

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINI GREMSKI STABACH

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE *Sinorhizobium fredii* NGR234
EM NÓDULOS DE DIFERENTES PLANTAS HOSPEDEIRAS.

CURITIBA
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINI GREMSKI STABACH

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE *Sinorhizobium fredii* NGR234
EM NÓDULOS DE DIFERENTES PLANTAS HOSPEDEIRAS

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roseli Wassem

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Bonatto

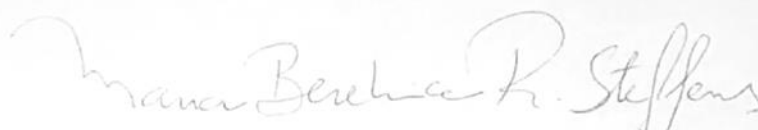
CURITIBA
2016

PARECER

Os abaixo assinados, membros da banca examinadora da defesa de dissertação de mestrado, a qual se submeteu **CAROLINI GREMSKI STABACH**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética são de parecer que se aprove a candidata.

Secretaria da Coordenação do Programa do Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 30 de março de 2016



Doutora Maria Berenice Reynaud Steffens

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFPR - Membro Titular



Doutor Eduardo Balsanelli

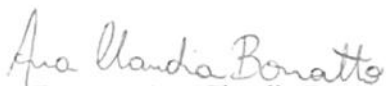
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/UFPR - Membro Titular



Doutora Roseli Wassem

Departamento de Genética/UFPR - Presidente

Visto



Doutora Ana Claudia Bonatto

Vice-Coordenadora

Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por toda proteção e amparo no caminho trilhado até aqui e por sempre iluminar meus pensamentos.

Agradeço aos meus pais Cláudio e Izabel e aos meus irmãos João Vitor e Débora que sempre estiveram do meu lado, sem medir esforços para que eu realizasse meus objetivos, mesmo quando me ausentava em momentos importantes para nossa família para realização desse trabalho. Agradeço pelo apoio, força e por serem as pessoas que me incentivam a conquistar mais e mais. À vocês dedico essa conquista!

Aos amigos que eu conheço e que acompanharam desde antes de iniciar o mestrado e aos novos amigos feitos durante esse tempo aqui em Curitiba. Agradeço por todos os momentos de alegrias, desabafos, risadas, momentos de lazer, festas e pela torcida depositada em mim para que eu chegasse até aqui. Obrigada do fundo do coração, pois foi muito mais fácil com vocês do meu lado.

A minha orientadora Roseli Wassem, primeiramente por toda a paciência que teve comigo, mesmo quando eu caprichava nos erros. Por todo ensinamento, confiança e atenção depositados em mim e pela amizade feita durante esses dois anos. Pode ter certeza que eu aprendi muito com você (mais do que imagina) e a terei como exemplo de profissionalismo para a minha vida.

A professora Ana Claudia Bonatto, pelos ensinamentos e disponibilidade sempre que necessário, pelas risadas e por gostar de mim mesmo quando eu cantava sertanejo no laboratório.

A Ana Luiza, que além de cuidar do laboratório, sempre me ajudou em tudo o que precisei, e aos amigos e colegas do laboratório. Muito obrigada por toda ajuda prestada a mim. Obrigada por todos os momentos de brincadeiras, preocupações e conforto.

A Universidade Federal do Paraná e a CAPES que possibilitaram a realização desse sonho.

“A cada passo um desafio, a cada desafio uma vitória, a cada vitória
um novo passo rumo ao sucesso!”

Michele Bertolletti

RESUMO

Sinorhizobium fredii NGR234 é um microrganismo capaz de fixar nitrogênio e é considerado um organismo modelo para estudos envolvendo interação simbiótica, devido a diversos trabalhos realizados com essa estirpe e ao conhecimento que se tem acerca de seu genoma. As interações planta-bactéria são consequência da troca de sinais moleculares específicos entre as espécies, de forma coordenada e integrada. Conhecer, a nível molecular e genético, as mudanças que ocorrem no metabolismo desses organismos, além da regulação de sinais e a expressão diferencial de genes quando o rizóbio se encontra sob diferentes condições é de grande importância para o processo de simbiose. Com o intuito de identificar diferenças no processo de interação entre *S. fredii* NGR234 e *Phaseolus vulgaris*, *Tephrosia vogelii* e *Vigna unguiculata*, foi analisado o transcriptoma de NGR234 através de RNA-Seq buscando os genes diferencialmente expressos. A confirmação de alguns genes que se mostraram diferenciais foi realizada através de RT-qPCR e de fusão transcricional a gene repórter (*gfp*) para observação de fluorescência em cortes de nódulos utilizando microscopia confocal. Além disso, esses genes foram analisados, com a finalidade de indicar as vias metabólicas e processos celulares de *S. fredii* NGR234 que esses genes pertencem, e assim, discutir a nível gênico as causas e consequências dessas diferenças. Como resultado, um pequeno número de genes diferencialmente expressos foi associado com o tipo de nódulo (determinado ou indeterminado), e várias evidências confirmaram que uma melhor fixação de nitrogênio ocorre em *T. vogelii* e em *V. unguiculata*. Os genes que compõem os operons do sistema de secreção tipo três (TTSS) e de síntese de lipopolissacarídeos ricos em ramnose foram mais expressos nos bacteroides de *P. vulgaris* e *T. vogelii*, em relação aos de *V. unguiculata*. Além das análises de genes diferencialmente expressos, uma análise preliminar de identificação de ncRNAs também foi realizada, já que nessa espécie não existe um amplo conhecimento acerca dos ncRNAs presentes em seu genoma. De um modo geral, esse trabalho gerou um conjunto de dados que poderá ser utilizado como referência para futuras investigações e estudos de vias e sistemas envolvidos na simbiose. Esses estudos serão importantes para um entendimento mais específico do processo de nodulação.

Palavras-chave: *Sinorhizobium fredii* NGR234, Análise de expressão diferencial, *Phaseolus vulgaris*, *Tephrosia vogelii*, *Vigna unguiculata*.

ABSTRACT

Sinorhizobium fredii NGR234 is a microorganism that is able to fix nitrogen. It is considered a model organism in studies involving symbiotic interaction due to extensive research with this strain and what is known about its genome. Plant-bacteria interactions are a result of the exchange of specific molecular signals between species, in a coordinated and integrated way. The information about molecular and genetic changes that occur in the metabolism of these organisms, the signaling regulation, and the differential expression when the *Rhizobium* is under different conditions is of great importance in the process of symbiosis. In order to identify differences in the interaction process between *S. fredii* NGR234 and *Phaseolus vulgaris*, *Tephrosia vogelii* and *Vigna unguiculata*, the NGR234 transcriptome was analyzed using RNA-Seq, seeking differentially expressed genes. Confirmation of genes that seemed differential was performed by RT-qPCR and by confocal microscopy with transcriptional fusion with *gfp* as reporter gene. In addition, these genes were analyzed in order to recognize the *S. fredii* NGR234 metabolic pathways and cellular processes in which they take part, and thus discuss the causes and consequences of these differences. As a result, a small number of differentially expressed genes was associated with the type of nodule (determinate or indeterminate), and multiple lines of evidence confirmed that better nitrogen fixation occurs in *T. vogelii* and *V. unguiculata*. The genes present in the operons of the Type Three Secretion System (TTSS) and the synthesis of lipopolysaccharides rich in rhamnose were more expressed in *P. vulgaris* and *T. vogelii* bacteroids when compared to *V. unguiculata*. ncRNAs preliminary analysis was also performed, since there is no extensive knowledge about the ncRNAs that are present in the *S. fredii* NGR234 genome. Overall, this study has generated a data set which can be used as reference for future research and studies of the pathways and systems involved in symbiosis. These studies will be important for a more specific understanding of the nodulation process.

Key-words: *Sinorhizobium fredii* NGR234, Differential expression analysis, *Phaseolus vulgaris*, *Tephrosia vogelii*, *Vigna unguiculata*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. FORMAÇÃO DE NÓDULOS INDUZIDOS POR RIZÓBIOS EM LEGUMINOSAS.....	21
FIGURA 2. DIFERENÇAS NO TIPO DE NÓDULOS	22
FIGURA 3. DIAGRAMA DAS MOLÉCULAS SINALIZADORAS SIMBIÓTICAS PRODUZIDAS POR NGR234	24
FIGURA 4. CLASSIFICAÇÃO DOS ncRNAs EM <i>Rhizobium</i>	30
FIGURA 5: FLUXOGRAMA DOS PASSOS REALIZADOS PARA OBTENÇÃO DOS RESULTADOS GERADOS NO PRESENTE TRABALHO.	53
FIGURA 6. VIA DE BIOSÍNTESE DE ORNITINA E CITRULINA.	75
FIGURA 7. ESQUEMA DO CLUSTER PRINCIPAL DE GENES ENVOLVIDOS COM O SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO TRÊS EM <i>S. fredii</i> NGR234 E SEUS VALORES DE EXPRESSÃO (RPKM).....	78
FIGURA 8. CASCATA REGULATÓRIA EM NGR234 COM FOCO NA EXPRESSÃO DE SyrM2 e NodD2	79
FIGURA 9. ORGANIZAÇÃO GENÉTICA DOS GENES ENVOLVIDOS COM A SÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS	81
FIGURA 10. CORTES DE NÓDULOS DE 21 DIAS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> INOCULADOS COM <i>S. fredii</i> NGR234 CONTENDO O PLASMÍDEO pPROBE-GT COM AS FUSÕES A32 e A65.....	86
FIGURA 11. CORTES DE NÓDULOS DE 21 DIAS DE <i>Vigna unguiculata</i> INOCULADOS COM <i>S. fredii</i> NGR234 CONTENDO O PLASMÍDEO pPROBE-GT AS FUSÕES A32 e A65.	87
FIGURA 12. CORTES DE NÓDULOS DE 21 DIAS DE <i>Phaseolus vulgaris</i> INOCULADOS COM <i>S. fredii</i> NGR234 CONTENDO O PLASMÍDEO pPROBE-GT AS FUSÕES <i>nopB</i> e <i>rmlB</i>	88
FIGURA 13. CORTES DE NÓDULOS DE 21 DIAS DE <i>Vigna unguiculata</i> INOCULADOS COM <i>S. fredii</i> NGR234 CONTENDO O PLASMÍDEO pPROBE-GT COM AS FUSÕES <i>nopB</i> e <i>rmlB</i>	89

FIGURA 14. EMPILHAMENTO DAS LEITURAS SOBRE A REGIÃO DO CANDIDATO A ncRNA51.....	92
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i> e <i>Sinorhizobium</i> UTILIZADAS NO TRABALHO.....	35
TABELA 2: PLASMÍDEOS UTILIZADOS NO TRABALHO.....	35
TABELA 3: COMPOSIÇÃO DO MEIO MÍNIMO PARA RIZÓBIO (RMS).	36
TABELA 4: COMPOSIÇÃO DO MEIO NUTRITIVO B+D.	36
TABELA 5: <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A RT-qPCR E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	46
TABELA 6: SEQUÊNCIA E TEMPERATURA DE ANELAMENTO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NESTE TRABALHO.	47
TABELA 7: CONCENTRAÇÃO DE RNA OBTIDO A PARTIR DOS NÓDULOS	54
TABELA 8: RESUMO DO MAPEAMENTO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS CONTRA O GENOMA DE <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234 UTILIZANDO OS SOFTWARES CLC GENOMIS WORKBENCH E ROCKHOPPER.....	57
TABELA 9: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS QUE DIFERENCIAM AS TRÊS PLANTAS ESTUDADAS NESTE TRABALHO	58
TABELA 10: RESULTADOS PARCIAIS DAS LISTAS DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS.	60
TABELA 11: NÚMERO DE GENES DIRECIONADOS PARA AS PRINCIPAIS CATEGORIAS NA COMPARAÇÃO FEITA ENTRE AS PLANTAS.....	61
TABELA 12: GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS CODIFICANDO TRANSPORTADORES ABC E SEUS RESPECTIVOS <i>FOLD CHANGES</i>	63
TABELA 13: VALORES DE <i>FOLD CHANGE</i> DE <i>rpsL</i> e <i>rpsG</i> ATRAVÉS DE RT-qPCR.....	76
TABELA 14: VALORES DE <i>FOLD CHANGE</i> DE <i>syrM2</i> , <i>nodD2</i> e <i>nopB</i> ATRAVÉS DE RT-qPCR.....	80

TABELA 15: EFEITO FENOTÍPICO DE MUTAÇÕES EM GENES ENVOLVIDOS COM A SÍNTESE DE LPS.....	82
TABELA 16: DADOS DO RNA-SEQ PARA OS GENES ANALISADOS.	84
TABELA 17: CANDIDATOS A POTENCIAIS ncRNAs SELECIONADOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE SEQUÊNCIA E PELO SOFTWARE DE PREDIÇÃO RNASPACE.	91

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. <i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234.....	17
2.2. INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA.....	18
2.3. RNAs COM FUNÇÃO REGULATÓRIA EM BACTÉRIAS ASSOCIADAS A PLANTAS.....	27
3. OBJETIVOS	32
3.1. OBJETIVO GERAL	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO	33
4.2. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS	34
4.3. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	35
4.4. ANTIBIÓTICOS.....	37
4.5. CULTIVO DAS PLANTAS.....	37
4.5.1. Preparo dos potes de cultivo	37
4.5.2. Desinfecção das sementes	37
4.5.3. Germinação das sementes.....	38
4.5.4. Transferência das sementes para os potes de cultivo	38
4.6. PREPARO DOS INÓCULOS	39
4.7. EXTRAÇÃO DE RNA BACTERIANO	39
4.8. CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO	40
4.9. ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS	41
4.9.1. Artemis	41
4.9.2. Rockhopper	42
4.9.3. Sam Tools	42
4.9.4. CLC Genomics Workbench	43
4.10. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	43
4.10.1. Identificação dos genes diferencialmente expressos entre as três plantas...43	

4.10.2. KEGG e KAAS	45
4.11. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL UTILIZANDO PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL	45
4.12. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL UTILIZANDO FUSÃO COM GFP	46
4.13. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	47
4.14. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	47
4.15. LIGAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	48
4.16. RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA	48
4.17. CÉLULAS COMPETENTES	48
4.18. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO	49
4.19. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	49
4.20. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	50
4.21. CONJUGAÇÃO E SELEÇÃO	51
4.22. ANÁLISE DE POTENCIAIS SEQUÊNCIAS TRANSCRITAS EM RNAs NÃO CODIFICADORES (ncRNAs)	51
4.22.1. Busca através de homologia de sequência	51
4.22.2. RNASpace	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1. EXTRAÇÃO DE RNA, CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DE BIBLIOTECAS DE RNA-SEQ	54
5.2. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM BACTERÓIDES DE PLANTAS INOCULADAS COM NGR234	58
5.3. ANÁLISE DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO KAAS – KEGG	60
5.3.1. Sistemas de Transporte Ativo	62
5.3.2. Metabolismo de Energia	70
5.3.3. Biossíntese de Aminoácidos	73
5.3.4. Ribossomos	75
5.3.5. Sistema de Secreção Tipo Três (TTSS)	76
5.3.6. Polissacarídeos de Superfície	81
5.4. OBTENÇÃO DE FUSÃO DE GENES COM GFP	83
5.5. ANÁLISE DE RNAs NÃO CODIFICADORES	90

6. CONCLUSÃO.....	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
APÊNDICES	112

1. INTRODUÇÃO

Interações de plantas com diferentes microrganismos ocorrem na natureza e isso contribui direta ou indiretamente para ambas as espécies. Essas interações exigem a troca de vários sinais moleculares integrados e coordenados para que moléculas essenciais sejam expressas, permitindo a invasão de um hospedeiro específico e, posteriormente, possibilita que cada organismo desempenhe seu papel durante o processo. Tratando-se de microrganismos que participam dessas interações é interessante conhecer, a nível molecular e genético, quais mudanças ocorrem no metabolismo desses organismos, os mecanismos e a regulação de sinais e, quais genes são diferencialmente expressos. Nas últimas décadas, os avanços tecnológicos possibilitaram a expansão do conhecimento em muitas áreas da biologia molecular, como, por exemplo, na área de transcriptoma.

Sinorhizobium fredii NGR234 é um alfa-proteobacteria, da ordem Rhizobiales, capaz de fixar nitrogênio e considerado um organismo modelo para estudos envolvendo interação simbiótica, devido a diversos trabalhos realizados com essa estirpe e ao conhecimento que se tem acerca de seu genoma. Utilizando-se da transcriptômica e dos avanços tecnológicos que acompanham essa área, é possível acessar cada vez mais, um número maior de informações a respeito de microrganismos, como por exemplo, a expressão gênica diferencial no processo de nodulação. As razões pelas quais um determinado gene é expresso em uma condição e em outra não, já resultou em vários trabalhos de mutagênese e na descoberta de novos genes e suas funções. Outro exemplo são os pequenos RNAs. Com as recentes descobertas de que os RNAs não codificantes são expressos em procariotos e com o aumento constante de novos RNAs descritos, a busca por informação na área de transcriptoma nessa estirpe é de grande relevância para a pesquisa básica.

Esse trabalho busca identificar e mapear, através da técnica de sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-seq), os genes diferencialmente expressos do *S. fredii* NGR234 quando este nodula três plantas diferentes (*Phaseolus vulgaris*, *Tephrosia vogelii* e *Vigna unguiculata*), que respondem de maneira diferente a presença deste microsimbionte. Foram analisadas as vias

metabólicas que apresentam genes diferencialmente expressos e a relação desses genes com a nodulação. Uma análise preliminar de ncRNAs também foi realizada utilizando os transcriptoma de NGR234 em condição de vida livre, já que nessa espécie não existe um amplo conhecimento acerca dos ncRNAs que estão presentes em seu genoma.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Sinorhizobium fredii* NGR234

O bacilo gram-negativo *Sinorhizobium fredii* NGR234 (New Guinea *Rhizobium* 234) é um alfaproteobacteria e pertence à ordem Rhizobiales. Esta bactéria possui um genoma de 6,9 Mpb, dividido em três replicons: um plasmídeo simbiótico (pNGR234a) de 536.165 pb, um megaplasmídeo (pNGR234b) de 2.430.033 pb e um cromossomo de 3.925.702 pb (cNGR234), que codifica a maioria das proteínas com funções essenciais para o crescimento celular. Algumas das funções essenciais também estão localizadas no pNGR234b, e não há nenhuma em pNGR234a. Por outro lado, o plasmídeo simbiótico pNGR234a deste microsimbionte contém os genes essenciais para a nodulação (SCHMEISSER *et al.*, 2009). Devido aos diversos trabalhos realizados com esse bacilo e grande conhecimento acerca de seu genoma, NGR234 se tornou um organismo modelo para estudos de simbiose.

Em contraste com muitos rizóbios, *S. fredii* NGR234 tem um amplo espectro de hospedeiros, sendo capaz de nodular mais de 112 gêneros de leguminosas (PUEPPKE & BROUGHTON, 1999). A promiscuidade dessa estirpe pode ser parcialmente explicada pelos fatores simbióticos específicos que ela produz. A formação de nódulos requer diferentes tipos de sinais da bactéria, que desempenham papéis importantes em várias fases da simbiose. Nesse sentido, NGR234 é peculiar porque é capaz de sintetizar uma variedade de fatores Nod (com pelo menos 80 estruturas diferentes) que são responsáveis por abrir caminhos para a entrada dos rizóbios na planta no início do processo de nodulação; secretam diversas proteínas por meio de um sistema de secreção de tipo III, sendo a provável causa da ampla gama de hospedeiros; e produzem lipopolisacarídeos ricos em ramnose que contribuem para diversas fases do desenvolvimento simbiótico (BROUGHTON *et al.*, 2000; FRAYSSE, *et al.*, 2002; MARIE, *et al.*, 2003; PERRET *et al.*, 2000; VIPREY, *et al.*, 1998; MARIE, *et al.*, 2004). Todos esses fatores em conjunto determinam o grau de eficiência da nodulação.

