ* e uma não recebeu inóculo para servir de controle. O segundo apresentava 22 plantas, sendo 15 inoculadas com NGR234, 6 com *nopJ* e uma sem inóculo.

O cultivo foi conduzido no período de 14 de abril a 3 de junho na casa de vegetação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, Setor de

Ciências Biológicas, sob condições de temperatura controlada a 28° C. A luminosidade não foi controlada artificialmente.

As coletas foram realizadas em dois momentos, sendo um aos 30 e outro aos 45 dias após a inoculação. As raízes foram lavadas e tiveram seus nódulos destacados e armazenados a -80° C até o momento da utilização. Partes aéreas e massa total de nódulos de cada planta do segundo lote foram pesados para posterior análise.

### 3.2.1 Composição do B&D

A composição das soluções utilizadas para o preparo de B&D estão listadas na tabela 1.

**TABELA 1 - SOLUÇÕES ESTOQUE PARA O PREPARO DE B&D**

<b>Solução A</b>	CaCl <sub>2</sub>	2M
<b>Solução B<sub>1</sub></b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1M
<b>Solução B<sub>2</sub></b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1M
<b>Solução C</b>	FeC <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>7</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,02M
<b>Solução D</b>	Solução de oligoelementos: MgSO <sub>4</sub> 0,5M; K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5M; MnSO <sub>4</sub> 2mM; H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 4 mM; ZnSO <sub>4</sub> 1mM; CuSO <sub>4</sub> 4 mM; CoSO <sub>4</sub> 0,2 mM; Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 0,2 mM.	

FORNTE: BROUGHTON & DILWORTH (1971)

No preparo do B&D cada solução foi diluída 2000 vezes, mantendo as soluções na mesma proporção. Depois de pronto foi autoclavado a 120° C por 20 min, para evitar possíveis contaminações.

### 3.3 CULTIVO BACTERIANO

As estirpes NGR234 e *nopJ*, listadas na tabela 2, foram inicialmente cultivadas em 2ml de meio TY, contendo os antibióticos adequados. A incubação foi feita por 2 dias a 27° C e agitação de 150rpm. Depois de crescidas, 100µl foram inoculados em 5ml de meio RMS e incubado sob as mesmas condições por 2 dias.

Após essa etapa, foi determinada a  $DO_{600}$  de 1ml da cultura em RMS. Um mililitro da cultura foi centrifugado e o pellet ressuspenso em uma solução estéril de sulfato de magnésio 10mM, de forma a obter uma  $DO_{600}$  de 0,7. Em seguida, a amostra obtida foi diluída 10X em sulfato de magnésio 10mM estéril para poder ser inoculada na planta. Cada planta foi inoculada, ao redor das raízes, com 300 $\mu$ l da diluição obtida, com auxílio de micropipeta.

**TABELA 2 - ESTIRPES UTILIZADAS E SUAS CARACTERÍSTICAS.**

<b>NGR234</b>	Rif <sup>R</sup> estirpe selvagem	Lewin <i>et al.</i> , (1990)
<b>NGR<math>nopJ</math></b>	Spec <sup>R</sup> derivado do tipo selvagem de NGR234 contendo cassette que confere resistência a espectinomicina no gene <i>nopJ</i> .	Deakin, W. não publicada.

Os meios TY (*tryptone-yeast*) e RMS foram utilizados para o cultivo das estirpes de *Rhizobium*. Estes foram acrescidos das seguintes concentrações de antibióticos: rifampicina (Rif) 100 $\mu$ g/mL; espectinomicina (Spec) 50  $\mu$ g/mL. O cultivo destas estirpes foi a 28°C. As estirpes foram estocadas em glicerol 50% a -20°C.

### 3.3.1 Meios de cultivo

A composição do meio TY está listada na tabela 3.

**TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA TY (TRIPTONE-YEAST)**

<b>Extrato de levedura</b>	3,0 g/l
<b>CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O</b>	6 mM
<b>Triptona</b>	5,0 g/l

FONTE: BERINGER (1974)

O meio RMS foi preparado a partir de soluções estoque individuais (TABELA 4), que foram adicionadas a um volume desejado de água estéril.

As soluções I-A, I-B, II, II e IV foram autoclavadas, enquanto a de succinato de sódio foi filtrada.

Para o preparo de meio RMS foram adicionados 0,1% das soluções I-A, I-B e II e 0,01% das soluções III, IV e de vitaminas. Como fonte de carbono foram adicionados 0,1% de solução de succinato de sódio 1,2M.

TABELA 4 - SOLUÇÕES ESTOQUE PARA PREPARO DE RMS

<b>Solução I-A</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2M
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1M
	NaCl	0,25M
<b>Solução I-B</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,6M
<b>Solução II</b>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2M
<b>Solução III</b>	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,06M
<b>Solução IV</b>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5M
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5M
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	2mM
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4mM
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1mM
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	4mM
	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2mM
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2mM
<b>Solução de vitaminas de Gamborg 1000X (Sigma)</b>		
<b>Succinato de sódio</b>		1,2M

FONTE: BROUGHTON & DILWORTH (1971)

### 3.4 PREPARO DOS EXTRATOS PROTÉICOS

Uma vez que não há protocolo descrito para extração de proteínas de nódulos de *Phaseolus*, foi testado inicialmente o método descrito no “*GE Healthcare – 2-D electrophoresis Handbook*”, fornecido pela GE Healthcare, com algumas modificações. Apenas a amostra correspondente aos nódulos coletados nas plantas com 30 dias, inoculadas com *nopJ*, foram submetidas à extração, para verificar a eficiência do método. Os nódulos armazenados a -80° C foram triturados em nitrogênio líquido, e em seguida foram adicionados 500µl de tampão de lise (Uréia 8M, CHAPS 4%, Tris-Cl pH 8 35mM, PMSF 1mM, EDTA 5mM, DTT 40mM) em cada amostra e estas foram homogeneizadas. Em banho de gelo, foram sonicadas (15 x 10 segundos, sonicador “*Ultrasonic Processor XL Heat Systems*) para lisar possíveis células não rompidas pelo tampão de lise e para degradação de ácidos nucleicos. Após essa etapa, a amostra foi deixada em gelo e sob agitação para que o máximo de proteínas fosse solubilizado, e centrifugada por 30 min a 4° C, em rotação de 12000 x g. O sobrenadante constitui o extrato protéico.