2.2. INTERAÇÃO PLANTA-BACTÉRIA

Um grande número de bactérias pode interagir com plantas e desempenhar um importante papel no desenvolvimento e saúde da mesma. As interações planta-bactéria são consequência de trocas de sinais moleculares específicos entre as espécies de forma coordenada e integrada. Uma interação muito importante para a agricultura mundial, sendo fundamental para a sustentabilidade agrícola, é a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Apesar de o nitrogênio constituir 80% dos gases atmosféricos, que também se difundem para o espaço poroso dos solos, nenhum animal ou planta consegue utilizá-lo como nutriente, ou seja, não é assimilado devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos, que é uma das mais estáveis que se tem conhecimento na natureza. A fixação biológica de nitrogênio é realizada por bactérias diazotróficas que são organismos capazes de assimilar o nitrogênio atmosférico e incorporá-lo à matéria viva. Essas bactérias apresentam o complexo enzimático nitrogenase, que catalisa a reação de redução do nitrogênio gasoso à amônia, um composto nitrogenado que é disponibilizado para outros seres vivos. Além da FBN, essas bactérias também podem promover o crescimento vegetal pela produção de substâncias que auxiliam o crescimento radicular. Assim, as bactérias diazotróficas associativas são consideradas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal e assumem um papel importante na interação com raízes de plantas e ciclagem de nutrientes (MOREIRA *et al.*, 2010).

Os organismos diazotrofos, segundo Evans e Burris (1992) são caracterizados em três grupos:

- a) Diazotrofos de vida livre, que fixam o nitrogênio para seu próprio uso.
- b) Diazotrofos associativos, que contribuem para o crescimento da planta a qual se associam, mas não formam estruturas diferenciadas e não estabelecem simbiose.
- c) Diazotrofos simbióticos, como os rizóbios, que estabelecem uma interação muito estreita com a planta infectada, quando sinais moleculares trocados entre o vegetal e a bactéria são compatíveis, podendo formar estruturas diferenciadas denominadas nódulos.

Os gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Bradyrhizobium* são alguns dos gêneros que incluem as bactérias que apresentam a capacidade de infectar as raízes de plantas (principalmente de leguminosas) e formar nódulos (LOH & STACEY, 2003). São nos nódulos que as bactérias diazotróficas se encontram e transferem o nitrogênio assimilado para a planta de forma efetiva.

Para a formação do nódulo os rizóbios livres no solo devem se mover em direção à superfície da raiz para entrar no tecido radicular interno, onde irão preencher às células do nódulo incipiente. O resultado da primeira conversa molecular entre plantas e as bactérias é a atração do rizóbio para os pelos radiculares, através de flavonóides e outras moléculas liberadas pela planta. Flavonóides são compostos fenólicos, capazes de induzir a expressão de genes necessários para o processo de nodulação (genes *nod*, *noe* e *noI*). A regulação da expressão dos genes *nod* varia de estirpe para estirpe, mas é quase sempre mediada pela proteína NodD (PERRET *et al.*, 2000).

A proteína NodD pertence a uma família de reguladores transcricionais e, segundo Relic *et al.*, (1993), NodD1 de NGR234 é um ativador chave de locos cuja expressão é dependente de flavonóides, já que a estirpe mutante NGR Ω *nodD1* é incapaz de nodular qualquer planta (KOBAYASHI, 2004). Essa proteína se liga a uma sequência de 47 pares de bases altamente conservados no DNA (regiões chamadas de *nod-boxes*), encontradas nas regiões promotoras de muitos locos para nodulação (ROSTAS *et al.*, 1986). NGR234 carrega em seu plasmídeo simbiótico 19 elementos *nod-box* bem conservados e entre esses, 18 são induzidos por NodD1, dependente de flavonóides (KOBAYASHI, 2004). A expressão dos genes *nod* também está sujeita a um controle negativo. Depois da indução pelos flavonóides, a repressão de alguns genes é requerida para uma ótima nodulação de *Vigna unguiculata* por NGR234, por exemplo (FELLAY *et al.*, 1998). Assim, NodD atua tanto como um sensor de sinal emitido pela planta, como um ativador transcricional de genes *nod*.

Genes *nod* determinam a gama de hospedeiros que um rizóbio vai nodular, sendo que alguns genes são comuns entre as espécies, enquanto outros são específicos. Além de genes *nod*, outros genes também são transcritos quando encontram condições para iniciar a nodulação. Esses genes são importantes para a

competitividade com outros organismos quando se trata de interação específica da planta com a bactéria (GAGE, 2004).

Muitos genes da nodulação estão envolvidos na síntese de uma família de sinalizadores, chamados fatores Nod. São esses fatores que “abrem” uma porta para a entrada de rizóbios pela raiz. A estrutura essencial dos fatores Nod é sintetizada pelo produto dos genes *nodABC*, que são enzimas que catalisam a formação desses fatores. A inativação dos genes *nodABC* em *S. meliloti* suprimiu a capacidade dessa bactéria para nodular alfafa (ROCHE *et al.*, 1996), mostrando a importância desses genes para uma nodulação efetiva. Recentemente descobriu-se alguns rizóbios que não apresentam os genes *nodABC* mas que produzem nódulos através de uma interação simbiótica alternativa, apesar de serem bem menos eficientes na nodulação (frequência de nodulação, número de nódulos formados por planta e nível de infecção dos nódulos) quando comparados com as bactérias que possuem os fatores Nod envolvidos na via de sinalização (MADSEN *et al.*, 2010; OKAZAKI *et al.*, 2016). Alterações na estrutura básica dos fatores Nod também existem para desempenhar papéis mais sutis na nodulação, alterando a especificidade do hospedeiro ou protegendo fatores Nod da degradação. Ou seja, cada espécie de rizóbio possui genes *nod* específicos, que faz com que produzam um conjunto de fatores Nod com substituintes específicos, como por exemplo, adição de ácidos graxos à estrutura padrão, adição de fucose, grupos sulfatos, acetil, 2-O-metil, N-metil, entre outros (OLDROYD & DOWNIE, 2004). As bactérias produzem e liberam esses fatores Nod (lipo-quito-oligossacarídeo), que são detectados pelas plantas através de um receptor de alta afinidade e induzem grandes mudanças no desenvolvimento da planta, que são necessárias para a entrada do rizóbio no hospedeiro.

Um diagrama ilustrando a invasão dos pelos das raízes de legumes por rizóbios pode ser observada na Figura 1.

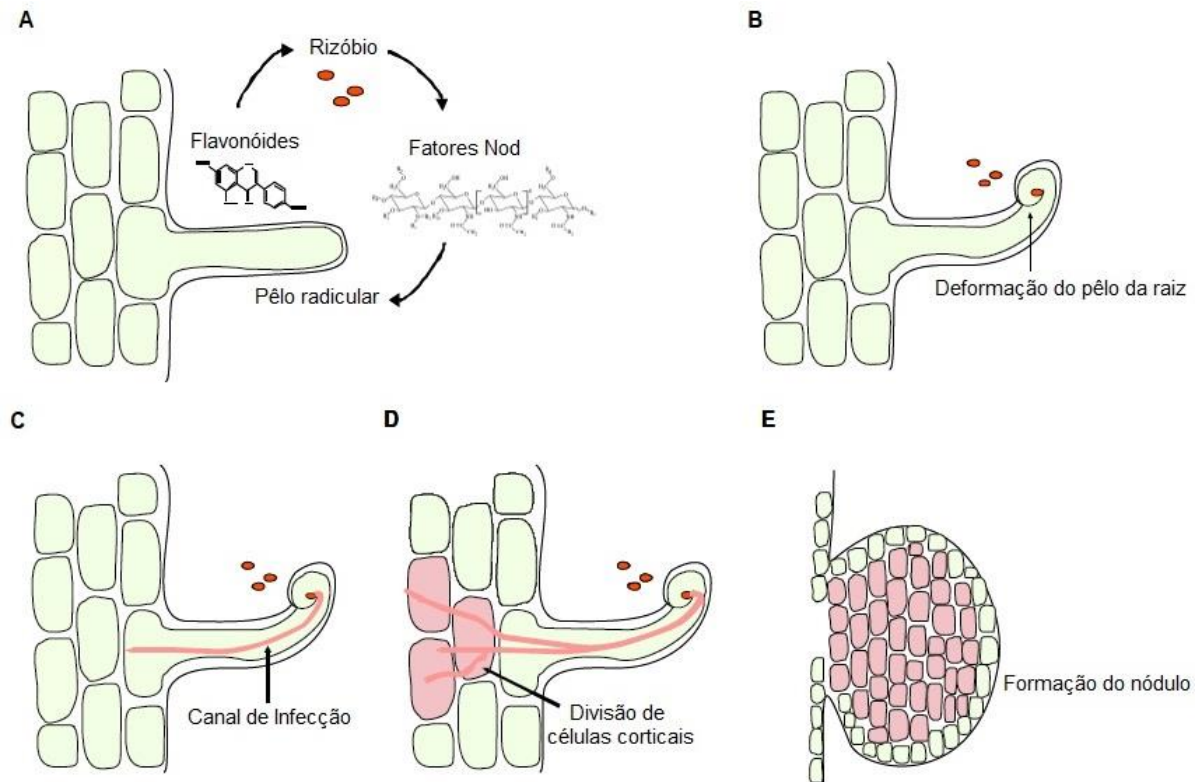


FIGURA 1. FORMAÇÃO DE NÓDULOS INDUZIDOS POR RIZÓBIOS EM LEGUMINOSAS. FONTE: Adaptado de Kambara, 2008. NOTA: A: rizóbios naturalmente colonizam a rizosfera metabolizando compostos orgânicos secretados pelas células das raízes. Os flavonóides liberados pelas raízes de leguminosas hospedeiras atraem mais rizóbios levando a sua fixação a pelos radiculares. B: Elevada concentração de flavonóides desencadeiam a síntese de fatores Nod por rizóbios que induzem a deformação do pêlo da raiz e a penetração bacteriana no centro do cordão de infecção. C: O cordão de infecção se desenvolve dentro do pêlo da raiz e se move em direção às células corticais da raiz. D: No desenvolvimento do cordão de infecção ele se ramifica e rizóbios são liberados para formar simbiossomas dentro de células de nódulos (mostrados em rosa). E: Divisões celulares corticais subsequentes levam ao desenvolvimento do novo órgão de raiz, o nódulo.

Pela ação dos fatores Nod, o contato do rizóbio com a parede celular do pêlo, faz com que esse se deforme e haja a degradação da parede celular no local de iniciação do cordão de infecção para que a bactéria entre em contato com o tecido da planta. No entanto, apesar dos fatores Nod serem de extrema importância, outros carboidratos e proteínas são necessários para o desenvolvimento do cordão de infecção e subsequentes passos para a formação do nódulo (PERRET *et al.*, 2000).

O cordão de infecção é uma estrutura tubular formada através da invaginação da parede celular e da membrana plasmática. Esse cordão cresce em direção à base das células da epiderme da raiz e para as células subjacentes, e dentro do qual as bactérias se dividem, penetrando a raiz da planta. Ou seja, é

através dessa estrutura que as bactérias entram efetivamente na raiz das células hospedeiras e inicia-se a formação de nódulos. Dentro do citoplasma do hospedeiro as bactérias passam a ser denominadas bacteróides, porque já ocorreu a multiplicação (encontram-se em maior número) e estão diferenciadas em formas fixadoras de nitrogênio. Os bacteróides são envoltos pela membrana da planta, que passa por mudanças significativas, para que haja troca de metabólitos e redução do nitrogênio. Quando maduros, os nódulos fixadores de nitrogênio consistem em um tecido central infectado, composto de células de plantas infectadas intercaladas com células não infectadas. Tecidos não infectados conectam os elementos de transporte e sistema vascular da raiz com os componentes dos nódulos (UDVARDI & POOLE, 2013; OLDROYD, & DOWNIE, 2004).

Dependendo da interação simbiótica, os nódulos formados podem ser de dois tipos baseados na atividade do meristema do nódulo: determinados e indeterminados. A diferença primária está na atividade do meristema do nódulo (FIGURA 2).

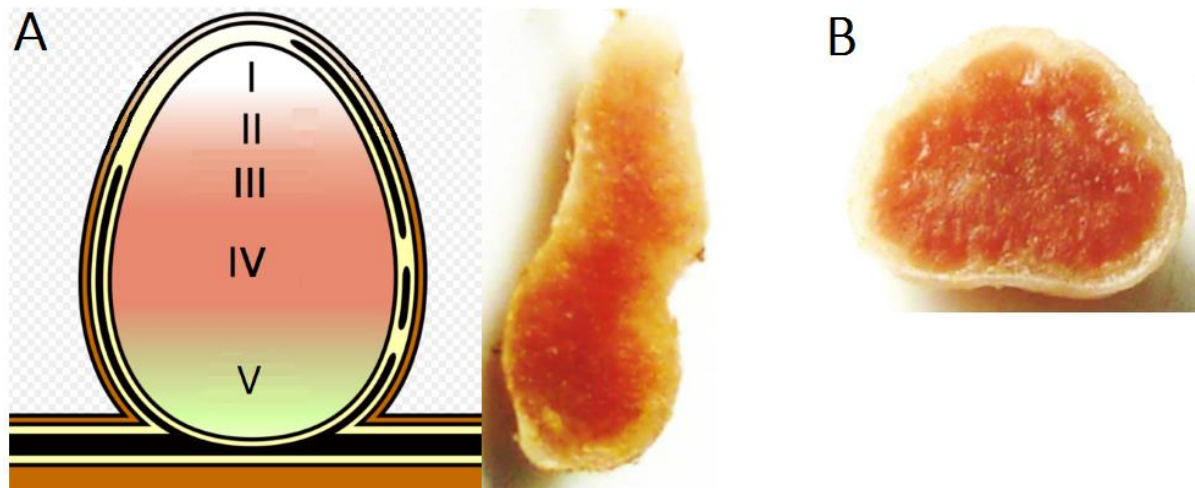


FIGURA 2. DIFERENÇAS NO TIPO DE NÓDULOS. FONTE: Adaptado de Li *et al.* 2013. NOTA: A: Nódulo indeterminado. I: Zona meristemática; II: Zona de invasão; III: Interzona; IV: Zona de fixação de nitrogênio; V: Zona de senescência. B: Nódulo determinado.

Os nódulos indeterminados são geralmente alongados, bem ramificados, originam-se de células corticais interiores adjacentes à endoderme e são organizados em zonas (desenvolvimento em gradiente), o que facilita a análise funcional dos distintos estágios da simbiose. Existem 5 diferentes zonas que formam os nódulos indeterminados: i) zona meristemática, onde se encontra o meristema

apical; ii) zona de invasão, que contém os cordões de infecção que entregam os rizóbios nas células da planta; iii) interzona, na qual o rizóbio sofre diferenciação; iv) zona de fixação de nitrogênio; v) zona de senescência, que fica próxima à raiz e onde os rizóbios estão cessando a fixação de nitrogênio em nódulos velhos. O meristema apical desses nódulos produz continuamente novas células, ou seja, a divisão desses nódulos é constante. Já os nódulos determinados, são geralmente redondos, surgem a partir do córtex central e não exibem um gradiente organizado ou claro. Esse tipo de nódulo contém células de rizóbios que são semelhantes em tamanho e capacidade reprodutiva parecidas com as bactérias vida livre, diferente dos nódulos indeterminados que apresentam rizóbios de tamanho maiores (LI *et al.*, 2013; UDVARDI & POOLE, 2013; OLDROYD *et al.*, 2011; KERESZT *et al.*, 2011).

Outro fator requerido para a formação de nódulos fixadores de nitrogênio efetivos e que afeta a nodulação de muitos hospedeiros, são as proteínas externas de nodulação (Nop's – *nodulation outer proteins*) (MARIE *et al.*, 2001), secretadas por meio de um sistema de secreção do tipo três (TTSS). O TTSS é uma complexa via usada por várias bactérias gram-negativas para exportar proteínas efetoras para o meio extracelular, na membrana ou no citosol de uma célula eucariótica hospedeira infectada (PLANO *et al.*, 2001). Um resumo de todos os processos que ocorrem na interação das plantas com o *S. fredii* NGR234 após a percepção dos flavonoides da rizosfera, subsequente ativação do TTSS e dos genes de nodulação está representado na Figura 3.

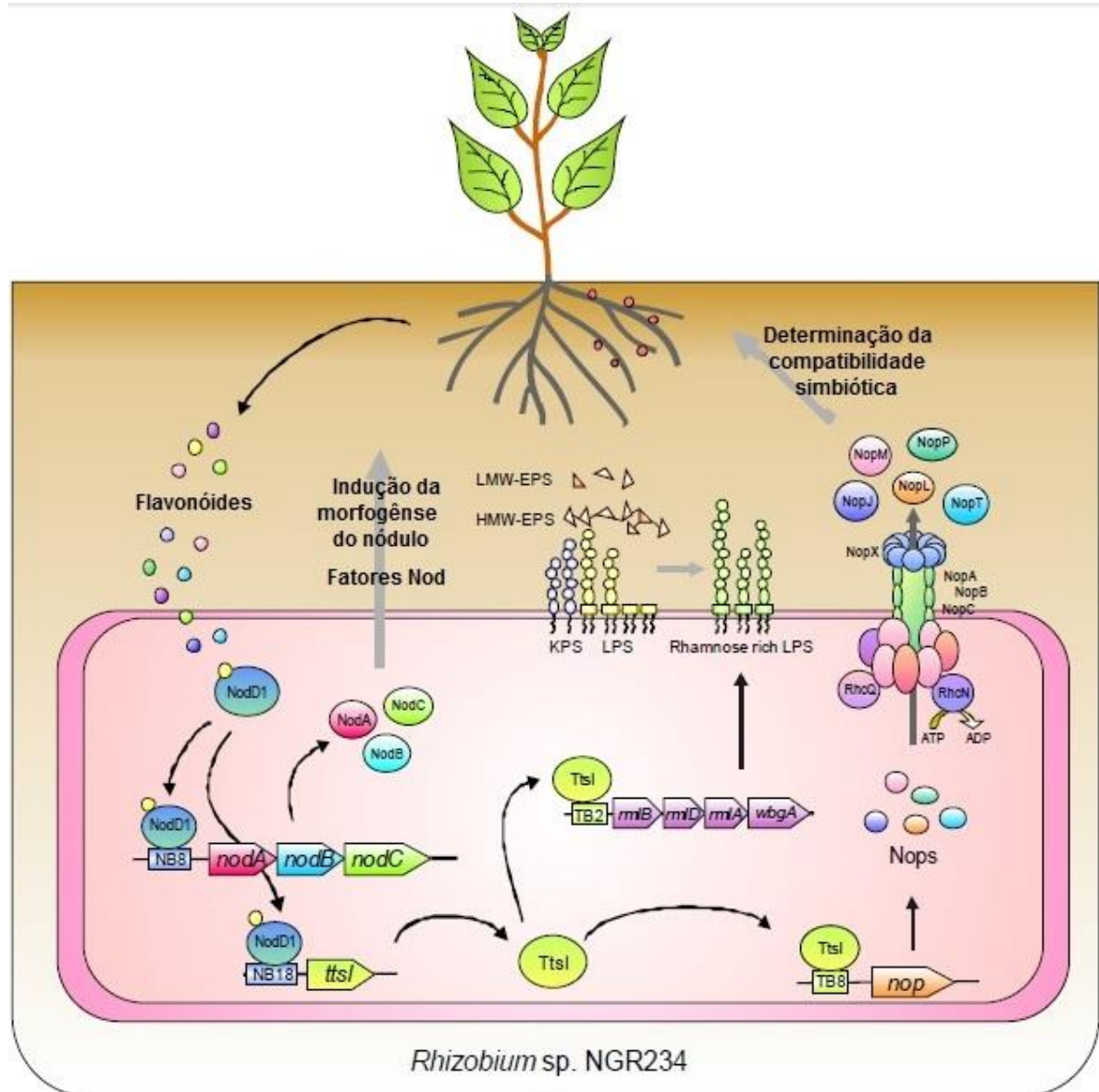


FIGURA 3. DIAGRAMA DAS MOLÉCULAS SINALIZADORAS SIMBIÓTICAS PRODUZIDAS POR NGR234. FONTE: Adaptado de Kambara, 2008. NOTA: Os flavonóides de raízes leguminosas desencadeiam a expressão gênica e síntese de sinais através da ligação de NodD1 aos *nod* boxes. Os sinais simbióticos primários, os fatores Nod, são secretados e permitem a entrada de bactérias nos pelos da raiz e iniciam modificações na planta para a infecção de rizóbios e desenvolvimento do nódulo. NodD1 consequentemente ativa *ttsI* que ativa T3SS e a síntese de LPS ricos em ramnose ligando-se a *tts* boxes.

Identificado pela primeira vez em patógenos de plantas e animais, o TTSS é composto por várias proteínas que estão associadas com as membranas bacterianas internas e externas. Mais tarde esse sistema de secreção também foi descrito em bactérias simbiotes (DALE *et al.*, 2002). Grupos de genes que codificam as principais proteínas componentes do TTSS foram encontrados em diversos rizóbios, incluindo *B. japonicum* estirpe USDA110 (KANEKO *et al.*, 2002);

Mesorhizobium loti MAFF303099 (KANEKO *et al.*, 2000); e *S. fredii* estirpe USDA257 (KRISHNAN *et al.*, 2003). Contudo, em rizóbios, esse sistema foi primeiramente descrito em NGR234 (FREIBERG *et al.*, 1997).

A maquinaria do sistema é composta de, aproximadamente, 25 proteínas denominadas Rhc (*Rhizobium* conservados) que se estendem por ambas as membranas bacterianas (CORNELIS & Van GIJSEGEM, 2000). No processo de infecção do hospedeiro, bactérias patogênicas induzem a expressão de genes TTSS como uma resposta a um conjunto de estímulos ambientais que são diferentes entre um patógeno e outro (HUECK, 1998). Já em NGR234, genes TTSS são transcritos na presença de flavonoides e dos reguladores transcricionais bacterianos NodD1 e TtsI (anteriormente Y4xI), depois que os genes *nod* já foram expressos (VIPREY *et al.*, 1998). Inicialmente, os flavonoides induzem NodD1 a se ligar aos *nod-boxes* para transcrever os genes *nod*. Um desses motivos é encontrado a montante de *ttsI*, que codificará a proteína TtsI, o ativador transcricional dos genes envolvidos na secreção de Nops. Desta forma, se NodD1 se ligar à *nod-boxes* específicos, será transcrito também TtsI que, por sua vez, se ligará a um motivo específico de DNA denominado *tts-box* para transcrever os genes *nop* (WASSEM *et al.*, 2008).

O conjunto de proteínas efetoras translocadas em células hospedeiras varia amplamente entre as bactérias, sendo adaptado para atender as demandas de estilo de vida de uma bactéria particular dentro de um determinado hospedeiro. Em contrapartida, muitas das proteínas que compõem o aparelho utilizado pelo TTSS têm sua sequência conservada entre as bactérias (GHOSH, 2004). As proteínas que formam o aparelho do TTSS (que se parece muito com uma seringa) são as proteínas NopA, NopB, NopC e NopX em *S. fredii* NGR234. NopA compõe o maior componente do *pilus* do TTSS e é encontrada só nas espécies de rizóbios que contém o TTSS. Apesar de não apresentar homologia com o *pilus* de patógenos de plantas é possível que NopA possa se polimerizar e formar um canal para as proteínas efetoras transitarem, assim como acontece em patógenos de plantas. Uma deleção no gene *nopA* de USDA 257 diminuiu drasticamente o número de nódulos formados em soja (cultivar Peking) e em feijão-caupi (KIM & KRISHNAN, 2014; DEAKIN *et al.*, 2005; MARIE *et al.*, 2003; FAUVART & MICHIELS, 2008; TAMPAKAKI, 2014). NopB, ao contrário, é a menor proteína que compõem o *pilus* TTSS, e em NGR234 e USDA257 foi confirmada a presença dessa proteína na montagem do aparelho, já que mutantes no gene *nopB* nessas duas estirpes

mostraram-se incapazes de translocar proteínas externas de nodulação em cultura, não formam o *pilus* e seus fenótipos de nodulação se assemelharam aos exibidos por mutantes *nopA* e *rhcN* (LÓRIO *et al.*, 2004; SAAD *et al.*, 2005). NopC apresenta função bem parecida com NopB já que é uma proteína envolvida na formação do aparelho de secreção, que atravessa a membrana (DEAKIN *et al.*, 2005, TAMPAKAKI, 2014). NopX é uma proteína que forma o poro na membrana plasmática nas células vegetais, já que se localiza na extremidade do *pilus* (VIPREY *et al.*, 1998; MARIE *et al.*, 2003; SAAD *et al.*, 2005). A funcionalidade do TTSS na simbiose irá depender da planta estudada, sendo que as proteínas secretadas por esse sistema podem gerar diversos efeitos: negativos, positivos ou indiferentes. O efeito negativo é caracterizado pelo aumento no número de nódulos em plantas que foram inoculadas com rizóbios contendo mutações em genes do TTSS, em comparação com o rizóbio selvagem. Ou seja, as proteínas secretadas dificultam o processo de formação de nódulos. O efeito positivo é observado em plantas que apresentam uma diminuição no número de nódulos quando genes envolvidos com o TTSS são mutados nos rizóbios, indicando que a presença deste é importante para o desenvolvimento de nódulos. Plantas que respondem de maneira indiferente ao TTSS são aquelas que não apresentam variação no número de nódulos quando inoculadas com rizóbios selvagens ou contendo mutações nos genes do TTSS (MARIE *et al.*, 2003). Isso é possível de ser explicado porque cada planta produz flavonoides específicos que irão modular os níveis de expressão das proteínas secretadas também de forma específica. Alternativamente, as proteínas secretadas podem ser reconhecidas pela planta hospedeira e gerar um processo de simbiose, assim como é possível que algumas espécies de planta não apresentem o receptor correto para os Nops, fazendo com que essas proteínas sejam reconhecidas como fatores de virulência, provocando respostas de defesa ao invés de processos simbióticos (MARIE *et al.*, 2001; VIPREY *et al.*, 1998). As proteínas efetoras translocadas por NGR234, estudadas até o momento são NopJ, NopL, NopM, NopP e NopT e como já dito, o efeito dessas proteínas para a nodulação irá depender da planta estudada (KAMBARA, 2009; MARRIE *et al.*, 2003; AUSMEES, 2004; BARTSEV *et al.*, 2004; XIN *et al.*, 2012; SKORPIL *et al.*, 2005; DAI *et al.*, 2008).

Além dos fatores Nod e do TTSS, existe ainda mais um fator determinante para uma simbiose completamente efetiva. Polissacarídeos de superfície ou SPS, que incluem polissacarídeos extracelulares (EPS), lipopolissacarídeo (LPS),

polissacarídeos capsulares e glucanas cíclicas, são componentes extracelulares bacterianos importantes que contribuem para diversas fases de desenvolvimento simbiótico, tais como a colonização de raiz, deformação do pelo, formação do cordão de infecção, invasão do nódulo e especificidade do hospedeiro, a liberação de bactérias em células de plantas e até mesmo formação de simbiossomas (VIPREY *et al.*, 2000a). Trabalhos de mutagênese nos genes que codificam enzimas envolvidas na síntese desses polissacarídeos de superfície em *S. fredii* NGR234 resultaram em nódulos vazios, sem fixação de nitrogênio ou em rizóbios que tiveram sua habilidade de infecção reduzida (LE QUÉRÉ *et al.*, 2006; VEDAM *et al.*, 2004).

2.3. RNAs COM FUNÇÃO REGULATÓRIA EM BACTÉRIAS ASSOCIADAS A PLANTAS.

Numerosos RNAs não codificantes foram identificados em muitos microrganismos procariotos e eucariotos nos últimos anos. O conhecimento sobre as funções e os mecanismos de ação desses pequenos RNAs até pouco tempo era desconhecido devido a limitações dos métodos utilizados pela genética clássica. Análises para identificar ORFs em genomas geralmente não reconhecem os ncRNAs, e encontrar métodos eficientes que os detectem dentro do genoma todo, em especial nas regiões inter e intragênica, não é nada simples. O pequeno tamanho do alvo para análises através de mutagênese também dificulta a identificação dessas moléculas (GOTTESMAN, 2004).

Com a chegada da transcriptômica de alto rendimento na última década, foi possível ampliar o conhecimento e o estudo de muitos genes que apresentam expressão diferencial em diferentes condições ambientais, assim como a identificação de milhares de pequenos *non-coding* RNAs (ncRNAs) como reguladores da expressão gênica em procariotos e eucariotos, entre muitas outras aplicações. Análises do transcriptoma por abordagens computacionais estão sendo cada vez mais realizadas pelo método de sequenciamento em larga escala de RNAs (RNA-Seq), as quais facilitam, estendem e complementam as investigações experimentais em comparação com os *microarrays* e análises de *Northern Blot* (primeiros métodos experimentais que buscaram prever ncRNAs). Essa técnica

possibilita a análise do transcriptoma através do sequenciamento de cDNA. Ela permite a quantificação dos níveis de expressão gênica, mesmo em transcritos que possuem níveis mais baixos de expressão devido a sua alta sensibilidade e requer amostras menores para iniciar as análises. Um dos desafios associados com experimentos de RNA-Seq é a análise dos grandes conjuntos de dados resultantes (WANG *et al.*, 2009; BECKER *et al.*, 2014).

Quando se trata de ncRNAs eucarióticos, o conhecimento acerca deles é muito maior quando comparado com os procarióticos. Existem inúmeras ferramentas disponíveis (PEPKE *et al.*, 2009) que suportam vários aspectos do processamento de dados da RNA-Seq, gestão e análise, mas a maioria dessas ferramentas são projetadas principalmente para os dados de RNA-Seq eucarióticos. Como os transcriptomas bacterianos apresentam características diferentes, as análises de dados para procariotos enfrentam desafios diferentes. Em genomas bacterianos genes vizinhos muitas vezes se sobrepõem; por conseguinte, distinguir o início de um transcrito do gene a partir da extremidade de outro aumenta a complexidade da análise do transcriptoma. Uma alternativa para identificar mais facilmente os sítios de início de transcrição (TSS – *transcriptional start site*) é a utilização de um tratamento com exonuclease 5' terminal (TEX). Essa exonuclease específica digere o RNA que têm uma extremidade 5'-monofosfato, mantendo o RNA que possui uma extremidade 5'-trifosfato. Isso é importante, pois se existir uma fragmentação do RNA, o sítio de início de transcrição não deixa de ser identificado, pois caracteriza-se por ter a extremidade 5' trifosfatada.

Em procariotos, os primeiros ncRNAs foram descobertos por acaso na década de 80, em *Escherichia coli*, enquanto se estudava determinados operons de genes que codificavam proteínas de membrana externa (MIZUNO *et al.*, 1984) e desde então, mais estudos foram realizados afim de obter uma imagem mais clara da função e dos tipos de ncRNAs nesses organismos.

Pesquisas recentes comprovaram que o grupo das α -proteobacterias, que abriga a ordem Rhizobiales, também apresentam centenas de ncRNAs com potencial regulatório. O primeiro sRNA caracterizado funcionalmente em α -proteobactérias foi o AbcR1, que está relacionado com a regulação de transportadores ABC. AbcR1 é um regulador central dos sistemas de absorção de nutrientes em *Agrobacterium tumefaciens*, pois esse sRNA interage com o sítio de ligação do ribossomo no RNAm transcrito do gene *atu2422*, que codifica a proteína

Atu2422, bloqueando a tradução. AbcR1 é expresso de uma região intergênica, *in tandem* com um sRNA relacionado, o AbcR2 (OVERLÖPER *et al.*, 2014; CHAI & WINANS, 2005; WILMS *et al.*, 2011). Se na condição de vida livre a bactéria já regula muitos genes através de ncRNAs, quando ela se encontra interagindo com plantas o número dessas moléculas participantes pode ser muito maior, levando em consideração que, naturalmente existe a troca de vários sinais moleculares envolvidos nessa interação e que, por isso, a chance da expressão ser regulada por vários ncRNAs é maior.

Apesar do pouco conhecimento que se tem sobre os sRNAs, sabe-se que eles são muito importantes em vários processos de regulação da expressão gênica. Portanto, estudá-los, principalmente em procariotos, em qualquer processo biológico gerará resultados promissores.

Atualmente não existe uma nomenclatura oficial organizando as diferentes classes de ncRNAs. No estudo feito por Schlüter e colaboradores (2010) que pesquisaram por pequenos RNAs em todo o genoma de *Sinorhizobium meliloti*, eles classificaram os ncRNAs em 5 classes, de acordo com a posição deles no genoma, em relação aos seus vizinhos ou sobreposições de *open read frames* (ORFs):

- a) Trans-sRNAs
- b) Cis-antisense sRNAs
- c) mRNA leader
- d) Sense sRNAs que sobrepõem ORFs
- e) Open read frame.

Um resumo da classificação dos ncRNAs pode ser observado na Figura 4.

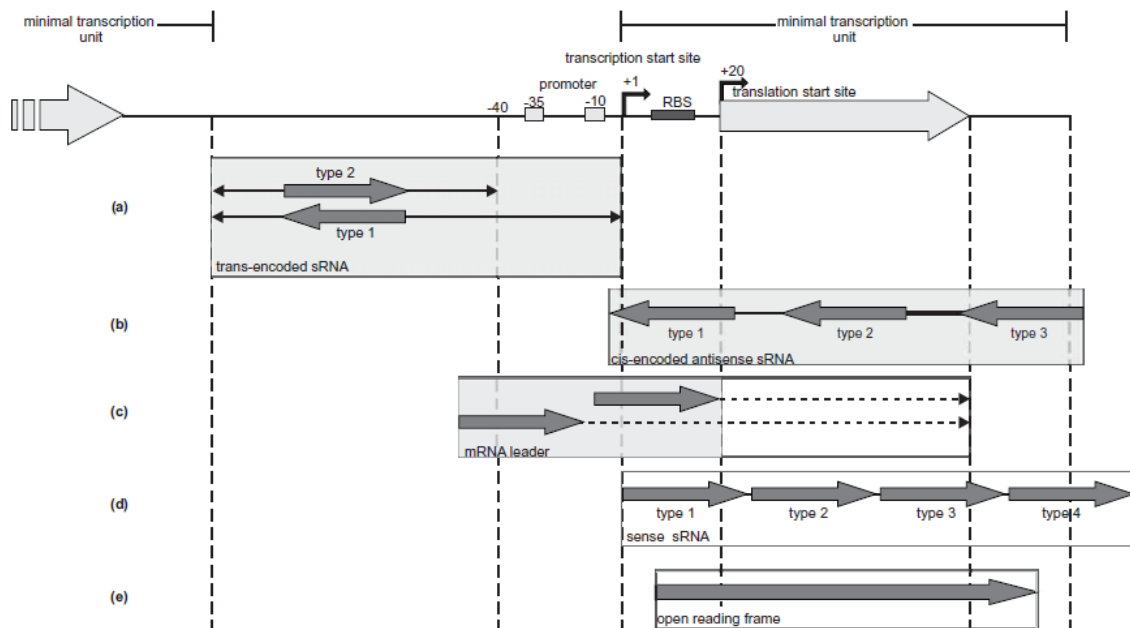


FIGURA 4. CLASSIFICAÇÃO DOS ncRNAs EM *Rhizobium*. FONTE: Schlüter (2010).

Os Trans-sRNAs são RNAs que se localizam em lugares distintos e afastados de seus alvos e podem ser sub-classificados em dois tipos: 1. Se a orientação for anti-senso para ambos os genes ou ORFs vizinhos; 2. Se o sRNA está na mesma direção que o gene vizinho (figura 4a). Os Cis-antisense sRNAs orientam-se anti-senso aos seus genes alvos e foi sub-classificado em 3 tipos: 1. É anti-senso na posição 5'; 2. Encontra-se dentro da ORF; 3. É anti-senso na posição 3' (figura 4b). Os mRNA leader são pequenos RNAs que representam uma derivação estável da parte 5' do RNA mensageiro que codifica proteínas (figura 4c). Os Sense sRNAs são pequenos transcritos estáveis de algumas sequências que estão localizados dentro de um RNA mensageiro (figura 4d). A maioria deles são RNAs processados. Esse grupo foi sub-classificado em quatro tipos: 1. sRNAs que sobrepõem a região 5' UTR e a ORF; 2. sRNAs situados dentro de uma outra ORF; 3. sRNAs que sobrepõem uma ORF e a região 3' UTR; 4. sRNAs que sobrepõem apenas a região 3' UTR. A diferença entre um sRNA Sense tipo 1 e um mRNA leader é que o sense sobrepõem a região 5' UTR (inicia onde o RNA será traduzido - região +1) e o mRNA leader inicia na região promotora (entre o -40 e +1). Por último a classe dos sRNA Open Read Frame que são transcritos que cobrem completamente uma ORF (figura 4e).

Esse trabalho busca encontrar e analisar, através do RNA-Seq, genes diferencialmente expressos do rizóbio quando este interage com três diferentes plantas, *Phaseolus vulgaris*, *Tephrosia vogelii* e *Vigna unguiculata*, que apresentam características diferentes entre si, como, por exemplo, o tipo de nódulo – determinado ou indeterminado, e a resposta ao sistema de secreção tipo três – positiva, negativa ou indiferente. Outro objetivo foi identificar potenciais RNAs não codificantes, utilizando a estirpe *Sinorhizobium fredii* NGR234, já que até o momento poucos sRNAs foram identificados em rizóbios.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Contribuir para o entendimento do processo de simbiose rizóbio-legume estudando a diferença na expressão gênica de diferentes plantas quando inoculadas com *Sinorhizobium fredii* NGR234.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar genes diferencialmente expressos do rizóbio NGR234 quando este faz simbiose com três diferentes plantas que apresentam características diferentes e relacioná-los com o processo de nodulação.
- Validar os genes diferencialmente expressos (GDE) através de RT-qPCR e analisar a expressão com fusão transcricional a gene repórter.
- Identificar potenciais regiões transcritas em ncRNAs.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

As plantas utilizadas neste trabalho foram *Phaseolus vulgaris* BAT93, *Tephrosia vogelii* e *Vigna unguiculata*, todas pertencentes a família Fabaceae. A escolha dessas plantas foi devido a capacidade dessas interagirem com *S. fredii* NGR234 e formarem nódulos, e porque são consideradas plantas modelo para o estudo de simbiose. Além disso, as diferenças quanto ao tipo de nódulo e à resposta ao TTSS também influenciaram na escolha das plantas.

Phaseolus vulgaris, conhecido popularmente como feijão comum, é originário da América com base arqueológica e botânica (HAYAT *et al.*, 2013; PAPA *et al.*, 2005). A domesticação dessa planta ocorreu de forma independente na América do Sul e América Central, levando a dois conjuntos de genes diferentes para a mesma espécie, andina e mesoamericana, respectivamente (PETRY *et al.*, 2015; DEBOUCK *et al.*, 1993). Feijão comum BAT93 é um representante do conjunto mesoamericano e foi criado para alta produtividade em condições tropicais no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colômbia (PORCH *et al.*, 2009). Foi selecionado a partir de cruzamentos entre duas populações de raças primitivas. Essa variedade pode ser produzida em ambientes tropicais e temperados, e em câmara de crescimento, estufa, ou em condições de campo (BLAIR *et al.*, 2005).

P. vulgaris é de grande interesse agrônômico, sendo uma das leguminosas mais importantes do mundo (PETRY *et al.*, 2015). A produção anual de feijão global é de aproximadamente 12 milhões de toneladas (CGIAR, 2016). Entre mais de 30 espécies do gênero *Phaseolus*, *P. vulgaris* é a semente mais amplamente distribuída pelo mundo (MORALES, 2006), e é fonte de nutrientes para mais de 300 milhões de pessoas em partes da África Oriental e América Latina, representando 65% da proteína total consumido (PETRY *et al.*, 2015). Quanto a nodulação, *P. vulgaris* é capaz de responder a sinais de nodulação de diversos gêneros de rizóbios, levando em consideração que isolados nativos recuperados dos nódulos de *P. vulgaris* mostraram considerável diversidade genética. Apesar disso, a maioria das interações não são eficazes nessa planta (MICHIELS *et al.*, 1998).