A concentração das proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando BSA como padrão. O sistema de reação foi composto por 1 mL da solução corante de Bradford-Coomassie Brilliant Blue G-250 e 100 µL da amostra. A mistura foi homogeneizada e a absorbância a 595 nm foi verificada. Uma curva padrão com soro albumina bovina (BSA) foi feita como referência.

Um segundo método de extração de proteínas, utilizando fenol, foi testado para os nódulos coletados das plantas com 45 dias. Os nódulos foram triturados com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e adicionado tampão de extração gelado (tabela 5) contendo 15% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) para promover adsorção de compostos fenólicos (ISAACSON, T. *et al*, 2006).

**TABELA 5 - TAMPÃO DE EXTRAÇÃO PARA MÉTODO COM FENOL**

<b>Sacarose</b>	0,7 M
<b>KCl</b>	0,1 M
<b>Tris – HCl pH 7,5</b>	0,5 M
<b>EDTA</b>	50 mM
<b>β-mercaptoetanol</b>	2%
<b>PMSF</b>	1 mM

FONTE: ISAACSON *et al.* (2006)

Às amostras foi acrescentado mesmo volume de fenol saturado com Tris-HCl, pH 8 seguido de agitação por 30 min a 4° C. Após essa etapa, foram centrifugadas a 12000 x g, por 30 min a 4° C. Observou-se a formação de duas fases, sendo que a inferior foi descartada, pois corresponde à sacarose com PVPP, restos celulares, carboidratos, ácidos nucléicos e sais; enquanto que a superior, contendo as proteínas solubilizadas, pigmentos e lipídios, foi recolhida para um novo tubo. Esta corresponde à fase fenólica, à qual foi submetida a lavagens com o mesmo tampão para remoção de moléculas solúveis em água que ainda estivessem presentes. Foi adicionado tampão de extração em um volume correspondente ao das fases fenólicas obtidas em cada amostra, seguido de agitação e centrifugação, recolhendo a fase superior e descartando a inferior, como descrito anteriormente. O processo de lavagem foi repetido duas vezes. À fase fenólica recolhida na última lavagem, foram adicionados cinco volumes de uma solução gelada de acetato de amônio 0,1M em metanol para precipitar as proteínas. As amostras foram então incubadas durante a noite a -20° C, para otimizar a solubilização.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas por 30 min a 4° C e 12000 x g e os sobrenadantes descartados. O pellet obtido foi lavado com 1ml de metanol gelado, seguido de centrifugação por 10 min sob as mesmas condições. Essa etapa foi repetida duas vezes para remover completamente acetato de amônio, fenol, lipídios e pigmentos. Novamente o processo de lavagem foi repetido duas vezes, porém utilizando acetona em substituição ao metanol. As amostras permaneceram



secando para eliminar os traços de acetona, pois estes podem interferir na solubilização das proteínas.

O pellet foi ressuspendido em 300µl de tampão de extração, adicionado de 4 µl de DTT 1M e 1 µl de PMSF 0,1M, pois estes foram eliminados nas lavagens. Aos 300µl de cada amostra, foram adicionados 1,5M de tiouréia (0,0342g) e 0,25% de SDS, seguido de agitação em gelo durante a noite. As amostras foram sonicadas 6 vezes por 5 segundos para favorecer a solubilização e em seguida centrifugadas a 12000 x g por uma hora a 4º C. Os sobrenadantes recolhidos foram dosados pelo método de Bradford (1976) descrito anteriormente.

### 3.5 OBTENÇÃO DE PERFIL ELETROFORÉTICO BIDIMENSIONAL

Os géis bidimensionais foram feitos conforme os protocolos da GE Healthcare, com algumas modificações.

A focalização isoeétrica (IEF) foi realizada utilizando tiras de pH 4-7 imobilizado (IPG), com 13 cm, da GE Healthcare. As tiras foram reidratadas por 16 horas em suporte apropriado, contendo solução de reidratação, DTT, IPG buffer pH 4-7 e a amostra, completando 250µl, nas proporções apresentadas na tabela 6.

**TABELA 6 - SOLUÇÃO DE REHIDRATAÇÃO DA TIRA IPG**

<b>IPG buffer pH 4-7 (GE Healthcare)</b>	1,5%
<b>DTT</b>	50mM
<b>Amostra</b>	400µg de proteína, calculado conforme resultado da dosagem
<b>Tampão de reidratação (GE Healthcare)</b>	Até completar 250µl

FONTE: (GE Healthcare)

A solução resultante foi incubada por 30 minutos em gelo para otimizar a atuação dos anfólitos presentes no IPG buffer. Após esse período, os 250µl da solução foram colocados na canaleta onde a tira foi então encaixada com o gel voltado para baixo, totalmente banhada pela solução de hidratação. O sistema foi coberto com óleo mineral (“*Drystrip Cover Fluid*”) e incubado por 16 horas para hidratar a tira.

As proteínas extraídas pelo primeiro método testado foram submetidas à isoeletrofocalização logo após o período de rehidratação. A IEF foi realizada em equipamento IPGphor II (GE Healthcare), durante 4 etapas e a 20° C. Os procedimentos foram feitos conforme os protocolos da GE Healthcare (tabela 7).

**TABELA 7 - PROGRAMA PARA ISOELETROFOCALIZAÇÃO NO IPGPHOR UTILIZADO COM AS AMOSTRAS SUBMETIDAS AO PRIMEIRO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO**

<b>Step 1</b>	500 V	1h
<b>Step 2</b>	100 V	1h
<b>Step 3</b>	8000 V	2h30
<b>Step 4</b>	8000 V	0h30

FONTE: (GE Healthcare)

Na tentativa de melhorar a focalização, foi realizada uma reprogramação no IPGphorII, modificando as etapas do processo. O novo protocolo para corrida na primeira dimensão foi aplicado às amostras submetidas ao segundo método de extração de proteínas, e está descrito na tabela 8.

**TABELA 8 - PROGRAMA PARA ISOELETROFOCALIZAÇÃO NO IPGPHOR UTILIZADO COM AS AMOSTRAS SUBMETIDAS AO SEGUNDO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO**

<b>Step 1</b>	200 W	0,2 kV/h
<b>Step 2</b>	500 W	0,2 kV/h
<b>Step 3</b>	1000 W	0,8 kV/h
<b>Step 4</b>	8000 W	11,3 kV/h
<b>Step 5</b>	8000 W	12,0 kV/h

FONTE: (GE Healthcare)

Após a isoeletrofocalização, as tiras foram equilibradas por 30 minutos em 5ml de tampão de equilíbrio (tabela 9) adicionado de 50mg de DTT, e por mais 30 minutos em 5 ml do mesmo tampão adicionado de 200mg de iodoacetamida, totalizando uma hora de equilíbrio em gangorra para homogeneização.

**TABELA 9 - TAMPÃO DE EQUILÍBRIO DAS TIRAS IPG**

<b>1,5M Tris-HCl pH 8,8</b>	50mM
<b>Uréia</b>	6M
<b>Glicerol</b>	30%
<b>SDS</b>	2%
<b>Azul de Bromofenol</b>	Traço

FONTE: (GE Healthcare)

Após os dois passos de equilíbrio as tiras foram submersas rapidamente em tampão de corrida (LAEMMLI, 1970), descrito na tabela 10, e imediatamente submetidas à segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

**TABELA 10 - TAMPÃO DE CORRIDA 1X (LAEMMLI BUFFER)**

<b>Tris</b>	25mM
<b>Glicina</b>	190mM
<b>SDS</b>	0,1%

FONTE: LAEMMLI (1970)

A eletroforese em condições desnaturantes das proteínas presentes nas tiras IPG foi feita conforme a metodologia descrita por LAEMMLI (1970), em gel de poliacrilamida 12% (TABELA 11) na presença de SDS (SDS-PAGE).

**TABELA 11 - COMPOSIÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA PARA SEGUNDA DIMENSÃO**

<b>Acrilamida:bis-acrilamida</b>	12%
<b>1,5M Tris (pH 8,8)</b>	0,375M
<b>SDS</b>	0,1%
<b>Persulfato de amônio</b>	0,05%
<b>Temed</b>	0,05%
<b>Volume final</b>	40ml

FONTE: (GE Healthcare)

As tiras IPG foram mergulhadas por alguns minutos no tampão de corrida e em seguida posicionadas horizontalmente no topo do gel, mantendo pleno contato com este. Os géis foram feitos em cuba tipo “*Hoefler SE 600 Ruby*” da GE Healthcare e apresentavam 18 cm x 16 cm. As tiras foram cobertas com agarose *sealing* (agarose 0,5% em tampão Laemmli, contendo traços de azul de bromofenol) morna e esperou-se solidificar. A corrida foi feita limitando-se a corrente a 15 mA/gel, durante os 30 minutos iniciais, e 30mA/gel no tempo restante, até o azul de bromofenol atingir o limite inferior do gel. A temperatura foi mantida a 11°C por meio de refrigeração com circulador termostático Multitemp II. Após corrida, os géis permaneceram por uma hora em solução fixadora (1,3% Ácido orto-fosfórico e 20% Metanol) antes de serem corados.

Em seguida, foram incubadas em Coomassie coloidal (TABELA 12) até a visualização dos pontos protéicos.

**TABELA 12 – COOMASSIE COLOIDAL**

<b>Ácido orto-fosfórico</b>	0,8%
<b>Metanol</b>	20%
<b>Sulfato de Amônio</b>	8%
<b>Coomassie Blue G-250</b>	0,08%

FONTE: BLUM *et al.* (1987)

Após coloração, os géis foram transferidos para solução de neutralização (Tris-ácido ortofosfórico 0,1M pH 6,5) por 3 minutos e na sequência lavados com metanol 25% por 1 minuto. Em seguida, os géis foram incubados por uma hora em solução de sulfato de amônio 20% e foram transferidos para água destilada. As imagens foram obtidas por escaneamento utilizando o 2D Master Gel Imager (GE Healthcare).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO DOS NÓDULOS DE *Phaseolus vulgaris* INDUZIDOS POR *Rhizobium* sp.

Em experimentos em casa de vegetação, a inoculação de feijão (*Phaseolus vulgaris*) de diversas variedades, com a estirpe selvagem de NGR234 contribui pouco para o aumento da massa úmida de parte aérea, quando estas são comparadas com controles não inoculados (Lariguet, P. em preparação). Entretanto, a inoculação com a estirpe *nopJ*-, induz um aumento significativo no peso de parte aérea, bem como do número de nódulos, quando comparado com a estirpe selvagem. O produto do gene *nopJ*, a proteína NopJ, é uma proteína efetora secretada pelo sistema de secreção do tipo III. Proteínas secretadas por este sistema são diretamente injetadas no interior do citoplasma da célula vegetal hospedeira, onde suas funções são variáveis, mas estão geralmente envolvidas com o controle do sistema de defesa da planta, favorecendo a colonização.

Em *Rhizobium* sp. NGR234 pelo menos cinco proteínas efetoras são secretadas, entre elas NopJ, cuja função ainda é desconhecida. O aumento do número de nódulos e aumento de massa úmida da parte aérea sugere, entretanto, uma função como efetora negativa durante a interação com *Phaseolus*. Sua remoção produz um efeito positivo na interação.

A análise de expressão diferencial de proteínas em nódulos de feijão inoculados com as estirpes selvagem e *nopJ* de *Rhizobium* sp. NGR234 foi realizada neste trabalho para permitir a identificação dessas proteínas, possivelmente envolvidas no processo de reconhecimento durante a interação simbiótica. A inativação de *nopJ* provavelmente permite um reconhecimento mútuo mais eficiente entre a planta e o microrganismo, culminando com uma maior eficiência de nodulação. A presença de NopJ, por outro lado, deve elicitar a resposta de defesa da planta, impedindo uma colonização eficiente. A proteína NopJ ou proteínas vegetais alvo reconhecidas por NopJ, podem desencadear a expressão ou a modificação de proteínas envolvidas na resposta durante a interação planta-bactéria e desencadear a resposta que dificulta a colonização. A ausência de uma

resposta semelhante deve produzir um perfil protéico diferente, que pode ser observado através de análise proteômica.