Tephrosia vogelii é nativa da África tropical e foi introduzida como uma cultura de cobertura na América tropical, bem como do Sul e Sudeste da Ásia (LI *et al.*, 2015). Ela pode ser cultivada para servir como inseticida contra pragas e ácaros nas plantas, como um medicamento para doenças de pele e vermes internos (KALUME *et al.*, 2012). *T. vogelii* também pode melhorar a fertilidade do solo, e é frequentemente usado em consórcio. Estudos têm mostrado um aumento de 30% em nutrientes do solo, e, como resultado, um aumento de 23-26% na produtividade da cultura consorciada (BUCAGU, VANLAUWE & GILLER, 2013). Tratamentos com *T. vogelii* aumentam o carbono orgânico e o nitrogênio no solo. Embora um aumento do carbono orgânico seja importante, a principal função do cultivo dessa planta é aumentar o teor de nitrogênio no solo, já que essa planta é capaz de formar nódulos fixadores de nitrogênio.

Vigna unguiculata provavelmente é originária da África Tropical, de onde teria se dispersado para outras regiões com clima semelhante. Essa planta apresenta vantagens econômicas, ambientais e agronômicas, contribuindo para melhorar a dieta dos camponeses em toda a África, Ásia e Sul da América, já que esse tipo de feijão constitui a base alimentar de muitas populações rurais, devido ao seu elevado valor nutritivo, nível proteico e energético, bem como a sua fácil adaptação a solos de baixa fertilidade e com períodos de estiagem (GONÇALVES *et al.*, 2016; FROTA *et al.*, 2008). Devido ao seu reconhecido valor nutricional, sua relação com a prevenção de diversas doenças metabólicas e cardiovasculares e as diversas formas de utilização dessa planta (folhas, vagens verdes, feijão verde, feijão maduro ou transformado em pasta ou farinha), permitiu que a produção global aumentasse de 1,3 a 7,0 milhões de toneladas entre 1981 e 2013 (GONÇALVES *et al.*, 2016). A sua capacidade de fixar nitrogênio do ar faz *V. unguiculata* um bom fertilizante para o solo, assim como *T. vogelii*.

4.2. BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS

As bactérias e plasmídeos que foram utilizados neste trabalho estão listados nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

TABELA 1: ESTIRPES DE *Escherichia coli* e *Sinorhizobium* UTILIZADAS NO TRABALHO.

Estirpe	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referência
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)φ80d <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i>	INVITROGEN
<i>Escherichia coli</i> S17.1	Sm ^R Spm ^R Tra+ <i>pro his recA hsdR</i> (RP4-2 <i>kan::Tn7 tet</i> ; Mu, integrado no cromossomo)	SIMON, PRIEFER & PUHLER, 1983.
<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	Rif ^R derivado do tipo selvagem de NGR234	LEWIN et al., 1990.

TABELA 2: PLASMÍDEOS UTILIZADOS NO TRABALHO.

Plasmídeos	Genótipo/Fenótipo	Fonte/Referência
pTZ57R	Vetor de clonagem. Amp ^R	FERMENTAS.
pPROBE-GT	Vetor de clonagem que contém o gene <i>gfp</i> sem promotor. Gm ^R	MILLER; LEVEAU & LINDOW, 2000.

4.3. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas nos meios Luria Bertani (LB) e Luria-ágar (LA) (SAMBROOK et al., 1989), com incubação a 37°C. Quando estavam em meio líquido, as estirpes foram cultivadas sob agitação de 120 rpm. A composição de LB é 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl e 10 g/L de triptona. A esterilização do meio foi realizada em autoclave a 120°C por 20 minutos. Para o preparo do meio LA foi adicionado 1,5% de ágar no meio LB.

O *Sinorhizobium fredii* NGR234 foi cultivado em meio TY (Tryptone yeast), a 28°C e sob agitação quando estava em meio líquido. O meio TY apresenta a seguinte composição: 3 g/L de extrato de levedura, 0,87 g/L de CaCl₂.H₂O e 5 g/L de triptona. O pH do meio foi corrigido para 6,8 com NaOH 1M caso fosse necessário aumentar o pH do meio ou HCl caso fosse necessário diminuir o pH. A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C, por 20 minutos. Para o meio TY sólido foi acrescido 1,5% de ágar (BERINGER, 1974).

O meio mínimo para rizóbio (RMS) foi preparado a partir de soluções estoque individuais, 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. As composições das soluções estoque estão apresentadas na tabela 3.

TABELA 3: COMPOSIÇÃO DO MEIO MÍNIMO PARA RIZÓBIO (RMS).

Solução	Composição
I-A	205 g/L K_2HPO_4 ; 145 g/L KH_2PO_4 ; 15 g/L NaCl
I-B	50 g/L NH_4NO_3
II	50 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
III	10 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
IV	123 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 87 g/L K_2SO_4 0,34 g/L $MnSO_4$ 0,5 g/L H_3BO_3 0,29 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,06 g/L $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g/L $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
VITAMINAS	Gamborg 1000X (Sigma)
SUCCINATO DE SÓDIO 1,2M	324 g/L $C_4H_4O_4Na_2 \cdot 6H_2O$

Para o preparo de 100 mL de meio de cultura foram utilizados 95,7 mL de água destilada autoclavada e foram adicionados 1mL das soluções I-A, I-B e II e 100 μ L das soluções III, IV e de vitaminas e 1mL de solução de succinato de sódio como fonte de carbono, nesta ordem.

O meio B&D, nutritivo para as plantas, foi preparado a partir das soluções estoque individuais, presentes na tabela 4. Para o preparo de 10 L de B&D foi adicionado 5 mL de cada uma das soluções estoque na seguinte ordem: Solução D, Solução B2, Solução A, Solução B1, Solução C. O pH foi ajustado para 7.0, utilizando HCl 1 mol/L ou KOH 1 mol/L. Quando necessário, o meio foi autoclavado a 120°C por 20 minutos.

TABELA 4: COMPOSIÇÃO DO MEIO NUTRITIVO B+D.

Solução	Composição
A	$CaCl_2 \cdot H_2O$, 2M
B1	KH_2PO_4 , 1M
B2	K_2HPO_4 , 1M
C	$FeC_6H_6O_7 \cdot H_2O$, 0,02M
D (SOLUÇÃO DE OLIGOELEMENTOS)	$MgSO_4$ 0,5M; K_2SO_4 0,5M; $MnSO_4$ 2mM; H_3BO_3 4mM; $CuSO_4$ 4mM; $CoSO_4$ 0,2mM; $ZnSO_4$ 1mM; Na_2MoO_4 0,2Mm

4.4. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados foram: ampicilina (Amp) 250 µg/mL, rifampicina (Rif) 50 µg/mL e gentamicina (Gm) 15 µg/mL. A escolha do antibiótico a ser usado foi feita de acordo com o plasmídeo e estirpe bacteriana utilizados.

4.5. CULTIVO DAS PLANTAS

4.5.1. Preparo dos potes de cultivo

Os potes de cultivo consistem em dois recipientes, superior e inferior, que se encaixam. O recipiente superior possui uma abertura no fundo, por onde passa uma tira de papel filtro, que fica em contato com o meio de cultura para as plantas (B+D), presente no compartimento inferior, com a finalidade de manter o substrato umedecido. O substrato utilizado é a vermiculita expandida, que é colocado no recipiente superior. Após a montagem desse sistema, os frascos foram tampados e autoclavados por 20 minutos a 120° C, para posteriormente receberem as plântulas.

4.5.2. Desinfecção das sementes

Para eliminar qualquer microrganismo existente na semente foi realizada a desinfecção daquelas que apresentavam aspecto saudável. As sementes utilizadas no experimento foram: *Phaseolus vulgaris* (20 sementes), *Tephrosia vogelii* (10 sementes) e *Vigna unguiculata* (7 sementes). A esterilização de *Phaseolus vulgaris* foi realizada por imersão em ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) por 10 minutos, com agitação manual suave. Em seguida, o ácido foi removido e as sementes foram lavadas no fluxo com água ultra pura por muitas vezes para remoção do ácido. A esterilização de *Vigna unguiculata* foi feita por imersão das sementes em ácido

sulfúrico concentrado por 10 minutos. As sementes foram então lavadas com água ultra pura e imersas em peróxido de hidrogênio 5% (v/v) (H₂O₂) por cinco minutos. Após esse período as sementes foram lavadas com água ultra pura, imersas em etanol 70% por cinco minutos e, novamente lavadas com água ultra pura. A esterilização de *Tephrosia vogelii* foi feita por imersão das sementes em ácido sulfúrico concentrado por 10 minutos. As sementes foram então lavadas com água ultra pura e imersas em Tween 20 0,1% por 10 minutos. Após esse período as sementes foram lavadas com água ultra pura, imersas peróxido de hidrogênio 5% por cinco minutos e novamente lavadas com água ultra pura. A esterilização foi realizada em capela, e as etapas de lavagem foram realizadas em cabine de fluxo laminar.

4.5.3. Germinação das sementes

Após terem sido esterilizadas, as sementes foram distribuídas em placas de petri, contendo meio B+D acrescido de 0,5% de ágar. As placas foram envolvidas com papel alumínio e em seguida incubadas a 25°C durante dois dias, até que as raízes apresentassem aproximadamente 2 cm.

4.5.4. Transferência das sementes para os potes de cultivo

Em ambiente estéril, as sementes germinadas foram transferidas para os potes de cultivo, devidamente preparados. Uma pequena abertura era feita no substrato com uma ponteira e as sementes germinadas eram introduzidas com as radículas voltadas para baixo. Os potes eram fechados e levados até a câmara de vegetação, com controle de temperatura, umidade e luz. A temperatura diurna foi de 24°C, a noturna, de 20°C e um fotoperíodo de 16 horas a 70% de umidade. Os potes ficaram fechados na câmara de vegetação durante dois dias, até as sementes germinadas se tornarem plântulas. Posteriormente, foram levadas para o laboratório, onde receberam o inóculo.

4.6. PREPARO DOS INÓCULOS

Para a obtenção dos inóculos, a estirpe *S. fredii* NGR234 foi cultivada em meio TY líquido com rifampicina, sob agitação a 28°C, pelo período de doze horas. Posteriormente, as células foram inoculadas em meio mínimo RMS, sem antibióticos. Após 24h de crescimento a densidade óptica (DO₆₀₀) das culturas foi determinada por espectrofotometria. As culturas foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com sulfato de magnésio 10 mM, ajustando-se a DO₆₀₀ para 0,7. As amostras foram então diluídas 10X na mesma solução para se obter um número aproximado de 10⁸ células por mililitro. Após a preparação dos inóculos os potes das três plantas foram destampados, inoculados com 300 uL de bactérias da estirpe NGR234, bem próximos à radícula da plântula. O substrato foi coberto com uma camada de cerca de 1 cm de bolinhas de polipropileno estéreis para evitar contaminação.

As plantas foram devolvidas para a câmara de vegetação e mantidas por três semanas. Sempre que necessário o meio de cultivo B+D foi repostado nos potes, sempre em ambiente estéril.

Após três semanas de cultivo, os potes foram abertos, os nódulos coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até seguir com a extração de RNA. Para *P. vulgaris* e *V. unguiculata* os experimentos foram feitos em triplicata biológica utilizando aproximadamente 200 mg de nódulos em cada replicata. Para *T. vogelii* o experimento foi realizado em duplicata biológica, com 200 mg, pois não haviam nódulos suficientes.

4.7. EXTRAÇÃO DE RNA BACTERIANO

Devido à instabilidade da molécula de RNA, o local de trabalho para a extração de RNA foi preparado, limpando tudo com detergente, álcool 70% e RNaseZap (Ambiom), para eliminar possíveis RNases. O local e os materiais eram para uso exclusivo com RNA.

O RNA total bacteriano dos nódulos das três plantas (*Phaseolus vulgaris*, *Tephrosia vogelii* e *Vigna unguiculata*) com 21 dias e do *S. fredii* NGR234 em condição de vida livre foi purificado com o kit “RNAqueous” (Life Technologies), segundo as orientações do fabricante, para cada tipo de amostra (nódulo e vida livre). Foi realizada a precipitação com LiCl (kit *RNAqueous*) para remover a contaminação grossa de carboidratos e DNA. Em seguida as amostras de RNA total foram tratadas com o kit TURBO DNA-free (Ambion) e incubadas em estufa 37°C por 1 hora. A DNase foi inativada com a adição de 10% do volume do sistema com a solução inativadora. Essa mistura foi deixada a temperatura ambiente por 5 minutos. Na sequência as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm (Mini Spin, Eppendorf), por 2 minutos para decantar a solução inativadora e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

O RNA obtido foi analisado em gel de agarose e quantificado no aparelho NanoDrop (Thermo Scientific). Após a quantificação no NanoDrop, utilizou-se do Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Genomics) para analisar, além da quantidade, a qualidade e a integridade do RNA extraído. Esse procedimento foi realizado segundo recomendações do fabricante.

Em seguida, visando eliminar o RNA de origem vegetal foi utilizado o kit *MicrobEnrich* (Ambion). Mesmo quando se tratava da bactéria em condição de vida livre, esse kit também foi utilizado para que todas as amostras seguissem exatamente os mesmos passos. Outra depleção foi realizada, para eliminação dos RNAs ribossomais das amostras e enriquecê-las com RNAs mensageiros. Para isso foi utilizado o kit *Ribo-Zero* (Epicentre). Após a depleção de RNA ribossomal, a concentração de RNA nas amostras foi quantificada através do Qubit – Quant-iT Assays (Invitrogen). Todos os procedimentos para essas três etapas foram realizados conforme recomendações do fabricante.

4.8. CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO

Para construção das bibliotecas utilizou-se, segundo as recomendações do fabricante, o kit *Ion Total RNA-Seq v2 for Whole Transcriptome Libraries* (Ion Torrent – Life Technologies). As amostras continham entre 128 – 290 ng de RNA depletado.

Depois da realização da transcrição reversa, para purificação do cDNA foi utilizado o MinElute PCR Purification (Qiagen).

Fragmentos entre 150 e 200 nucleotídeos foram selecionados para construção da biblioteca e para isso foi utilizado o sistema eletroforetico E-Gel® SizeSelect™ (ThermoFisher Scientific) para separação das bandas. O cDNA de tamanho selecionado foi amplificado para inserção dos Barcodes nas amostras, em seguida purificado utilizando o kit PureLink™ PCR Micro Kit (Invitrogen™) seguindo recomendações fornecidas pelo fabricante. Para que as amostras seguissem com uma concentração padrão para a próxima etapa, uma quantificação através da qPCR foi realizada.

A última etapa antes do sequenciamento foi a PCR em emulsão. Para isso foi utilizado o kit *Ion PI Template v3* (Ion Technologies) seguindo as recomendações do fabricante. Nesta etapa cada fragmento do cDNA foi imobilizado a *beads* magnéticos. As amostras foram purificadas e cada *bead* representa uma sequência única da biblioteca. Após a PCR em emulsão o sequenciamento foi realizado através da plataforma Ion Proton (Life Technologies).

4.9. ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS

Para analisar e trabalhar com as sequências produzidas foram utilizados alguns softwares que permitem a visualização, mapeamento, seleção de leituras com qualidade, entre outras funções.

4.9.1. Artemis

O *software* Artemis é um navegador de genoma gratuito e uma ferramenta de anotação que permite visualizar as características da sequência, dados de sequenciamento feitos em plataformas de nova geração e os resultados das análises de acordo com o contexto da sequência, e também a sua tradução nas fases de leitura (*frames*) possíveis. Artemis é escrito em Java e está disponível para

as plataformas UNIX, Macintosh e Windows. É um *software* livre e deve funcionar em qualquer sistema com uma versão recente do Java (SANGER, 2012). Foi utilizado para visualização do genoma de *Sinorhizobium fredii* NGR234 e das leituras geradas no sequenciamento correspondentes a cada gene.

4.9.2. Rockhopper

O Rockhopper foi desenvolvido em Java, sendo um sistema para a análise computacional de dados de RNA-seq bacteriano. É possível fazer *upload* de arquivo(s) de leituras de sequenciamento em larga escala nos formatos Fastq, Qseq, Fasta, Sam ou Bam.

Rockhopper realiza as seguintes tarefas: alinhamento de leituras a um genoma, normalização de dados de diferentes experimentos, montagem de transcriptoma, identifica os limites de transcrição e novas transcrições, como RNAs curtos, quantifica expressão, expressão diferencial de genes, localização de operons e visualização dos resultados em um navegador de genoma (MCCLURE *et al.*, 2013). O software está disponível no endereço <http://cs.wellesley.edu/~btjaden/Rockhopper/>. Esse foi um dos *softwares* utilizados para mapeamento RNA-Seq.

4.9.3. Sam Tools

Formato SAM (mapeamento e alinhamento de sequências) é um formato genérico para armazenar grandes sequências de alinhamentos. SamTools fornece vários utilitários para manipulação de alinhamentos no formato SAM, incluindo separar, mesclar, indexar, converter em outros formatos e gerar alinhamentos em um formato por posição (SAMTOOLS, 2012). Foi utilizado para gerar arquivos compatíveis com *input* do software Artemis.

4.9.4. CLC Genomics Workbench

O CLC DNA *Workbench* é uma bancada de trabalho ‘virtual’ que possibilita análises em sequências de DNA, RNA e proteínas. O *software* suporta ler mapeamento de Sanger e dados de sequenciamento das tecnologias SOLiD, Ion Torrent/Proton, 454 e Illumina; montagem de novo, detecção de SNP em genomas inteiros, a detecção de variações estruturais dos genomas, análise de Chip-seq, RNA-Seq, análise de *small*/RNA e BLAST. Permite analisar, visualizar e comparar dados genômicos, transcriptomas e epigenômicos de todas as principais plataformas de *high-throughput*. Além disso, é independente de sistema operacional (CLC BIO, 2012).

O CLC, versão 7.5, foi o primeiro software a ser utilizado depois que as leituras provenientes do sequenciamento ficaram disponíveis. As sequências produzidas foram selecionadas por qualidade, mapeadas contra o genoma de referência e analisadas.

4.10. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

4.10.1. Identificação dos genes diferencialmente expressos entre as três plantas

Para avaliar a expressão de um gene entre bibliotecas diferentes foi necessária uma normalização da quantidade de leituras para permitir a comparação entre as bibliotecas. A normalização foi feita pelo método de RPKM (*reads per kilobase of transcript per million mapped reads*) (MORTAZAVI *et al.*, 2008), que mede o valor de expressão de um gene levando em consideração o tamanho da biblioteca, o tamanho dos genes e o número de leituras por gene, utilizando a fórmula (fórmula para procariotos - bibliotecas que não apresentam exons):

$$\text{RPKM} = \frac{\text{número de leituras totais do gene}}{\text{número de leituras mapeadas (tamanho da biblioteca) x tamanho do gene}}$$

Além da normalização, outro parâmetro para análise de expressão de um gene é a cobertura, que determina quantas vezes o gene seria coberto por inteiro se as leituras fossem alinhadas lado a lado. Esse valor pode ser calculado da seguinte forma:

$$\text{Cobertura} = \frac{\text{número de leituras por gene} \times \text{tamanho médio das leituras da biblioteca}}{\text{tamanho do gene}}$$

Os genes que apresentavam uma cobertura igual ou maior que 3 vezes foram submetidos à análise de expressão diferencial através do programa DESeq (ANDERS & HUBER 2010), utilizando a ferramenta RobiNA (<http://mapman.gabipd.org/web/guest/robin>; LOHSE *et al.*, 2012) que disponibiliza esse programa em uma versão Java de fácil execução. Este programa utiliza método estatístico baseado na distribuição binomial negativa e no teste de Benjamini-Hochberg (1995) que gera um p-ajustado levando em consideração testes de hipóteses múltiplas. A análise da expressão diferencial foi feita entre as bibliotecas das três plantas, comparando umas com as outras:

- a) *Phaseolus vulgaris* – *Tephrosia vogelii*;
- b) *Phaseolus vulgaris* – *Vigna unguiculata*;
- c) *Tephrosia vogelii* – *Vigna unguiculata*.