Para a obtenção de nódulos induzidos pela estirpe selvagem e pela estirpe *nopJ*, sementes de *P. vulgaris* BAT93 foram esterilizadas superficialmente, pré-germinadas e inoculadas com ambas as estirpes. As plantas resultantes foram incubadas por seis semanas e os nódulos coletados em dois momentos. Na primeira coleta, apenas nódulos da estirpe *nopJ* foram coletados, aos 30 dias após a inoculação. As plantas estavam estioladas, com algumas folhas amareladas, provavelmente decorrentes de condições não ideais para seu cultivo. Os nódulos coletados exibiam diferentes características e foram classificados em: Fix<sup>+</sup> - grandes e de coloração rosada, decorrente da produção de leghemoglobina, indicando que a fixação de nitrogênio está funcional; Fix<sup>-</sup> - nódulos verdes, pouco abundantes, não produtores de leghemoglobina; pseudonódulos – nódulos brancos e pequenos, normalmente não colonizados.

A segunda coleta foi realizada aos 45 dias após a inoculação dos rizóbios. Plantas inoculadas com ambas as estirpes foram abertas e os nódulos coletados de suas raízes. As plantas estavam ainda mais amareladas e pouco vistosas.

Em plantas inoculadas com NGR234, foram detectados muitos nódulos verdes e pseudonódulos, que foram coletados, mas não utilizados para a obtenção de extratos protéicos. As plantas inoculadas com *nopJ* apresentavam maior quantidade de nódulos ativos e pseudonódulos. Os nódulos foram coletados e pesados, bem como o peso da parte aérea das plantas foi determinado. O controle não inoculado não apresentou nódulos, indicando que não houve contaminação de outros rizóbios durante o experimento.

O peso médio da parte aérea e nódulos por planta foi comparado entre as diferentes estirpes e é mostrado na tabela 13.

**TABELA 13** - COMPARAÇÃO DO PESO MÉDIO EM GRAMAS DAS PARTES AÉREAS E NÓDULOS POR PLANTA ENTRE AS DIFERENTES ESTIRPES UTILIZADAS

	<b>NGR234</b>	<b><i>nopJ</i></b>	<b>Controle</b>
<b>Parte aérea</b>	1,0771 g (± 0,35)	1,42885 g (± 0,47)	1,4030 g
<b>Nódulos Fix<sup>+</sup> por planta</b>	0,1169 g (± 0,06)	0,17220 g (± 0,14)	0

FONTE: O autor (2009)

Os resultados apresentados na tabela 13, bem como o aspecto visual das plantas analisadas (FIGURA 2) mostram que, nas condições experimentais

utilizadas, as diferenças observadas são menores que as observadas por outros autores (Lariguet, P., dados não publicados), porém são visualmente perceptíveis.

**FIGURA 2 – PLANTAS AOS 45 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO**



FONTE: O autor (2009)

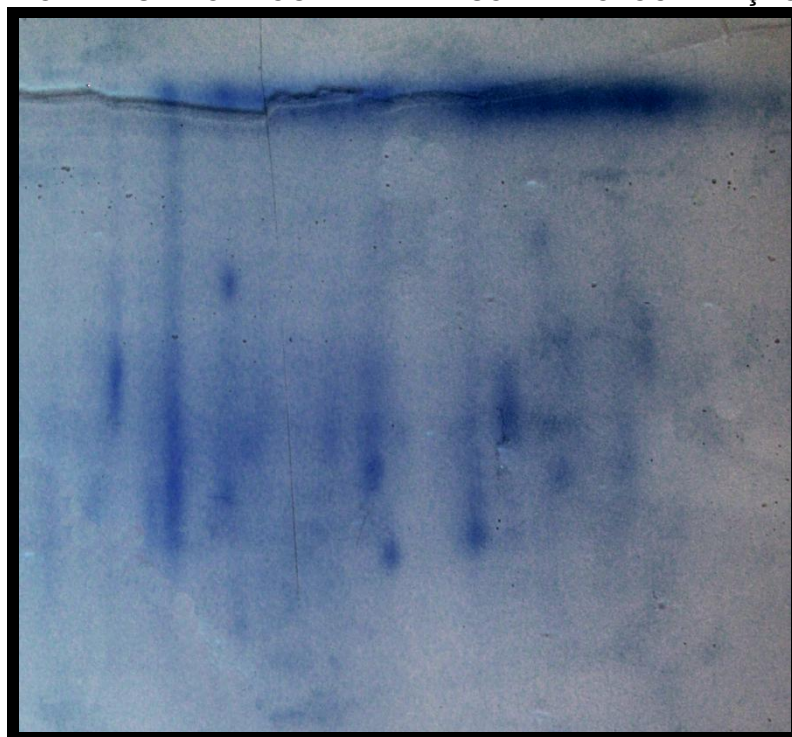
#### 4.2 ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Na ausência de um protocolo específico para extração de proteínas de nódulos de feijão, foi testado inicialmente o método descrito no “*GE Healthcare – 2-D electrophoresis Handbook*”, com algumas modificações. Uma amostra com nódulos da estirpe *nopJ* foi submetida a esse método e o gel resultante não foi satisfatório.

O perfil protéico observado sugere que a isoeletrofocalização não foi adequada, pois não foi possível a visualização de pontos protéicos definidos no gel (FIGURA 3), o que não permitiu a realização de qualquer análise.

Buscando estabelecer o protocolo para extração das proteínas de nódulos, o método do Fenol, descrito por Isaacson e colaboradores (2006), foi testado em amostras de nódulos induzidos por *nopJ* e NGR234.

**FIGURA 3** - PERFIL PROTÉICO OBTIDO DE NÓDULOS SUBMETIDOS AO PROTOCOLO 1 DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E AO PROGRAMA 1 DE ISOELETROFOCALIZAÇÃO



FONTE: O autor (2009)

Os resultados obtidos na dosagem de proteínas, descritos na tabela 14, sugerem que o primeiro método utilizado é mais eficiente, pois maior quantidade de proteínas foi obtida durante o processo de extração. Porém, o resultado no gel 2-D não é satisfatório. Provavelmente a interferência de compostos presentes no primeiro método não permite uma boa focalização e inviabiliza sua utilização neste caso.