O *output* do DE-Seq foi utilizado para chegar a lista final dos genes diferencialmente expressos (GDE). Um gene foi considerado diferencialmente expresso quando mostrou um valor de expressão, calculado pelo teste de Baggerley, com confiança de 95% (*p-value* <0,05) e variação de expressão dos genes (*fold change*) maior ou igual a 2, ou menor ou igual a -2.

Os genes que se mostraram diferencialmente expressos nas três tabelas passaram pela análise do KAAS (KEGG *Automatic Annotation Server* - KEGG Servidor de anotação automática) com a finalidade de indicar as vias metabólicas de *S. fredii* NGR234 que esses genes pertencem.

4.10.2. KEGG e KAAS

Para análise preliminar dos genes diferencialmente expressos foi utilizado um servidor do KEGG, o KAAS. O KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - Kyoto Enciclopédia de Genes e Genomas) é um recurso de banco de dados para a compreensão das funções de sistemas biológicos, como a célula, o organismo e o ecossistema, a partir de informações em nível molecular, especialmente em conjuntos de dados moleculares gerados pelo sequenciamento do genoma e outras tecnologias experimentais de elevado rendimento.

O KAAS (*KEGG Automatic Annotation Server* - KEGG Servidor de anotação automática) fornece anotação funcional de genes por meio de comparações BLAST contra o banco de dados manualmente curado GENES KEGG. O resultado contém KO (*KEGG Orthology*) que é um identificador automatizado de atribuições e vias metabólicas (MORIYA *et al.*, 2007; KANEHISA *et al.*, 2012).

4.11. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL UTILIZANDO PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

Após a obtenção das listas dos genes diferencialmente expressos foram escolhidos alguns desses genes para validação através da PCR quantitativa em tempo real. *Primers* para vários genes do *S. fredii* NGR234 já haviam sido sintetizados para outros trabalhos desenvolvidos no laboratório. Uma comparação entre a lista de *primers* disponíveis com as listas dos genes diferenciais foi feita e os genes que tinham iniciadores para validação foram selecionados para a reação de RT-qPCR. Tanto a curva de eficiência como a concentração ótima de cada *primer* já haviam sido determinadas por trabalhos anteriores e constam na tabela 5.

Para validação com RT-qPCR, os cDNAs foram sintetizados usando o kit High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems), de acordo com especificações do fabricante. A quantidade de RNA total utilizado foi de 2 µg e o volume total de reação foi de 20 µL. As reações de RT-qPCR foram realizadas em uma placa de 96 poços, com três replicatas experimentais de cada reação,

realizadas no aparelho “StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems”, da Applied Biosystems, utilizando SYBR® Select Master Mix, também da Applied Biosystems. O volume total de reação era de 6 µL e continha 3 µL SYBR mix, 1,5 µL do par de *primer* e 1,5 µL de cDNA, perfazendo 3 ng de RNA adicionado a reação. Os seguintes parâmetros foram utilizados: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, e a fase da curva de *melting* com 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e mais 15 segundos a 95°C. Os *primers* utilizados como endógenos (controle interno) foram GAPDH (NGR_c28070), *gyrB* (NGR_c33610), analisados pelo programa GeNorm (VANDESOMPELE *et al.*, 2002) que determina os genes *housekeeping* mais estáveis de um grupo de genes testados e aplica um fator de normalização, que pode ser incorporado na expressão do gene em cada amostra. Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizado o método descrito por PFAFFL *et al.* (2002), que baseia-se na eficiência do primer e no delta de Ct.

TABELA 5: PRIMERS UTILIZADOS PARA A RT-qPCR E SUAS CARACTERÍSTICAS.

Nome dos genes	Eficiência	Concentração dos primers em nM	R ²
<i>dnaA</i>	2,03	400	0,9961
NGR_c11890	2,08	800	0,998
<i>nodD2</i>	2	400	0,9885
<i>nopB</i>	1,89	800	0,9914
<i>pqqD</i>	1,94	400	0,9962
<i>rpsG</i>	2,03	200	0,9966
<i>rpsL</i>	2,1	400	0,9993
<i>syrM2</i>	1,98	200	0,9763
<i>thuA</i>	1,91	400	0,9947

FONTE: Joseph A. M. Evaristo

4.12. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL UTILIZANDO FUSÃO COM GFP

Do mesmo modo que alguns genes das listas de genes diferenciais foram selecionados para a validação através da RT-qPCR, após a obtenção das listas observou-se os genes que mais se destacaram quanto ao nível de expressão e a região regulatória desses genes foi clonada no plasmídeo pPROBE-GT para obter

uma fusão transcricional com o gene *gfp* (*green fluorescent protein*) e analisar a expressão desses genes de maneira qualitativa nos bacteróides, através da observação da fluorescência. Foram utilizadas fusões de GFP de quatro genes: *nopB*, *rmlB*, *pqqA32*, *pqqA65*. As duas primeiras fusões foram construídas em outro trabalho (Wassem, R., 2010 – não publicado) e as duas últimas foram construídas neste trabalho. A região escolhida para a construção das fusões nesse trabalho regula tanto um operon, quanto uma enzima (álcool desidrogenase). Essa região foi analisada a nível de nucleotídeos e *primers* foram desenhados utilizando o programa *NetPrimer* disponível em <http://www.premierbiosoft.com>. As sequências dos primers construídos são apresentadas na tabela 6, assim como suas temperaturas de anelamento. Nos iniciadores foram inseridos sítios para enzimas de restrição com o objetivo de facilitar a clonagem da região amplificada em um vetor de expressão.

TABELA 6: SEQUÊNCIA E TEMPERATURA DE ANELAMENTO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NESTE TRABALHO.

IDENTIFICAÇÃO	SEQUÊNCIA	TEMPERATURA DE ANELAMENTO	SÍTIO DE RESTRIÇÃO
<i>pqq2</i>	<i>rev</i> - 5' CGGTGGTCGGAATTCAGATCA 3'	57,0 °C	<i>EcoRI</i>
<i>pqqA</i>	<i>for</i> - 5' CACGGAATTCAGCATCAATCTT 3'	53,6 °C	<i>EcoRI</i>

4.13. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

As reações foram elaboradas com a enzima Taq polimerase. A temperatura de anelamento foi de 59°C.

4.14. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para visualizar e analisar os produtos de PCR obtidos e de plasmídeos com os insertos construídos. A concentração de agarose variou conforme a necessidade e o tampão de corrida

utilizado foi o tampão TBE 1X (Tris 90 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2mM). Após a corrida os géis foram corados por imersão do gel em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL. Os géis foram visualizados em transluminador de luz ultravioleta e fotografados por um fotodocumentador (Cell biosciences).

4.15. LIGAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Os fragmentos amplificados por PCR foram clonados no vetor pTZ57R/T, que contém uma timina adicionada as extremidades do vetor linearizado (Fermentas). O vetor linearizado e o inserto foram ligados de acordo com as orientações do fabricante. Outras reações de ligação foram realizadas de forma semelhante. A ligação foi incubada a 8°C *overnight*.

4.16. RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA

Diversas amostras de DNA precisaram ser clivadas com enzimas de restrição, previamente a ligação ou para confirmação de clonagem. As reações foram realizadas conforme recomendação do fabricante e incubadas a 37°C ou a 30°C (dependendo da enzima) por aproximadamente 3 horas.

4.17. CÉLULAS COMPETENTES

Foi realizado um pré-inóculo de 5 mL com a estirpe de *E. coli* DH10B, aproximadamente 12 horas antes do procedimento. No dia seguinte, 500 µL desse pré-inóculo foi inoculado em 80 mL de meio de cultura LB em um erlenmeyer de 500 mL, e deixado incubando a uma temperatura de 37°C e agitação constante de 120 rpm até atingir D.O₆₀₀ entre 0,2 e 0,4. Após atingir a D.O. desejada a cultura foi distribuída em dois tubos de centrífuga estéreis e mantida em banho de gelo por 15

minutos antes do início do procedimento. As células foram então centrifugadas a 2500g em uma temperatura de 4°C por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 15 mL de solução de MgCl₂ 100 mM estéril e gelada. Uma nova centrifugação foi realizada, o pellet ressuspenso em 25 mL de solução de CaCl₂ 100 mM e incubado em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida a cultura foi novamente centrifugada, as células foram ressuspensas em 800 µL de CaCl₂ 100 mM preparada com 20% de glicerol e aliqotadas em porções de 100 µL em tubos de 1,5 mL estéreis e gelados. As alíquotas foram armazenadas a -80°C.

4.18. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO

Uma alíquota de 100 µL de *E. coli* termo competentes foi descongelada em banho de gelo, combinada a 1 a 5 µL do DNA a ser transformado e incubada por trinta minutos em banho de gelo. Em seguida, a reação foi submetida a um choque térmico de 42°C durante 45 segundos e novamente incubada em gelo por cinco minutos. Após isso, foi adicionado 1 mL de meio LB ao tubo e as células foram recuperadas sob agitação constante de 120 rpm por 40 minutos a 37°C. Para selecionar os transformantes, aproximadamente 100 a 300 µL das células foram plaqueadas em meio LA com os antibióticos específicos.

4.19. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

O DNA plasmidial foi extraído das culturas de *E. coli* que foram multiplicadas em meio líquido LB e incubadas à 37°C sob agitação constante. Alíquotas de 1,5 mL foram centrifugadas por 45 segundos a 13000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspenso com a adição de 150 µL de GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris HCl pH 8,0 25 mM). Para a lise das células, foi acrescentado 150 µL de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,18M). Para neutralizar o pH foi adicionado 150 µL de KacF (acetato de Potássio 3M, ácido fórmico 1,8M, pH 4,8) e deixado no gelo por 5 minutos. Foi adicionado, em seguida, 50 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico

(25:24:1) e a mistura foi homogeneizada e centrifugada por cinco minutos. Foi coletado 450 μL do sobrenadante, que foi transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 2,5 vezes o volume de etanol 100% e centrifugado por dez minutos. A lavagem do DNA foi feita com 1 mL de etanol 70%, centrifugado por 5 minutos e seco. O DNA foi então dissolvido em 20 μL de água ultra pura.

4.20. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento de DNA foi realizado pelo método de terminação de cadeia (SANGER *et al.*, 1977) no sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystem). Este método foi utilizado para a confirmação das seqüências de DNA clonadas nos vetores.

As amostras de DNAs plasmidiais sequenciadas foram tratadas com 0,5 μL de RNase 10 mg/mL e incubadas a 37°C por três horas ou mais. Posteriormente, o volume da amostra foi ajustado para 100 μL com água ultra pura e foi adicionado 50 μL de clorofórmio. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 4 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e ao clorofórmio restante foram novamente adicionados 50 μL de água e o procedimento foi repetido. Ao sobrenadante coletado foi adicionado 2/3 volumes de acetato de amônio 7,5 M e 2,5 volumes de etanol absoluto, seguido de homogeneização por inversão e centrifugação por 10 minutos a 13000 rpm. O pellet foi lavado com etanol 70% e centrifugado por 5 minutos. O DNA foi seco e dissolvido em 10 μL de água ultra pura. As reações de sequenciamento foram elaboradas em um volume total de 10 μL , contendo 2 μL de tampão Big Dye, 0,8 μL de Big Dye, 0,6 μL do primer (UNI ou REV), 1 a 7 μL de DNA e o volume final foi ajustado com água ultra pura. A reação foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos e 34 ciclos de: 95°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos, extensão a 60°C por 2 minutos. As amostras foram purificadas para serem levadas para sequenciamento. Foi adicionado 10 μL de água ultra pura e 2 μL de acetato de amônio 7,5 M. A mistura foi homogeneizada, foi adicionado 65 μL de etanol 100% e foi centrifugado por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi lavado

com 500 µL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi seco no escuro *overnight* e então, sequenciado.

4.21. CONJUGAÇÃO E SELEÇÃO

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

4.22. ANÁLISE DE POTENCIAIS SEQUÊNCIAS TRANSCRITAS EM RNAs NÃO CODIFICADORES (ncRNAs)

Para encontrar potenciais regiões transcritas em RNAs não codificadores duas estratégias foram feitas: uma buscando encontrar ncRNAs através da homologia de sequência com o *Sinorhizobium meliloti*, já que este organismo teve seus ncRNAs propostos em um estudo de transcriptoma feito por Schluter (2010) e é da mesma família do NGR234; e outra estratégia foi utilizar um software de predição de ncRNAs denominado RNASpace.

4.22.1. Busca através de homologia de sequência

Para encontrar RNAs não codificadores através de homologia de sequência com o *S. meliloti* utilizou-se das sequências de nucleotídeos desse organismo, que

correspondem a ncRNAs. Através do site do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) um BLAST de nucleotídeos dessas sequências foi realizado com o genoma do NGR234 buscando encontrar o maior número de regiões semelhantes e, posteriormente analisar se ela também poderia corresponder a um ncRNA.

4.22.2. RNASpace

O software de predição de RNA não codificador no genoma de organismos procariotos, denominado RNASpace é uma ferramenta que permite anotações estruturais e funcionais das moléculas de ncRNAs. Ele disponibiliza uma variedade de localizadores de genes de ncRNA e bancos de dados de ncRNA, bem como ferramentas de fácil utilização para explorar resultados computados. As ferramentas de predição se baseiam na pesquisa por homologia em bancos de dados, que identifica regiões que são semelhantes aos RNAs não-codificantes já conhecidos. Os bancos de dados que podem ser selecionados no *software* são BLAST, Darm, ERPIN, INFERNAL, RNAmmer, tRNAscan-se e YASS. Outra ferramenta se baseia na análise comparativa, que compara os dados obtidos com uma seleção de sequências do genoma de diferentes espécies para descobrir regiões significativamente conservadas, e por fim, através de predição *Ab initio*, que utiliza recursos de estatísticas intrínseco dos dados. RNASpace é desenvolvido em Python, e é protegido por direitos autorais com a Licença Pública Geral GNU, e é livre (no sentido GNU) para que todos possam usar (RNASPACE, 2011). Essa ferramenta está disponível em <http://www.rnaspacespace.org/>.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o intuito de analisar o transcriptoma do *Sinorhizobium fredii* NGR234 quando ele se encontra em condição de vida livre e quando ele se associa com as plantas *Phaseolus vulgaris*, *Tephrosia vogelii* e *Vigna unguiculata*, foram construídas bibliotecas de RNA-Seq para cada condição e, posteriormente, os genes diferencialmente expressos dos bacteróides foram analisados. Os genes que se mostraram diferenciais foram submetidos no KAAS, uma ferramenta disponível no banco de dados KEGG, com a finalidade de indicar as vias metabólicas e processos celulares de *S. fredii* NGR234 que esses genes pertencem, e assim, discutir a nível gênico as diferenças encontradas. RT-qPCR e análise de fluorescência através da microscopia confocal foram utilizados para confirmar a diferença no nível de expressão encontrada nos dados de RNA-Seq. Uma análise de RNAs não codificadores também foi realizada, utilizando o transcriptoma do NGR234 em condição de vida livre, com o objetivo de encontrar alguns desses RNAs. Um resumo do trabalho pode ser observado na Figura 5.

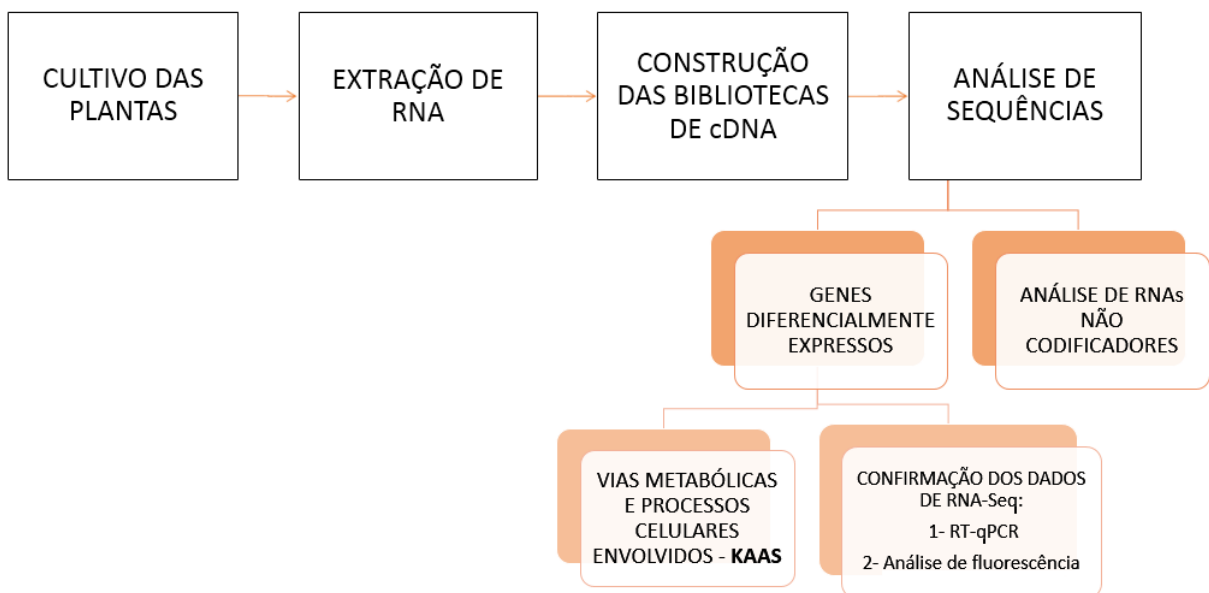


FIGURA 5: FLUXOGRAMA DOS PASSOS REALIZADOS PARA OBTENÇÃO DOS RESULTADOS GERADOS NO PRESENTE TRABALHO.

5.1. EXTRAÇÃO DE RNA, CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DE BIBLIOTECAS DE RNA-SEQ

O RNA total foi extraído dos nódulos das três espécies de plantas, *P. vulgaris*, *V. unguiculata* e *T. vogelii*, 21 dias após a inoculação com *S. fredii* NGR234. Com exceção de *T. vogelii*, o experimento com as demais plantas e o *S. fredii* NGR234 vida livre foi realizado em triplicata. O pequeno número de nódulos obtidos de *T. vogelii* não permitiu a construção da terceira biblioteca. Visando enriquecimento para os transcritos do rizóbio, para evitar ao máximo contaminação com RNAs provenientes das plantas foi utilizado o kit MicrobEnrich antes da depleção de RNA ribossômico (RNAr). A concentração de RNA total antes e após a depleção de RNAr estão apresentados na tabela 7.

TABELA 7: CONCENTRAÇÃO DE RNA OBTIDO A PARTIR DOS NÓDULOS

Amostra	RNA total (ug)	RNA total depletado (ng)
<i>Phaseolus vulgaris</i> 1	30,0	220,8
<i>Phaseolus vulgaris</i> 2	26,1	281,6
<i>Phaseolus vulgaris</i> 3	14,7	213,6
<i>Tephrosia vogelii</i> 1	21,8	265,0
<i>Tephrosia vogelii</i> 2	22,0	237,0
<i>Vigna unguiculata</i> 1	13,3	229,0
<i>Vigna unguiculata</i> 2	15,0	151,6
<i>Vigna unguiculata</i> 3	15,0	150,8
<i>S. fredii</i> NGR234 1	3,7	128,0
<i>S. fredii</i> NGR234 2	3,5	143,0
<i>S. fredii</i> NGR234 3	3,2	132,0

NOTA: Para cada replicata biológica das plantas foram utilizados aproximadamente 200mg de nódulos, e para condição vida livre foi utilizado 5 mL de cultura com D.O₆₀₀ 0,3. Para depleção de RNA ribossomal todo o RNA disponível foi utilizado.

As bibliotecas obtidas foram sequenciadas na plataforma Ion Proton, que gera aproximadamente 50 milhões de leituras em uma corrida típica de RNA-Seq. Com o objetivo de obter uma grande quantidade de leituras foram realizadas três corridas para as bibliotecas de RNA extraído de bacteroides das três espécies de plantas e apenas uma corrida para o RNA de *S. fredii* NGR234 vida livre, resultando num total de 100.597.343 leituras (TABELA 8). A análise dos componentes

principais (PCA) foi realizada e as replicatas biológicas das bibliotecas se mostraram agrupadas entre si, permitindo sua análise.