**TABELA 14** – CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DOS EXTRATOS PROTÉICOS OBTIDOS

Amostra	Método de extração	Concentração
<i>nopJ</i>	1	5,54 µg/µl
NGR234	2	3,25 µg/µl
<i>nopJ</i>	2	3,31 µg/µl

FONTE: O autor (2009)

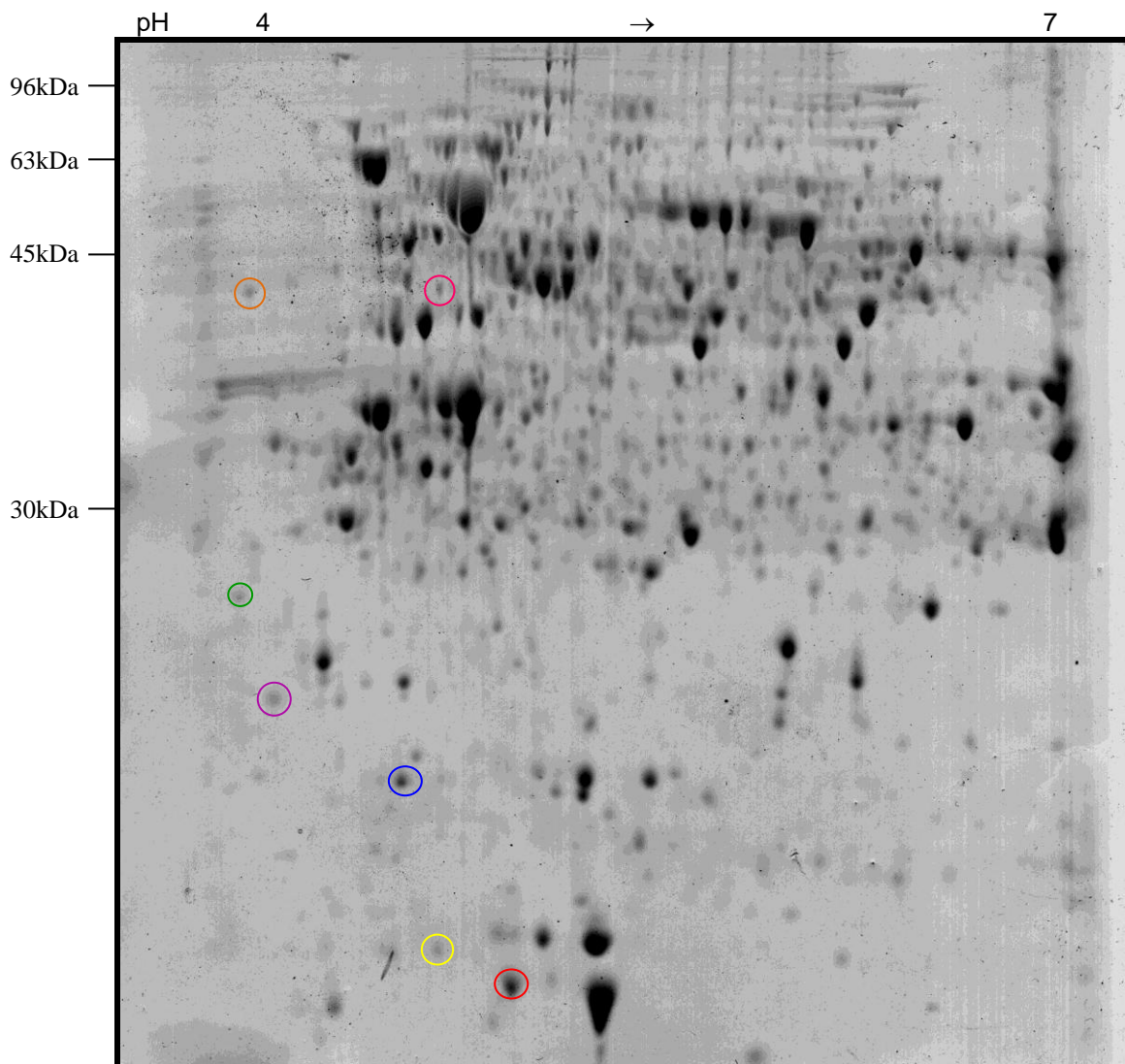
Os géis bidimensionais obtidos a partir das amostras submetidas ao método do Fenol, confirmam a eficiência deste para extração de proteínas de nódulos, apesar da redução da quantidade de proteínas em relação ao método anterior. O gel apresentou maior resolução, pontos protéicos definidos e pouco arraste. Portanto, este protocolo foi definido para a extração de proteínas de nódulos neste estudo.



### 4.3 ANÁLISE DOS GÉIS BIDIMENSIONAIS

Após extração das proteínas, determinação da sua concentração nos extratos obtidos, estas foram submetidas à iso-eleto-focalização, para separação em função do seu ponto isoelétrico, e posteriormente, à separação por massa molecular. Os géis bidimensionais foram corados com Coomassie coloidal, escaneados e analisados quanto ao número de “spots”, com auxílio do Programa Imagemaster™ 2D, versão 2002.01 (GE Healthcare). As figuras 2 e 3 representam os géis 2-D referentes ao NGR234 e *nopJ*, respectivamente.