O programa CLC Genomis Workbench foi utilizado tanto para o mapeamento, quanto para o filtro de qualidade (*trimming*). A filtragem removeu sequências de baixa qualidade (limite de 0,05), nucleotídeos ambíguos (máximo permitido foi dois), e sequências menores que 15 pares de bases.

As leituras também foram mapeadas contra RNAs ribossômicos do NGR234, para avaliar se a depleção realizada durante a construção das bibliotecas foi eficiente. Nas bibliotecas de plantas inoculadas com o NGR234, uma média de apenas 0,20% das leituras mapearam contra RNAs ribossômicos da bactéria, indicando que o método da depleção de RNAr da bactéria foi eficiente. Na biblioteca do rizóbio na condição de vida livre, a porcentagem de leituras que mapearam contra as sequências de RNAs ribossômicos foi de dois por cento a mais (2,2%). Mesmo assim ainda considera-se uma excelente depleção, tendo em vista que uma amostra de RNA é considerada de alta qualidade quando, depletada de RNAr e sequenciada, apresenta menos que 5% de leituras mapeadas para RNAr da espécie (O'NEIL *et al.* 2013).

Após o *trimming* e a exclusão dos RNAr as bibliotecas passaram a ter um total de 99.355.589 leituras. O mapeamento RNA-Seq realizado no CLC (versão 7.5) gerou um total de 8.244.636 leituras mapeadas, utilizando as seguintes condições: número máximo de *mismatches* foi igual a 2, fração mínima de comprimento foi de 0,80, fração mínima de similaridade foi de 0,80, mapeamento em um único local. Esses valores significam que pelo menos 80% das bases da leitura devem alinhar com no mínimo 80% de similaridade contra o genoma de NGR234 para que o mapeamento da leitura seja aceito. Na biblioteca da condição de vida livre mais da metade das leituras (51,8%) mapearam contra o genoma do NGR234. Isso representa um bom resultado, com um bom número de leituras em apenas uma corrida de sequenciamento. Já nas bibliotecas em que o rizóbio foi inoculado nas plantas, o número de sequências mapeadas foi bem menor. A biblioteca do *P. vulgaris* foi a que teve mais sequências mapeadas entre as três plantas (6,87%); já as bibliotecas de *T. vogelii* e *V. unguiculata* apenas 3,9% do total de leituras foram mapeadas, em média.

Um segundo software, Rockhopper, foi utilizado para o mapeamento, admitindo os valores utilizados pelo *default*, e gerou um número de 10.942.644

leituras mapeadas, cerca de 25% a mais que o número de leituras obtidas no CLC. Os parâmetros utilizados nesse *software* eram menos rigorosos, por isso o número maior de leituras mapeadas. Devido a facilidade de análise posterior ao mapeamento, as análises de expressão diferencial foram realizadas com os dados produzidos pelo CLC.

Uma parte das sequências não mapearam contra NGR234, indicando provável existência de RNAs de origem vegetal nas amostras, além do fato de que é comum a ocorrência de alguns erros de sequenciamento. O mapeamento das leituras contra RNAs ribossômicos das plantas não foi realizado, porque essas sequências ainda não estão disponíveis em bancos de dados.

TABELA 8: RESUMO DO MAPEAMENTO DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS CONTRA O GENOMA DE *Sinorhizobium fredii* NGR234 UTILIZANDO OS SOFTWARES CLC GENOMIS WORKBENCH E ROCKHOPPER.

Amostra	Número total de leituras	Número de sequências mapeadas em RNAs ribossômico de NGR234	Número de leituras após o <i>Trimming</i>	Número de leituras mapeadas RNA-Seq contra NGR234	Número total de leituras	Número de leituras mapeadas RNA-Seq contra NGR234
<i>Phaseolus vulgaris</i> 1	7.942.306	8.201	7.916.140	464.242	7.942.306	478.036
<i>Phaseolus vulgaris</i> 2	10.616.059	18.502	10.117.273	691.524	10.616.059	733.335
<i>Phaseolus vulgaris</i> 3	10.868.365	20.523	10.819.239	865.411	10.868.365	901.720
TOTAL <i>P. vulgaris</i>	29.426.730	47.226	28.852.652	2.021.177	29.426.730	2.113.091
<i>Tephrosia vogelii</i> 1	15.418.179	31.259	15.347.655	383.720	15.418.179	400.914
<i>Tephrosia vogelii</i> 2	19.473.988	25.836	19.398.766	805.343	19.473.988	832.823
TOTAL <i>T. vogelii</i>	34.892.167	57.095	34.746.421	1.189.063	34.892.167	1.233.737
<i>Vigna unguiculata</i> 1	12.431.086	36.520	12.353.821	419.768	12.431.086	459.317
<i>Vigna unguiculata</i> 2	7.906.969	18.567	7.687.636	295.655	7.906.969	315.889
<i>Vigna unguiculata</i> 3	8.648.816	28.207	8.594.716	542.012	8.648.816	578.418
TOTAL <i>V. unguiculata</i>	28.986.871	83.294	28.636.173	1.257.435	28.986.871	1.353.624
<i>S. fredii</i> NGR234 1	3.727.424	80.817	3.641.754	1.726.678	3.727.424	2.975.079
<i>S. fredii</i> NGR234 2	2.408.161	48.812	2.355.360	1.368.725	2.408.161	2.208.052
<i>S. fredii</i> NGR234 3	1.155.990	30.621	1.123.229	681.558	1.155.990	1.052.596
TOTAL <i>S. NGR234</i>	7.291.575	160.250	7.120.343	3.776.961	7.291.575	6.235.727

NOTA: As colunas em azul representam as leituras mapeadas utilizando-se do software CLC Genomics Workbench 7.5, e as colunas em laranja, o Rockhopper. O NGR234 vida livre teve suas leituras mapeadas na versão 6.5 do software CLC.

5.2. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM BACTERÓIDES DE PLANTAS INOCULADAS COM NGR234.

As plantas utilizadas nesse trabalho para análise do transcriptoma do rizóbio NGR234 apresentam diferentes características, como por exemplo, o tipo de nódulo (determinado ou indeterminado), a resposta ao sistema de secreção tipo três (TTSS) (positiva ou negativa), entre outras (TABELA 9). Devido a essas diferentes características foram construídas três tabelas (1. *P. vulgaris* vs. *T. vogelii*; 2. *P. vulgaris* vs. *V. unguiculata* e, 3. *T. vogelii* vs. *V. unguiculata*) buscando encontrar os genes que são diferencialmente expressos e que possam ser responsáveis pelas diferentes características. Para a análise dos genes diferencialmente expressos (GDE) entre as bibliotecas do rizóbio, quando associado com as plantas, foram selecionados apenas os genes que apresentavam uma cobertura igual ou maior que 3 vezes, em pelo menos uma das bibliotecas. Esses genes foram analisados no *software* DE-Seq que gerou, a partir do número de leituras de cada gene, um valor de *fold change* e um valor de P ajustado. As listas finais de expressão diferencial continham os genes com valor de *fold change* (variação de expressão) maior ou igual a 2, ou menor ou igual a -2, cobertura maior que 3 em uma das duas comparações e valor de P com confiança de 95% (*p-value* <0,05). Alguns genes que seriam removidos das listas devido aos valores de *fold change*, cobertura ou valor de P, mas que estavam próximos a linha de corte e faziam parte de um operon com genes diferenciais, foram incluídos nas tabelas.

TABELA 9: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS QUE DIFERENCIAM AS TRÊS PLANTAS ESTUDADAS NESTE TRABALHO

	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Tephrosia vogelii</i>	<i>Vigna unguiculata</i>
Tipo de nódulo	Determinado	Indeterminado	Determinado
Resposta ao TTSS	Negativa	Positiva	Indiferente

Após a aplicação dos parâmetros para gerar as listas finais de expressão diferencial, obteve-se três tabelas com uma média de 270 genes diferencialmente expressos em cada uma. Entre a comparação de *P. vulgaris* e *T. vogelii* (PHA-TEP) o

número total de GDE foi 231, sendo 125 com maior diferença de expressão em *P. vulgaris* e 106 em *T. vogelii*. Os genes que apresentaram os maiores *fold change* em *P. vulgaris* codificam proteínas da classe dos transportadores ABC, diferente dos genes com maiores *fold change* em *T. vogelii*, que codificam moléculas para a biossíntese de tiamina, do operon *pqq* (pirroloquinolina quinona), operon *thu* (transporte de trealose) e operon *paa* (metabolismo de ácido fenilacético). A tabela resultante da comparação entre *P. vulgaris* e *V. unguiculata* (PHA-VIG) gerou 319 genes com expressão diferencial, sendo 172 deles com maior diferença de expressão em *P. vulgaris* e 147, em *V. unguiculata*. Os genes com maiores *fold change* em *P. vulgaris* codificam proteínas envolvidas com o sistema de secreção tipo três e com a síntese de lipopolissacarídeos de superfície. Em *V. unguiculata* o maior *fold change* é de genes envolvidos com o transporte de cobalto e alcanosulfonato, e também do operon *pqq*. Por fim, a tabela dos GDE entre *T. vogelii* e *V. unguiculata* (TEP-VIG) possui 270 genes, sendo 167 com maior diferença de expressão em *T. vogelii* e 103 em *V. unguiculata*. Os genes com maior *fold change* em *T. vogelii* também codificam proteínas envolvidas com o sistema de secreção tipo três e com os lipopolissacarídeos de superfície, assim como em *P. vulgaris* na comparação PHA-VIG. Já em *V. unguiculata* são os genes codificando oxiredutases que estão com maior *fold change*. É notável a repetição de genes entre as comparações das bibliotecas. Isso sugere que uma característica comum a essas plantas pode ser responsável por esses resultados. Outro fato que é notável é que a presença de genes envolvidos com o sistema de secreção tipo três e com lipopolissacarídeos não está relacionado com os diferentes tipos de nódulos, já que os genes estão sempre menos expressos em *V. unguiculata* quando comparada com as outras duas plantas, *P. vulgaris* e *T. vogelii*. As possíveis razões para esses resultados serão detalhados e discutidos a seguir. Na tabela 10 é mostrado um resumo dos resultados gerados da obtenção dos genes diferencialmente expressos, e nos apêndices 1, 2 e 3 se encontram todos os genes diferencialmente expressos entre as três comparações. A identificação e a localização dos genes em cada *replicon* é feita através do *locus tag* que são sistematicamente aplicadas a todos os genes em um genoma dentro do contexto de projetos de sequenciamento. Os genes de *S. fredii* NGR234 que se localizam no cromossomo são identificados no *locus tag* através da letra 'c': NGR_c0000. Os genes localizados no mega plasmídeo ou plasmídeo *b* são identificados no *locus tag* através da letra 'b': NGR_b0000, assim

como, os genes que se encontram no plasmídeo simbiótico ou plasmídeo *a* são identificados pela letra 'a': NGR_a0000.

TABELA 10: RESULTADOS PARCIAIS DAS LISTAS DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS.

Comparação entre as bibliotecas	Número de GDE total	Regulação dos genes	Genes com maiores diferenças nos níveis de expressão (<i>fold change</i>)
PHA - TEP	228	125 com maior <i>fold change</i> em PHA	Transportadores ABC
		103 com maior <i>fold change</i> em TEP	Operon <i>pqq, thu, paa</i> , biossíntese de tiamina
PHA - VIG	316	169 com maior <i>fold change</i> em PHA	LPS: <i>rmIBDA, wbgA</i> , TTSS, <i>nopP, nolU, nodU, nodS, syrM2, nodD2</i>
		147 com maior <i>fold change</i> em VIG	Operon <i>pqq</i> , transporte de alcanosulfonato - <i>ssu</i> e cobalto - <i>ctbAB</i>
TEP - VIG	270	167 com maior <i>fold change</i> em TEP	LPS: <i>rmIBDA, wbgA</i> , TTSS, <i>nopP, nolU, nodU, nodS, syrM2, nodD2</i>
		103 com maior <i>fold change</i> em VIG	Oxiredutase, biossíntese de glutamina

NOTA: Genes diferencialmente expressos (GDE) entre *P. vulgaris* e *T. vogelii*: PHA-TEP; GDE entre *P. vulgaris* e *V. unguiculata*: PHA-VIG; GDE entre *T. vogelii* e *V. unguiculata*: TEP-VIG. Lipopolisacarídeos: LPS; Sistema de secreção tipo três: TTSS.

Após obtenção das tabelas, os genes foram submetidos a uma análise no KAAS – KEGG, uma das ferramentas utilizadas para analisar e direcionar esses genes e suas relações com a nodulação em cada planta.

5.3. ANÁLISE DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NO KAAS – KEGG.

Tendo em mãos as três listas dos GDE, as sequências de aminoácidos correspondentes a esses genes foram obtidas e utilizadas como *input* no programa

KAAS (Banco de dados KEGG). A partir deste programa, foram identificadas quais as vias metabólicas ou processos celulares que esses genes diferenciais fazem parte, em cada comparação realizada.

As vias metabólicas que apresentaram um maior número de genes diferencialmente expressos são as vias envolvendo transportadores ABC, biossíntese de aminoácidos, glicólise, sistema de secreção bacteriano, biossíntese de ácidos graxos e proteínas ribossomais. A tabela 11 mostra o número de genes que foram direcionados para essas principais vias em cada comparação feita entre as plantas. Posteriormente uma análise dessas vias foi realizada descrevendo quais genes fazem parte de cada uma delas.

TABELA 11: NÚMERO DE GENES DIRECIONADOS PARA AS PRINCIPAIS CATEGORIAS NA COMPARAÇÃO FEITA ENTRE AS PLANTAS.

ID	Nome	PHA-TEP			PHA-VIG			TEP-VIG			Genes no genoma
		<i>pha+</i>	<i>tep+</i>	Total GDE	<i>pha+</i>	<i>vig+</i>	Total GDE	<i>tep+</i>	<i>vig+</i>	Total GDE	Total
rhi02010	Transportadores ABC	14	13	27	15	9	28	7	2	9	183
rhi01230	Biossíntese de amino ácidos	3	1	4	8	1	10	10	2	12	99
rhi03070	Sistema de secreção bacteriano	0	0	0	4	0	4	5	0	5	44
rhi03010	Ribossomos	0	0	0	27	0	27	29	1	30	52
rhi00010	Glicólise/Gluconeogênese	1	3	4	2	4	5	1	3	4	27
rhi01210	Metab. de ácido 2-Oxocarboxílico	2	0	2	3	1	4	4	1	5	21
rhi00920	Metabolismo de enxofre	0	8	8	0	5	5	0	0	0	24
rhi01200	Metabolismo de carbono	1	1	2	2	0	2	1	0	1	100
rhi00620	Metabolismo de piruvato	1	1	2	1	2	2	2	2	4	32
rhi00190	Fosforilação oxidativa	0	5	5	0	1	1	5	0	5	50
rhi01212	Metabolismo de ácido graxo	0	0	0	2	0	2	6	0	6	20
rhi00071	Degradação de ácido graxo	0	0	0	0	1	1	0	1	1	13
rhi00061	Biossíntese de ácido graxo	0	0	0	2	0	2	6	0	6	14

NOTA: PHA-TEP: Genes diferencialmente expressos (GDE) entre *P. vulgaris* e *T. vogelii*; PHA-VIG: GDE entre *P. vulgaris* e *V. unguiculata*; TEP-VIG: GDE entre *T. vogelii* e *V. unguiculata*. *pha+*: número de genes mais expressos em *P. vulgaris*; *tep+*: número de genes mais expressos em *T. vogelii*; *vig+*: número de genes mais expressos em *V. unguiculata*.

5.3.1. Sistemas de Transporte Ativo

5.3.1.1. Transporte primário – Transportadores ABC

Existem diferentes classes de transportadores em procariotos, e um dos parâmetros para essa diferenciação é o tipo de energia utilizada para realizar o transporte do soluto através da membrana citoplasmática. Transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) são classificados como transportadores primários, que utilizam a hidrólise de ATP como energia para o transporte. Estes possuem um receptor de soluto extracitoplasmático (RSE) envolvido na captação do substrato, e, até o momento, são os transportadores mais estudados quanto à especificidade do substrato, em várias bactérias (revisado por KELLY & THOMAS, 2001; MULLIGAN, FISCHER & THOMAS, 2011). Entre os GDE presentes nas três listas, os genes envolvidos na categoria de transportadores ABC foram os que se apresentaram em maior número. A análise do genoma revelou que 10,5% de todos os genes do *S. fredii* NGR234 codificam transportadores, especialmente de pequenas moléculas, sendo a maioria do tipo ABC (SCHMEISSER *et al.*, 2009). Esse grande número de genes codificando proteínas para o sistema de transportadores ABC em *Rhizobium* e outras α -Proteobacterias possibilita o acesso do rizóbio à nutrientes presentes em baixas concentrações e também na rizosfera da planta (BOSSAU *et al.*, 2004, RAMACHANDRAN *et al.*, 2011). Um resumo dos genes diferenciais que codificam transportadores ABC pode ser observado da tabela 12.

TABELA 12: GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS CODIFICANDO TRANSPORTADORES ABC E SEUS RESPECTIVOS *FOLD CHANGES*.

Substrato	Gene ID	Pha x Tep		Pha x Vig		Tep x Vig	
		FC	Reg	FC	Reg	FC	Reg
Sulfato	<i>cysPUWA</i>	4,4 - 2,1	+tep	3,6 - 1,7	+vig	1,0 - 1,2	—
Alcanosulfonato	<i>ssuABCD</i>	11,4 - 6,8	+tep	11,9 - 8,5	+vig	1,0 - 1,2	—
Trealose	<i>thuEFGKAB</i>	4,2 - 2,5	+tep	2,4 - 1,2	+vig	3,0 - 1,1	+tep
Glicerol 3-fosfato	NGR_c36780-NGR_c36800	5,6 - 4,7	+pha	3,0 - 3,7	+pha	1,4 - 1,5	—
Fosfanato	NGR_b13310-NGR_b13340	4,9 - 3,4	+pha	2,3 - 2,9	+pha	1,1 - 1,7	—
Complexo de ferro	NGR_b11200-NGR_b11230	2,4 - 1,5	+tep	3,0 - 1,1	+pha	4,8 - 2,6	+tep
Manganês	NGR_c31020-NGR_c31050	2,8 - 2,4	+pha	3,7 - 6,6	+pha	2,6 - 1,5	+tep
Cobalto	<i>cbtAB</i>	6,8 - 3,0	+tep	7,0 - 5,4	+vig	1,8 - 1,0	—

NOTA: *cysPUWA*: NGR_b11690-NGR_b11720; *ssuABCD*: NGR_c25620-NGR_c25650; *thuEFGKAB*: NGR_b23090-NGR_b23140; *cbtAB*: NGR_c21910-NGR_c21920; FC: valores de *fold change* máximos e mínimos de diferentes genes do *cluster*, dentro da biblioteca em que o gene foi mais expresso; Reg: planta na qual estava mais expresso.

Os transportadores de sulfato, codificados pelos genes *cysPUWA* (NGR_b11690-NGR_b11720) em PHA-TEP, e alcanosulfonato, *ssuBD* (NGR_c25620-NGR_c25650) em PHA-TEP e PHA-VIG, estão menos expressos em *P. vulgaris*. Na simbiose rizóbio-legume o enxofre tem função importante, como na biossíntese de proteínas e de cofatores, assim como a adição desse composto na estrutura padrão dos fatores Nod, que aumenta a resistência desses fatores à degradação e conseqüentemente leva a uma interação mais específica e efetiva (PERRET, STAEHELIN & BROUGHTON, 2000; TSUKADA *et al.*, 2009). As bactérias utilizam sulfato inorgânico ou cisteína como fonte primária de enxofre, e também utilizam sulfonato ou ésteres de sulfato sob condições limitantes de enxofre (KERTESZ, 2000). Recentemente Tsukada (2009) realizou uma análise transcricional comparativa com *Azorhizobium caulinodans* ORS 571 em condição de simbiose e através da homologia de sequência de proteínas com *E. coli*, encontrou os genes envolvidos no transporte de enxofre no rizóbio. Para obtenção de enxofre através da via primária, os genes *cysPTWA* de *E. coli*, codificam um sistema de transporte de sulfato e tiosulfato que captam essa molécula (AGUILAR-BARAJAS *et al.*, 2011; GUEDON & VERSTRAETE, 2006). O sistema de permeases sulfato-tiosulfato é composto por: (i) uma proteína que se liga ao sulfato (Sbp) ou ao tiosulfato (CysP); (ii) proteínas de membrana CysW e CysT/U; e (iii) uma proteína ligadora de ATP, CysA (AGUILAR-BARAJAS *et al.*, 2011).

Em ambientes que o enxofre é um fator limitante, o rizóbio pode expressar outros genes para captar essa molécula a partir de compostos organosulfonados, como, por exemplo, produtos ou compostos xenobióticos. Os genes expressos para esse fim são os *ssu*, que codificam uma monooxigenase alcanosulfonato (*ssuD*) envolvida na reação de conversão de alcanosulfonato em sulfito, e proteínas dos transportadores ABC para sulfonato alifático (*ssuABC*), que importam sulfonato do meio extracelular para o meio intracelular. Uma deleção de *ssuEADCB* em *E. coli* impossibilitou a utilização de alcanosulfonato por essa bactéria (Van Der PLOEG, 1999). Além disso, os níveis de expressão dos genes *ssuABCD* no trabalho de Tsukada (2009) foram menores em *A. caulinodans* ORS 571 em condição de vida livre (meio rico; TY) do que em condição de simbiose desse rizóbio com *Sesbania rostrata*, sugerindo que bacteroides adquirem ativamente compostos organosulfonados, além de sulfato inorgânico. Os genes envolvidos nesses sistemas também estão diferenciados no trabalho de Li *et al.* (2013), que comparou o transcriptoma de NGR234 em vida livre, nodulando *Leucaena leucocephala* e *V. unguiculata*. Estes autores observaram baixíssima expressão do operon *ssu* em vida livre (meio rico; TY) e menor expressão em *V. unguiculata* do que em *L. leucocephala*. Os dados do presente trabalho sugerem que *T. vogelii* e *V. unguiculata* estão captando enxofre mais ativamente do que *P. vulgaris*, pois os genes dos bacteroides, nessa planta, apresentaram cobertura menor que 3. Além de o enxofre ser requerido para diversos processos celulares, a fixação de nitrogênio requer enxofre para a síntese de cofatores essenciais para a nitrogenase. Portanto, é possível que a fixação de nitrogênio esteja acontecendo mais intensamente em *V. unguiculata* e *T. vogelii* do que em *P. vulgaris*, o que é compatível com a observação de que NGR234 não é eficiente em suprir *P. vulgaris* com nitrogênio, quando comparado com outras bactérias, ou ainda, com outras plantas (MICHIELS *et al.*, 1998; PUEPPKE & BROUGHTON, 1999).

Outros genes codificadores de transportadores ABC diferencialmente expressos incluem o operon *thuEFGKAB* (NGR_b23100-NGR_b23140) na comparação PHA-TEP, com maior expressão em *T. vogelii* e com alta cobertura em todo o operon. Esses genes estão envolvidos no transporte e utilização da trealose, um dissacarídeo que pode ser captado e utilizado como fonte de carbono e energia por *Sinorhizobium meliloti* (GLENN & DILWORTH, 1981). Os resultados do trabalho de Jensen, Peters e Bhuvaneshwari (2002), em que o operon *thuEFGK* foi

mutagenizado, mostraram que esses genes estão envolvidos com o transporte de trealose, sacarose e maltose em *S. meliloti*, mas que apesar de transportar esses três dissacarídeos, esse operon é induzido apenas por trealose. Além disso, essa mutação diminuiu a habilidade das bactérias em colonizar as raízes de alfafa, mas não afetou a nodulação e a fixação de nitrogênio nessa planta. Os genes *thuA* e *thuB* codificam proteínas que estão envolvidas na utilização da trealose, já que mutações nesses genes prejudicaram o crescimento de *S. meliloti* no meio contendo esse dissacarídeo como única fonte de carbono (JENSEN *et al.*, 2005). No trabalho de Li *et al.* (2013) o operon *thu* se encontrava menos expresso na condição de simbiose entre *L. leucocephala* e *V. unguiculata*, quando comparado com vida livre, em NGR234.

A expressão do gene *thuA* foi analisada neste trabalho por RT-qPCR com o intuito de confirmar o resultado obtido nos dados de RNA-Seq. Os resultados mostram que em *T. vogelii* este é expresso, em média, 5,07 vezes mais (desvio padrão de 1,06) que em *P. vulgaris*; enquanto os dados de RNA-Seq mostraram que esta é 3,65 vezes maior. Dados obtidos em nosso grupo de pesquisa mostram que a transcrição desse operon depende do regulador SyrM2, que controla direta ou indiretamente a expressão de genes importantes para a nodulação (KOBAYASHI *et al.*, 2004; THEUNIS *et al.*, 2004). Entretanto, o efeito fenotípico da remoção de *syrM2* é apenas parcialmente conhecido em NGR234 (SENA, 2013) e desconhecido para o operon *thu*. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que mutação no operon *thu* deve afetar a nodulação de algumas, e não de todas as plantas hospedeiras.

Assim como no trabalho de Li *et al.* (2013), neste trabalho os genes que codificam transportadores de fosfato (NGR_b13310-NGR_b13340), e de glicerol 3-fosfato (NGR_c36780-NGR_c36810) estão diferenciais, tanto em PHA-TEP quanto em PHA-VIG, sendo mais expressos em *P. vulgaris*. O fósforo, depois do nitrogênio, é um fator limitante para o crescimento eficiente de plantas. No trabalho de Gaude (2004) foi mostrado que as membranas dos simbiossomas (de origem vegetal) são ricas em galactolipídios, um lipídio de membrana que não possui fósforo, diferente dos fosfolipídios de membrana. Os autores observaram que mesmo em condições com fósforo abundante, as membranas dos simbiossomas mantêm estes lipídios, provavelmente como consequência do alto consumo de fósforo pelos bacteroides, criando uma deficiência local de fósforo. Além disso, em condições de crescimento

onde o fósforo é um fator limitante, algumas bactérias também substituem seus fosfolipídios de membranas por outros que não possuem fósforo em sua estrutura. Em *S. meliloti* esses lipídios sem fósforos são sulfoquinovosil-diacilglicerol (SL), lipídios contendo ornitina (OL) e diacilgliceril-N,N,N- trimetilhomoserina (DGTS) (LÓPEZ-LARA *et al.*, 2005; GEIGER, 1999). Esse último, é sintetizado em NGR234 pelos genes NGR_c21260 e NGR_c21270, os quais se mostraram diferenciais neste trabalho, com maior expressão quando inoculado em *P. vulgaris*, sugerindo que nesses nódulos existe um ambiente com fósforo limitante para os bacteróides. Apesar disso, foi mostrado em *S. meliloti* que mutação nos genes homólogos a NGR_c21260 e NGR_c21270 e nos genes envolvidos com a síntese de SL e OL não interferem no sucesso e nem na eficiência da nodulação e fixação de nitrogênio (LÓPEZ-LARA *et al.*, 2005).

Na tabela dos GDE entre PHA-TEP e PHA-VIG os genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de cobalto (*cbtAB*) apareceram com alto nível de expressão, sendo mais expressos na nodulação de *T. vogelii* e *V. unguiculata*. O cobalto é um elemento traço requerido para uma variedade de processos biológicos, e em rizóbios ele é principalmente encontrado na vitamina B12, também conhecida como cobalamina (CHENG *et al.*, 2011). Em NGR234 os genes que codificam transportadores de cobalto são denominados *cbtAB*, e foram preditos em várias α -proteobactérias, possivelmente codificando transportadores requeridos para a síntese de cobalamina. Em geral, α -proteobactérias possuem pelo menos quatro diferentes tipos de transportadores de cobalto (CbiMNQO, HoxN, CbtAB, e CbtC). O gene *cbtA* é, geralmente, localizado próximo ou fundido com um pequeno gene denominado *cbtB*, o qual codifica um segmento transmembrana seguido de um motivo rico em histidina, provavelmente envolvido na ligação do metal (RODIONOV *et al.*, 2003). Em *S. meliloti* os genes descritos como transportadores de cobalto são os *cbtJKL*, e mutações nesses genes não afetaram a fixação de nitrogênio em alfafa, indicando que provavelmente outros genes estão transportando esse microelemento, já que a síntese de cobalamina é requerida para a fixação de nitrogênio nos processos simbióticos (CHENG *et al.*, 2011; TAGA & WALKER, 2010). Para confirmar a necessidade de cobalto para a fixação simbiótica de N₂, foi necessário que Delwiche (1960) removesse todo o cobalto dos componentes da solução de nutrientes de plantas, bem como do meio de cultura das bactérias, até o momento da inoculação, para que só assim fosse concluído que o cobalto (Co²⁺) é

requerido para uma eficiente fixação de nitrogênio na simbiose de *S. meliloti* com alfafa. A partir destes resultados foi sugerido que a resposta da simbiose frente a transportadores de cobalto varia dependendo da planta estudada e das condições de crescimento da mesma. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que em *T. vogelii* e *V. unguiculata* a disponibilização de cobalto para NGR234 era baixa, induzindo a maior expressão desses transportadores para otimizar a captação do cobalto disponível.

Entre os transportadores ABC de outros cátions metálicos, genes envolvidos com o transporte de ferro (NGR_b11200-NGR_b11230) se mostraram diferenciais entre as bibliotecas de TEP-VIG, com maior expressão nos bacteroides de *T. vogelii*. Genes envolvidos no transporte de ferro são importantes para a simbiose, pois muitas proteínas essenciais para a formação do nódulo e fixação de nitrogênio incorporam ferro, como, por exemplo, a nitrogenase e componentes dos citocromos da cadeia transportadora de elétrons da bactéria, essencial para fornecer energia para a fixação de nitrogênio (GUERINOT, 1991; PETERS & SZILAGYI, 2006). Deficiências na captação de ferro podem afetar o início e o desenvolvimento dos nódulos (O'HARA, 2001), e a fixação de nitrogênio, pois em nódulos de *P. vulgaris* a fixação é positivamente correlacionada com o aumento da concentração de ferro no nódulo (SLATNI *et al.*, 2008).

Outros genes diferenciais envolvidos com transporte de íons são os relacionados com manganês, onde um operon inteiro, NGR_c31020-NGR_c31050 (*sitABCD*) encontra-se diferencial em PHA-TEP e PHA-VIG, sendo mais expresso em *P. vulgaris*. Durante o desenvolvimento do nódulo, nos cordões de infecção, as bactérias sofrem um estresse oxidativo gerado pela planta, e para a existência de uma simbiose efetiva é necessário que o rizóbio se defenda das espécies reativas de oxigênio (SANTOS *et al.*, 2001; JAMET *et al.*, 2003). Manganês é um metal importante para a proteção do estresse oxidativo, pois íons manganês podem ajudar na defesa contra as espécies reativas de oxigênio, embora as reações bioquímicas exatas dessa defesa não tenham sido determinadas (HORSBURGH *et al.*, 2002). Em *S. meliloti*, *sitA* é o primeiro gene de um operon *sitABCD*, o qual codifica um transportador de manganês (PLATERO *et al.*, 2003). A simbiose de *Medicago sativa* com *S. meliloti* mutante no gene *sitA* e um mutante polar *sitBCD* resultou na produção de nódulos pequenos e brancos, indicando uma falha na simbiose e a importância da captação de manganês para esse processo. Apesar disso o trabalho

deixou claro que discrepâncias nos resultados podem ser encontradas, dependendo da estirpe da bactéria e da planta utilizada (DAVIES & WALKER, 2007). Isso foi observado nos trabalhos de Platero (2003) e Chao (2004), onde mutações nesses genes causaram diferentes fenótipos simbióticos, apesar de que, todos sugeriram que a acumulação de manganês é importante para a resistência de estresse oxidativo na simbiose.

5.3.1.2. Transportadores secundários

Outra classe de transportadores presentes em bactérias são os transportadores secundários, que utilizam a força de um gradiente eletroquímico como energia para transportar o soluto, não necessitam de um receptor de soluto extracitoplasmático (RSE) e são a maior classe de transportadores em procariotos (revisado por KELLY & THOMAS, 2001). Um gene presente na tabela de PHA-VIG, denominado *dctA1*, apareceu com alta cobertura em *V. unguiculata* e codifica um transportador de C4-dicarboxilato. Ácidos dicarboxílicos incluem malato, succinato, fumarato, aspartato e oxaloacetato. O transporte desses compostos foi amplamente estudado em muitos rizóbios, e sabe-se que ele é a maior e a principal fonte de carbono transportado na simbiose, estimulando a fixação de N₂ (YURGEL & KAHN, 2004). Em *Bacillus subtilis* o transportador DctA é uma proteína integral de membrana, classificada como um transportador simporte que acopla o transporte do substrato ao co-transporte de prótons através da membrana (GROENEVELD *et al.*, 2010). Em muitos rizóbios existe apenas um sistema de transporte de dicarboxilato, mas existem exceções, como é o caso de NGR234, que apresenta dois sistemas, um no plasmídeo simbiótico (*dctA1*) e outro anotado no mega plasmídeo (pNGR234b), mas anteriormente descrito como estando no cromossomo. Ambos permitem o crescimento de NGR234 em substratos dicarboxilatos, mas o sistema presente no plasmídeo simbiótico é essencial para a fixação de nitrogênio em simbiose (Van SLOOTEN *et al.*, 1992). A linhagem com mutação no gene *dctA1* do plasmídeo simbiótico de NGR234 formou nódulos que não fixaram nitrogênio em plantas, independente do tipo de nódulos, determinados ou indeterminados, e,

apresentaram nódulos senescentes mais cedo (Van SLOOTEN *et al.*, 1992; YURGEL & KAHN, 2004).

Além dos transportadores secundários clássicos, em 1993 um novo modelo de transportadores foi descrito em bactérias por Forward, Behrendt & Kelly (1993), o qual se caracteriza como um sistema híbrido entre o sistema dos transportadores secundários e os ABC. Ou seja, ele é classificado como secundário, pois a energia utilizada é um gradiente de íon eletroquímico, e não a hidrólise de ATP, mas são dependentes de um RSE. Esses transportadores foram denominados como TRAP (*Tripartite ATP-independent Periplasmic*) são formados por três componentes proteicos: um RSE e duas proteínas integrais de membrana que apresentam tamanho desigual. Os substratos que o TRAP transporta incluem α -ceto ácidos, ácido acetilneuramínico, 4-clorobenzoato, ectoína, piroglutamato, gluconato, taurina, glutamato, glutamina, lactato e outros compostos que são ainda potenciais substratos, como outros aminoácidos e substratos aromáticos (revisado por MULLIGAN, FISCHER & THOMAS, 2011).

Alguns genes das listas de GDE codificam proteínas componentes de transportadores TRAP. Nas listas entre PHA-TEP e TEP-VIG os genes NGR_b20620-NGR_b20640 (FC: 3-2), presentes no megaplasmídeo, apareceram com maior expressão em *T. vogelii* em ambos os casos. Segundo dados do NCBI, NGR_b20620 codifica a proteína de ligação periplasmática, NGR_b20630, a proteína de transporte menor e, NGR_b20640, a proteína de transporte maior. Quanto ao substrato, não é possível determinar qual é, pois não existem trabalhos sobre esse operon e, também, porque os genes próximos a eles não apresentam nenhum indício de um possível candidato. Dois outros conjuntos de genes similares, que codificam um sistema TRAP foram analisados. Um está presente no cromossomo e outro, no plasmídeo simbiótico. O gene *dctP*, que codifica o RSE, é parte do operon presente no cromossomo e está diferencial. Os outros genes desse operon, *dctMQ*, que codificam proteínas de membrana, estão com baixa cobertura e não foram analisados. A cópia presente no plasmídeo *a*, a qual potencialmente estaria envolvida com o processo de nodulação por se encontrar no plasmídeo simbiótico, não apresentou expressão diferencial. Portanto o transportador TRAP que está diferencial, localizado no plasmídeo *b*, é responsável pelo transporte de algum íon ou molécula em *T. vogelii* que é importante para a simbiose dessa planta e não para as outras com as quais a comparação foi feita.

5.3.2. Metabolismo de Energia

Algumas vias apontadas pelo KAAS como possuindo GDE neste trabalho estão relacionadas com metabolismo de energia, entre eles o operon que codifica pirroloquinolina quinona. Esse operon, denominado de operon *pqq* (NGR_b03260-NGR_b03300), é composto por 5 genes e aparece nos dados de RNA-Seq como um dos mais expressos, não só neste trabalho, mas em outros envolvendo RNA-Seq (Li *et al.*, 2013; KRYSCIAK *et al.*, 2014). Apesar disso, sabe-se pouco sobre a função dele durante a infecção das raízes e formação dos nódulos, apenas que ele é essencial para a nodulação eficiente em *S. meliloti* (BERNARDELLI *et al.*, 2008; BERNARDELLI *et al.*, 2001). Esse operon apresentou expressão diferencial em PHA-TEP e em PHA-VIG, com valores de *fold change* entre 6 e 35, sendo *T. vogelii* a planta que apresentou maiores níveis de expressão (maior RPKM entre as bibliotecas) e *P. vulgaris*, a que teve esse operon menos expresso. O gene vizinho e divergente a esse operon, e que também apresenta grande nível de expressão, codifica para a álcool desidrogenase (NGR_b03250 – FC: 17-40). A pirroloquinolina quinona (PQQ) além de atuar como um nutriente e vitamina para o crescimento e proteção de células que passam algum tipo de estresse, é requerida como um cofator para desidrogenases (KRYSCIAK *et al.*, 2014; MISRA *et al.*, 2013). Uma enzima muito estudada, dependente de PQQ como cofator é a glicose desidrogenase (GDH), que atua em uma via auxiliar de geração de energia, através da oxidação direta da glicose. Essa enzima se encontra no periplasma das células e converte a glicose captada do meio extracelular em ácido glucônico, que por sua vez, é oxidado pela enzima glucanato desidrogenase levando a síntese do ácido 2-cetogluconico. Esse último composto formado pode ser utilizado pela via de cetogluconato para geração de energia ou para solubilizar fosfato mineral (produção de ácidos orgânicos é considerada o principal mecanismo de solubilização de fosfato na natureza) (revisado por MISRA *et al.*, 2012; BOIARDI *et al.*, 1996). Por outro lado, em *S. fredii* NGR234 o gene codificador da álcool desidrogenase se encontra ao lado do operon *pqq*, transcrito de forma divergente ao *pqqA*. É possível que o operon *pqq* presente nesse rizóbio sintetize o cofator dessa enzima.

Com a intenção de confirmar o resultado obtido nos dados de RNA-Seq, o gene *pqqD* (NGR_b03290) foi analisado por RT-qPCR e apresentou valor médio de *fold change* de $10,8 \pm 3,39$, enquanto o RNA-Seq mostra valores entre 34,9 e 14,3.

Genes que codificam produtos envolvidos na via de fosforilação oxidativa estão diferencialmente expressos na comparação TEP-VIG, mais expressos em *T. vogelii*. Os genes *atpH*, *atpA*, *atpG*, *atpD*, *atpC* (NGR_c31100-NGR_c31140, com *fold change* 2,3 – 1,6) codificam subunidades da ATP sintase, que produz ATP a partir do ADP na presença de um gradiente de prótons através da membrana.