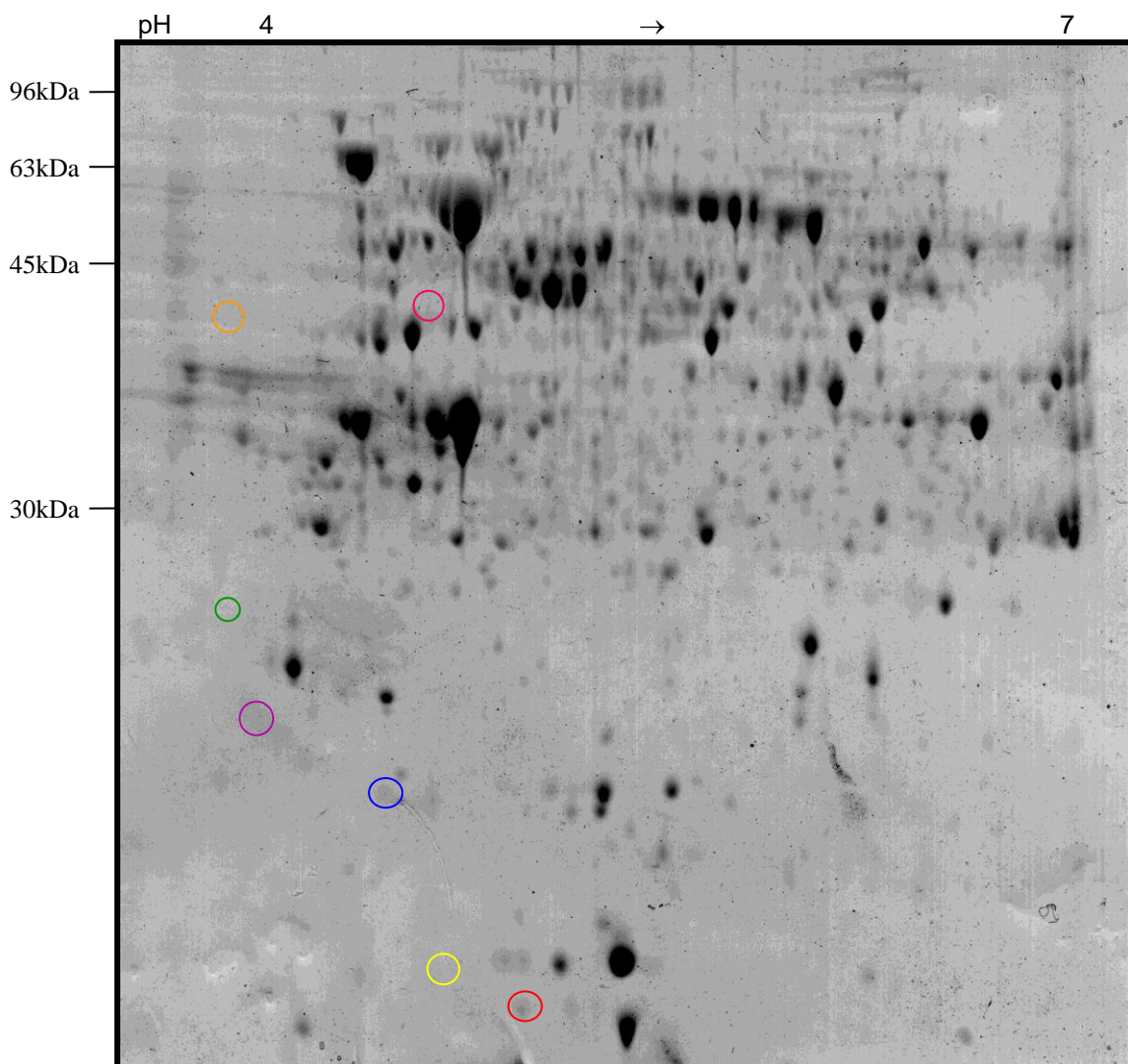
**FIGURA 4 - PERFIL PROTÉICO DE NÓDULOS INDUZIDOS POR NGR234**



FONTE: O autor (2009)

Uma análise preliminar dos géis obtidos para as duas estirpes mostra que o perfil é muito semelhante. A intensidade geral dos “spots” da estirpe *nopJ* é menor que da NGR234, o que dificulta a comparação entre os géis. Entretanto, as proteínas indicadas por círculos coloridos exibem diferença de intensidade, que deve ser decorrente do diferente genótipo das estirpes utilizadas. As proteínas fracionadas no gel são de origem bacteriana, bem como vegetal e análises posteriores deverão permitir sua identificação.

**FIGURA 5** - PERFIL PROTÉICO DE NÓDULOS INDUZIDOS POR *nopJ*



FONTE: O autor (2009)

O número de proteínas detectadas em um gel não pode ser inferido a partir do número de “spots”, pois produtos protéicos de múltiplos genes podem migrar para mesma coordenada em um gel bidimensional (ZHANG & CHAIT, 2000; HANCOCK

*et al.*, 2002). Também é possível que a mesma proteína esteja presente em diversas regiões no gel (HESKETH *et al.*, 2002). Tal fato ocorre devido a modificações pós-traducionais, que podem alterar o ponto isoelétrico e a massa molecular da proteína. Porém, para um reconhecimento mais detalhado é necessário uma análise espectrométrica e identificação de proteínas.

Neste trabalho foi possível estabelecer um protocolo para a obtenção de extratos protéicos que puderam ser resolvidos em gel de eletroforese bidimensional de nódulos de *P. vulgaris*, induzidos por duas estirpes de *Rhizobium* sp. Novos géis serão obtidos para produzir um perfil protéico representativo de tais nódulos e deverá permitir a identificação das proteínas, bem como de proteínas expressas em diferentes quantidades em ambas as estirpes.

## 6 CONCLUSÕES

- Um método de extração de proteínas de nódulos de *P. vulgaris* induzidos por *Rhizobium* sp. foi estabelecido.

- Análises preliminares permitiram apenas a identificação de potenciais proteínas diferencialmente expressas entre as estirpes *nopJ* e NGR234.

## REFERÊNCIAS

ABBOT, A. News briefing: A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. **Nature**, v.402, p.715-720, 1999.

AEBERSOLD, R. Constellations in a cellular universe. **Nature**, v.422, p.115-116, 2003.

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology, Reading**, v. 47, p. 996-1006, 1997.

BARTSEV, A., KOBAYASHI, H. AND BROUGHTON, W.J. Rhizobial signals convert pathogens to symbionts at the legume interface. In: GILLINGS, M. AND HOLMES, A. Plant Microbiology (Ed.). **Garland Science / BIOS Scientific**, Abingdon, UK, p. 19–31, 2004.

BASTELAERE, E.V.; MOT, R.D.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J. Differential gene expression in *Azospirillum spp.* by plant root exsudates: Analysis of protein profiles by two-dimensional gel electrophoresis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.112, p.335-342, 1993.

BERINGER, J.E. R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v. 84, p. 188-198, 1974.

BIOLOGICAL nitrogen fixation: the global challenge & future needs. A position paper, discussed at The Rockefeller Foundation Bellagio Conference Centre, Lake Como, Italy, 83 p., 1997.

BLACKSTOCK, W.P.; WEIR, M.P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Reviews: TIBTECH**, v.17, p.121-127, 1999.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BOHLOOL, B.B.; LADHA, J.K.; GARRITY, D.P.; GEORGE, T. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 141, n.1, p.1-11, 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROUGHTON, W. J.; AND DILWORTH, M. J. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. **Biochemistry Journal**, 125:1075-1080, 1971.

BROUGHTON, W.J.; HANIN, M.; RELIĆ, B.; KOPCINSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; SIMS, EK, S.; OJANEN-REUHS, T.; REUHS, B. *et al.* Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. strain NGR234- legume symbioses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 188, p. 3654–3663, 2006.

BUTTNER, D.; BONAS, U. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. **Microbiology**, Curr. Opin, v. 9, p. 193–200, 2006.

CAHILL, D.J.; NORDHOFF, E.; O'BRIEN, J.; KLOSE, J.; EICKHOFF, H.; LEHRACH, H. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S.R; DUNN, M.J (Ed.). Proteomics from protein sequence to function. **BIOS Scientific Publishers Limited**, p. 1-22, 2001.

CASH, F. Review: Characterization of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. **Anal. Chimica Acta**, v.372, p.121-145, 1998.

CHUEIRE, L. M. O. Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas de soja e do feijoeiro. **Embrapa-CNPSo**, Londrina, 32 p., 2000.

CHUMAKOV, M.I. Involvement of superficial polysaccharides and proteins of *Rhizobiaceae* in attachment to plant surface. **Microbiology**, New York, v. 65, p. 631-643, 1996.

DE TORRES, M.; MANSFIELD, J. W.; GRABOV, N.; BROWN, I. R.; AMMOUNEH, H.; TSIAMIS, G.; FORSYTH, A.; ROBATZEK, S.; GRANT, M.; BOCH, J. *Pseudomonas syringae* effector AvrPtoB suppresses basal defence in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 47, p.368-382, 2006.

DEAKIN, W. J.; MARIE, C.; SAAD, M. M.; KRISHNAN, H. B.; BROUGHTON, W. J. NopA is associated with cell surface appendages produced by the type III secretion

system of *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, p. 499-507, 2005.

DILWORTH, M.J.; GLENN, A.R. Biology and biochemistry of nitrogen fixation. **Elsevier Science**, Amsterdam, 1991.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of nitrogen fixation. **Nat Rev Microbiol.**, v. 2, p. 621–631, 1994.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.44, n.5, p.310-313, 1992.

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (Ed.). Biological Nitrogen Fixation. **Chapman and Hall**, New York, p. 1-42, 1992.

FISHER, R.F.; LONG, S.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. **Journal of Molecular Biology**, v. 233, p. 336–348, 1993.

FLORES, M.; MAVINGUI, P.; GIRARD, L.; PERRET, X.; BROUGHTON, W. J.; MARTÍNEZ- ROMERO, E.; DA VILA, G.; PALACIOS, R. Three replicons of *Rhizobium* sp. strain NGR234 harbor symbiotic gene sequences. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 6052– 6053, 1998.

FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathológica**, São Paulo, v.20, n.1, p.68-74, 1994.

FREIBERG, C.; FELLAY, R.; BAIROCH, A.; BROUGHTON, W. J.; ROSENTHAL, A.; PERRET, X. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. **Nature**, v. 387, p. 394-401, mai. 1997.

GRAVES, P.R.; HAYSTEAD, T.A.J. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, p.39-63, 2002.

GUERREIRO, N.; KSENZENKO, V.N.; DJORDJEVIC, M.A.; IVASHINA, T.V.; ROLFE, B.G. Elevated levels of synthesis of over 20 proteins results after mutation of the *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide synthesis gene *pssA*. **Journal of Bacteriology**, v.182, p.4521-4532, 2000.

HANCOCK, W.S.; WU, S.L.; STANLEY, R.; GOMBOCZ, E.A. Publishing large proteome datasets: scientific policy meets emerging technologies. **Trends Biotech.**, v.20, p.S39-S44, 2002.

HAYNES, P.; YATES, J, R. Review article: Proteome profiling – pitfalls and progress. **Yeast**, v.17, p.81-87, 2000.

HERBERT, B.R.; LARRY, J.L.; PACKER, N.H.; GOOLEY, A.A.; PEDERSON, S.K. What place for polyacrilamide in proteomics? **Trends Biotech.**, v.19, 2001.

HESKETH, A.R; CHANDRA, G.; SHAW, A.D.; ROWLAND, J.J.; KELL, D.B.; BIBB, M.J.; CHATER, K.F. Primary and secondary metabolism, and post translational protein modifications as portrayed by proteomic analysis of *Streptomyces coelicor*. **Molecular Microbiology**., v.46, p.917-932, 2002.

ISAACSON, T.; DAMASCENO, C.M.; SARAVANAN, R.S.; HE, Y.; CATALÁ, C.; SALADIÉ, M.; ROSE, J.K. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. **Nature protocols**, v. 1, p. 769-74, 2006.

JOCELYN, H.; ILAG, L. Dividing and conquering proteomics. **Proteomics**, p.96-98, 2002.

JUNGBLUT, P.R. Proteome analysis of bacterial pathogens. **Microbes Infect.**, v.3, p.831-840, 2001.

KANNENBERG, E.; CARLSON, R.W. An abundance of Nod factors. **Chemistry & Biology**, v. 12, p. 956–958, 2005.

KESHAVARZI, M.; SOYLU, S.; BROWN, I.; BONAS, U.; NICOLE, M.; ROSSITER, J.; MANSFIELD, J. W. Basal defenses induced in pepper by lipopolysaccharides are suppressed by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, p. 805-815, 2004.

KOBAYASHI, H.; NACIRI-GRAVEN, Y.; BROUGHTON, W.J.; PERRET, X. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of nod-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. **Molecular Microbiology**, v. 51, p.335-347, 2004.



LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, v. 277, p. 680-685, 1970.

LEWIN, A.; CERVANTES, E.; CHEE-HOONG, W.; BROUGHTON, W. J. *nodSU*, two new *nod* genes of the broad host range *Rhizobium* Strain NGR234 encode host-specific nodulation of the tropical tree *Leucaena leucocephala*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 12, p. 317-326, set. 1990.

LOH, J.; STACEY, G. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 10-17, jan. 2003.

LOPEZ, M.F. Proteome analysis I. Gene products are where the biological action is. **J. Chromatography B**, v.722, p.191–202, 1999.

MARIE, C., W. J. DEAKIN, T. OJANEN-REUHS, E. DIALLO, B. REUHS, W. J. BROUGHTON, AND X. PERRET. TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, p. 958-966, 2004.

MARIE, C.; DEAKIN, W. J.; VIPREY, V.; KOPCINSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; KRISHNAN, H. B.; PERRET, X.; BROUGHTON, W. J. Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 16, p. 743–751, 2003.

MARIE, C., W. J. BROUGHTON, AND W. J. DEAKIN. *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.336-342, 2001.

MARTÍNEZ, E.; ROMERO, D.; PALACIOS, R. The *Rhizobium* genome. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v.9, p.59, 1990.

MORÓN, B.; SORÍA-DÍAZ, M. E.; AULT, J.; VERROIOS, G.; NOREEN, S.; NAVARRO, D. N. R.; SERRANO, A. G.; OATES, J. T.; MEGÍAS, M.; SOUSA, C. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. **Chemistry & Biology**, v. 12, p. 1029–1040, set. 2005.

NATERA, S.H.; GUERREIO, N.; DORDJEVIC, M.A. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, p.995-1009, 2000.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, p.837-846, 2000.

PATRIARCA, E.J.; TATE, R.; IACCARINO, M. Key role of bacterial NH<sub>4</sub>(p) metabolism in Rhizobium-plant symbiosis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 203-222, 2002.

PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 180–201, mar, 2000.

RELIC´, B.; PERRET, X.; ESTRADA-GARCIA, M.T.; KOPCIN´SKA, J.; GOLINOWSKI, W.; KRISHNAN, H.B.; PUEPPKE, S.G. AND BROUGHTON, W.J. Nod factors of Rhizobium are a key to the legume door. **Molecular Microbiology**, v. 13, p. 171–178, 1994.

ROLFE, B.G.; MATHESISUS, U.; DJODJERVIC, M.; WEINMAN, J.; HOCART, C.; WEILLER, G.; BAUER, W.D. Proteomic analysis of legume-microbe interactions. **Comparative and Functional Genomics**, v.4, p.225-228, 2003.

SCHMEISSER, C.; LIESEGANG, H.; KRYSZCIK, D.; BAKKOU, N.; LE QUÉRÉ, A.; WOLLHERR, A.; HEINEMEYER, I.; MORGENSTERN, B.; POMMERENING-RÖSER, A.; FLORES, M.; PALACIOS, R.; BRENNER, S.; GOTTSCHALK, G.; SCHMITZ, R.A.; BROUGHTON, W.J.; PERRET, X.; STRITTMATTER, A.W.; STREIT, W.R. Rhizobium sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. **Appl Environ Microbiol.**, v. 75, n. 12, p. 4035-45, jun. 2009.

SHEN, Y.; SMITH, R.D. Proteomics based on high-efficiency capillary separations. **Electrophoresis**, v.23, p.3106-3124, 2002.

SIQUEIRA, J.O.; SAFIR, G.R.; NAIR, M.G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. **New Phytologist**, v.118, p.87-93, 1991.

SMIT, G.; KIJNE, J.W.; LUGTENBERG, B.J.J. Both cellulose fibrils and Ca<sup>+2</sup>-dependent adhesin are involved in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, p. 4294-4301, 1987.

SMIT, G.; LOGMAN, T. J. J.; BOERRIGTER, M. E. T. I.; KIJNE, J. W.; LUGTENBERG, B. J. J. Purification and partial characterization of the Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesin from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, which mediates the first step in attachment of *Rhizobiaceae* cells to plant root hair tips. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, p 4054–4062, 1989.

SPRENT, J.I.; SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms. **Chapman and Hall**, 2<sup>nd</sup> ed., London, 256p, 1990.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M.G. A Variabilidade Genética do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.L): aplicações nos estudos das interações simbióticas e patogênicas. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, 59p. (Embrapa-Agrobiologia. Documentos, 126), 2000.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M.G.; MERCANTE, F.M. Fixação biológica de nitrogênio. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L.F. (Ed.). Produção do feijoeiro-comum em várzeas tropicais. **Embrapa Arroz e Feijão**, Santo Antônio de Goiás, p.121-153, 2002.

STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A.; PERRET, X.; STAEHELIN, C.; DEAKIN, W. J.; RAASCH, C.; LIESEGANG, H.; BROUGHTON, W. J. An evolutionary hot spot: the pNGR234b replicon of *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 535-542, 2004.

STRYER, L. Bioquímica. **Ed. Guanabara Koogan S. A.** Rio de Janeiro, 1000 p., 1994.

SWART, S.; LUGTENBERG, B.J.J.; SMIT, G.; KIJNE, J.W. Rhicadhesin-mediated attachment and virulence of an *Agrobacterium tumefaciens* chvB mutant can be restored by growth in a highly osmotic medium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, p. 3816-3819, 1994.

VIBOUD, G.I.; BLISKA, J.B. Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, v. 59, p. 69–89, 2005.

VIPREY, V., DEL GRECO, A., GOLINOWSKI, W., BROUGHTON, W. J., PERRET, X. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. **Molecular Microbiology**. v. 28, p.1381-1389, 1998.

VIPREY, V.; ROSENTHAL, A.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X. Genetic snapshots of the *Rhizobium* species NGR234 genome. **Genome Biology**, v. 1, n. 6, dez. 2000.

WILKINS, J.A.; LI, A.; NI, H.; STUPACK, D.G.; SHEN, C. Control of  $\alpha 1$  integrin function. **Journal Biol. Chem.**, v. 271, p. 3046-3051, 1996.

WILKINS, M.R.; HOCHSTRASSER, D.F. **Thinking bigproteome studies in a postgenome era**. Disponível em: <<http://www.abrf.org/Proteome.html>> Acesso em 02 set. 2003.

ZHANG, W.; CHAIT, B.T. Profound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. **Analytical Chemistry**, v.72, p.2482-2489, 2000.