Outro grupo de genes que estão diferencialmente expressos na comparação TEP-VIG compreende os envolvidos com biossíntese e metabolismo de ácidos graxos, mais expressos em *T. vogelii*. Essas vias desempenham um papel importante no metabolismo do bacteróide, pois fornecem uma variedade de precursores, tais como componentes da membrana do rizóbio, lipopolisacarídeos e coenzimas requeridas na transdução de sinal (RESENDIS-ANTONIO *et al.*, 2011). Os genes *fabH2* (NGR_c09720), *accB* (NGR_c11070), *fabI3* (NGR_c05170), *fabZ* (NGR_c13430), NGR_c08930 e NGR_c08900, estão envolvidos na biossíntese de ácidos graxos. No trabalho de Peng (2014) que realizou uma análise de RNA-Seq e *microarrays* para analisar as diferenças transcricionais de *Mesorhizobium huakuii* 7653R em condição de vida livre e em simbiose com *Astragalus sinicus*, foi relatada uma variedade de genes *fab* sendo expressos, mas apenas em condição de vida livre, pois em simbiose esses genes eram poucos expressos. O mesmo resultado foi observado no trabalho de Sarma & Emerich (2006), onde os genes de *Bradyrhizobium japonicum* envolvidos na síntese e no metabolismo de ácidos graxos foram fortemente reprimidos na simbiose. Esses resultados contrastaram com os encontrados por Resendis-Antonio (2011), que mostrou *Rhizobium etli* expressando uma variedade de genes *fab* em simbiose com *P. vulgaris*, em maiores níveis que em vida livre. Os resultados obtidos no presente trabalho, em TEP-VIG, indicam *T. vogelii* como a planta com maior expressão de genes para a síntese de ácidos graxos, e isso possivelmente se deve ao tipo de nódulo que essa planta apresenta (indeterminado), que têm como característica divisões celulares constantes, e com isso necessita de mais lipídios para sintetizar membranas, por exemplo. Em nódulos determinados isso não ocorre, pois a partir do momento que esses se encontram maduros, a divisão dos rizóbios cessa. Em concordância com os resultados acima,

na comparação entre PHA-VIG (nódulos determinados), apenas dois dos genes descritos estão diferenciais (*fabI3* e NGR_c08930).

Em contrapartida, o esperado para a comparação de PHA-TEP, que produz nódulos determinados e indeterminados, respectivamente, não aconteceu (FC: 1,03 – 1,24). Ou seja, apesar da diferença de tipo de nódulos não foi observada maior expressão dos genes de síntese de ácidos graxos. Portanto, os bacteróides em *P. vulgaris*, mesmo em nódulos determinados, também devem estar com um alto nível de expressão dos genes envolvidos nessas vias. Como já citado, uma análise de GDE em *R. etli* em simbiose com *P. vulgaris*, revelou genes diferenciais envolvidos nas vias de ácido graxo (RESENDIS-ANTONIO *et al.*, 2011). Uma possível explicação para esse resultado pode ser a forma como o carbono, ou o excesso dele, disponibilizado pela planta, é armazenado no bacteróide, ou ainda, para qual finalidade os ácidos graxos são sintetizados. O excesso de carbono pode ser armazenado na forma de polihidroxibutirato (PHB), sendo a forma mais comum, em forma de glicogênio, ou na forma de lipídios, a menos comum em nódulos. Na situação de PHA-TEP, bacteróides de *P. vulgaris* podem estar armazenando carbono na forma de lipídios, e por isso essas vias estão ativas.

Na comparação entre PHA-TEP os genes relacionados com a biossíntese de tiamina, denominados como *thiCOGE* (NGR_b02900-NGR_b02930), apareceram com altos níveis de expressão em bacteróides extraídos de *T. vogelii* (*fold change* entre 26 e 13). A tiamina ou vitamina B1, como também é conhecida, é um cofator essencial requerido no metabolismo de carboidratos e aminoácidos de cadeia ramificada (BEGLEY *et al.*, 1999). Na rizosfera a disponibilidade dessa vitamina é limitante para o crescimento de *S. meliloti* (STREIT, JOSEPH & PHILLIPS, 1996) e está relacionada com a formação de nódulos efetivos, já que a presença dessa vitamina na rizosfera aumentou a fixação de nitrogênio e o crescimento de alguns legumes nodulados por *Rhizobium* (DERYLO & SKORUPSKA, 1993; RODELAS *et al.*, 1996; SCHWINGHAMER, 1970). O operon *thiCOGE* foi descrito em rizóbios por Miranda-Rios (1997) em *R. etli*. O mutante utilizado, que expressava constitutivamente o operon *thi*, também teve um aumento de expressão nos genes que codificam uma oxidase terminal *cbb₃* (codificada pelos genes *fixNOPQ*) que é importante para a manutenção da respiração aeróbica durante a fixação de nitrogênio, que ocorre em condição microaerófila.

Genes do catabolismo de fenilacetato (*paaABIJKN*) apresentaram-se como diferenciais na comparação PHA-TEP, com *fold change* entre 10 e 3, mais expressos em *T. vogelii*. Essa via foi descrita a nível molecular em *E. coli* e está relacionada com uma rota de catabolismo de compostos aromáticos (FERRÁNDEZ, 1998). Ácido fenilacético é um composto aromático considerado como fonte de energia e de carbono, comum para uma ampla variedade de microrganismos. Fenilacetato é encontrado em uma variedade de ambientes, pois ele é uma auxina produzida pelas plantas, e um intermediário do catabolismo dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, alguns ácidos graxos, entre outros (MARTÍNEZ-BLANCO *et al.*, 1990; MINÁMBRES *et al.*, 1996). Em rizóbios, estudos realizados com esses genes mostraram, através de uma análise transcricional, que os genes de catabolismo de ácido fenilacético de *S. meliloti* tiveram sua expressão aumentada no nódulo, em simbiose com *M. truncatula* (BARNETT *et al.*, 2004). Os autores propõem que o aumento na expressão dessa via pode ser consequência da degradação de flavonoides usados como fonte de energia, estando de acordo com os resultados obtidos por Rao & Cooper (1994), que mostraram que rizóbios degradam flavonóides através de uma via que tem o ácido fenilacético como intermediário.

Além desses genes envolvidos com o metabolismo de energia, outros genes que apareceram como diferenciais codificam proteínas envolvidas com glicólise, metabolismo de carbono, enxofre, entre outros, mas foram encontrados isolados, fora de uma via ou do seu operon, não sendo possível relacioná-los com algum passo do processo de nodulação.

5.3.3. Biossíntese de Aminoácidos

Vários genes das listas de GDE foram indicados como parte de vias de biossíntese e metabolismo de aminoácidos, mas poucos foram classificados como parte de um mesmo operon ou da via de um aminoácido específico. Os bacteroides fixam nitrogênio atmosférico, mas disponibilizam esse composto para a planta na forma orgânica. Amônio é o principal produto exportado da fixação de nitrogênio de bacteróides, embora ele também possa secretar aminoácidos e ureídeos (LI *et al.*,

2002; ALLAWAY *et al.*, 2000; UDVARDI & POOLE, 2013). Ureídeos são exportados por leguminosas de origem tropical, tais como a *Glycine max*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata*. Os três ureídeos principais são alantoína, ácido alantóico e citrulina. A via de biossíntese de arginina apresentou a maioria dos genes expressos de forma diferencial até a etapa de produção de ornitina e citrulina, com maior expressão em *P. vulgaris*, na comparação entre PHA-VIG (FIGURA 6). É provável que o N₂ fixado em *P. vulgaris* esteja sendo exportado do nódulo na forma de ureídeo – citrulina. Sabe-se também que a ornitina, durante a simbiose, pode ser utilizada como única fonte de carbono e nitrogênio, ou como suprimento adicional de energia por *R. meliloti* (JIMÉNEZ-ZURDO *et al.*, 1995).

Um conjunto de genes foi mais expresso nos bacteróides de *V. unguiculata*, quando comparado entre TEP-VIG, e codifica genes do metabolismo de glutamato, *glxBCD* e *glnT*. Esses mesmos genes também se encontraram mais expressos nos bacteróides de *V. unguiculata*, quando comparado com bacteróides de *L. leucocephala*, na análise do transcriptoma de NGR234 (LI *et al.*, 2013). Esses genes sintetizam a proteína GlxB, glutamina amidotransferase, as subunidades do glutamato sintase GlxCD, e a glutamina sintetase GlnT. As enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase são responsáveis pela assimilação do amônio, a partir do N₂ fixado.

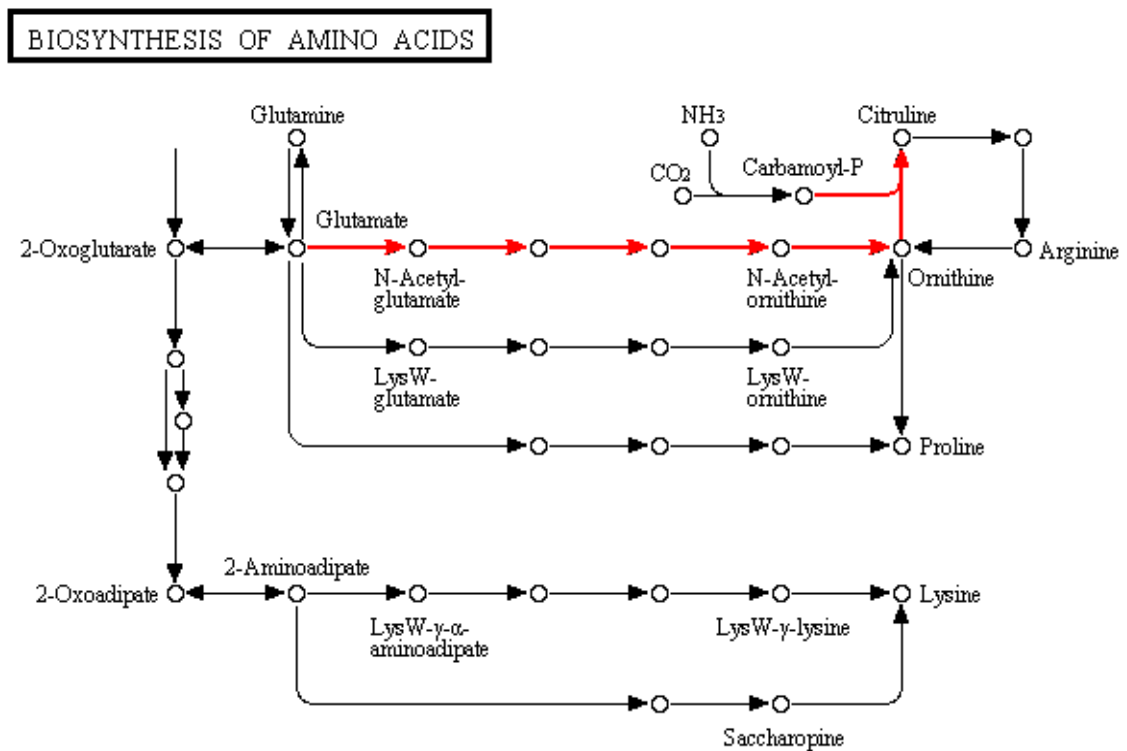


FIGURA 6. VIA DE BIOSÍNTESE DE ORNITINA E CITRULINA. FONTE: Adaptado de KAAS-KEGG. NOTA: As flechas em vermelho representam os genes diferencialmente expressos que fazem parte da via de biossíntese de aminoácidos. Esses genes estão mais expressos em *P. vulgaris* do que em *V. Unguiculata*.

Outros genes presentes em TEP-VIG apareceram diferenças, principalmente nas etapas finais da síntese do aminoácido. Os genes que codificam a formação de lisina, tirosina, metionina, fenilalanina e histidina estão sendo expressos, indicando de que a fixação de nitrogênio está mais ativa, e que a amônia está sendo convertida em compostos nitrogenados.

5.3.4. Ribossomos

A via de biossíntese de proteínas ribossomais apresentou genes diferenciais entre a comparação PHA-VIG e TEP-VIG, com menor expressão em *V. unguiculata* em ambas as tabelas. Resultados semelhantes foram obtidos com a via de biossíntese de aminoácidos. A relação entre a maior expressão de proteínas ribossomais e a maior demanda de aminoácidos é direta. O contrário não é verdadeiro, pois a maior expressão de genes envolvidos com a síntese de

aminoácidos pode estar relacionada com a quantidade de nitrogênio fixado pelos bacteroides, e não só com a síntese de proteínas. Os genes diferencialmente expressos para essa via, nas duas comparações, compreendem 26 genes localizados no *cluster* entre NGR_c11780 e NGR_c12080, que contém além de genes codificadores de proteínas ribossomais, os genes *rpoB* e *rpoC*, que codificam subunidades da RNA polimerase (não diferencialmente expressos). Os dados de RNA-Seq para os genes *rpsL* (NGR_c11860) e *rpsG* (NGR_c11870) foram confirmados através da RT-qPCR, e os valores de *fold change* são apresentados na tabela 13. A alta expressão de proteínas ribossomais deve ser reflexo da necessidade de síntese de grande quantidade de novas proteínas, potencialmente para renovação celular ou manutenção de processos que dispendem grande quantidade destas.

TABELA 13: VALORES DE *FOLD CHANGE* DE *rpsL* e *rpsG* ATRAVÉS DE RT-qPCR.

	Nome do gene	<i>Fold Change</i> RNA-Seq	<i>Fold Change</i> RT-qPCR
PHA-VIG (Pha+)	<i>rpsL</i>	3,61	3,24 ± 1,25
	<i>rpsG</i>	3,243	3,7 ± 1,56
TEP-VIG (Tep+)	<i>rpsL</i>	3,93	3,53 ± 1,15

NOTA: Pha+ e Tep+: Expressão dos genes maior em *P. vulgaris* e *T. vogelii*, respectivamente; FC DE_Seq: *fold change* observado nos dados de RNA-Seq; FC RT-qPCR: *fold change* observado na RT-qPCR.

5.3.5. Sistema de Secreção Tipo Três (TTSS)

Como já citado nesse trabalho, um dos motivos para a escolha e comparação entre essas plantas é a maneira como cada uma responde ao TTSS. As plantas *P. vulgaris* e *T. vogelii* respondem ao TTSS de maneira oposta (uma negativa e a outra positiva), enquanto *V. unguiculata* não responde a presença/ausência desse sistema (VIPREY *et al.*, 1998; MARIE *et al.*, 2001). A figura 7 mostra um esquema do *cluster* principal de genes envolvidos com o TTSS em NGR234, que possui outros genes do TTSS em outras posições do plasmídeo *a*. Na figura também são mostrados os valores de RPKM dos genes expressos em

bacteroides de cada planta. Os *clusters* de genes *tts* de rizóbios podem ser divididos em três regiões de acordo com a estrutura dos genes, sendo que a região I contém os genes que são altamente conservados em conteúdo genético e organização, em todas as espécies de rizóbios que contêm o TTSS funcional. As regiões II e III contêm maior variabilidade no conteúdo e organização dos genes e são transcritos de forma divergente (TAMPAKAKI, 2014). Um grande número de genes *tts* se mostraram diferenciais nas comparações entre *V. unguiculata* e *T. vogelii* ou *P. vulgaris*, sendo sempre pouco expressos em *V. unguiculata*. Na região I todos os genes estão diferenciais, com *fold change* entre 8 e 3 (NGR_a00620-NGR_a00690), com exceção dos quatro últimos genes, *rhcR*, *rhcS*, *rhcT*, *rhcU*, que foram pouco expressos e não estavam diferenciais. Na região III apenas o gene *nopP* (FC: 22-19) apresentou-se diferencial, e na região II só não estão diferenciais os genes *rhcC2* e *ttsI*, sendo que os demais apresentaram *fold change* entre 4 e 16. No trabalho de Li *et al.* (2013) que também analisou os genes diferencialmente expressos do TTSS, mas entre *L. leucocephala* e *V. unguiculata*, o resultado foi semelhante, com os mesmo genes diferenciais e não-diferenciais, com exceção dos genes *rhcC2* e *ttsI*, que também estavam diferencialmente expressos. Esses resultados são muito importantes e podem explicar porque *V. unguiculata* não responde a mutantes em genes do TTSS. Novos experimentos terão que ser realizados para determinar quais os fatores que impedem sua expressão uma vez que estes genes fazem parte de uma cascata geral induzida por flavonóides.

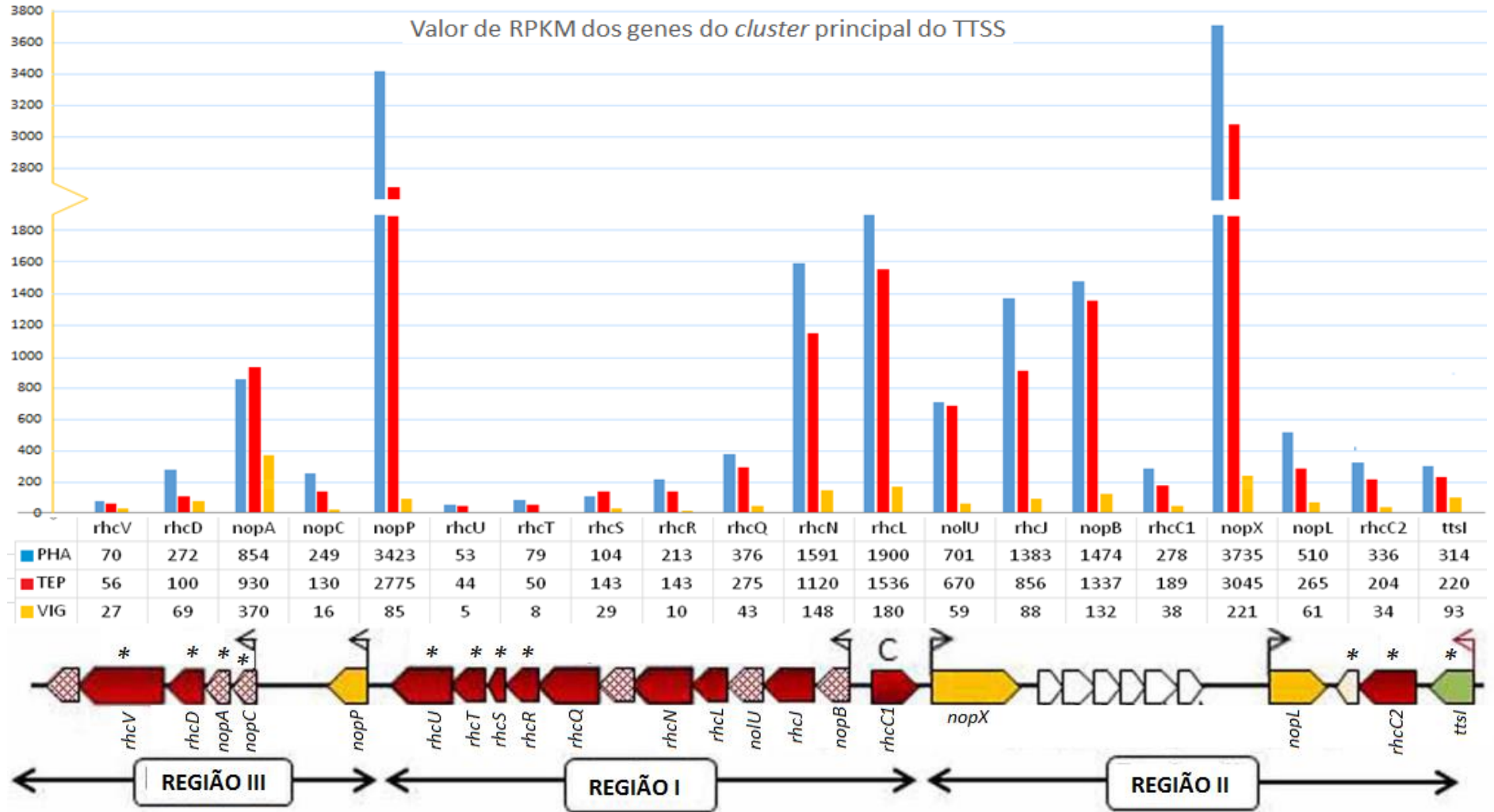


FIGURA 7. ESQUEMA DO CLUSTER PRINCIPAL DE GENES ENVOLVIDOS COM O SISTEMA DE SECREÇÃO TIPO TRÊS EM *S. fredii* NGR234 E SEUS VALORES DE EXPRESSÃO (RPKM). FONTE: Adaptado de Tampakaki, 2014. NOTA: As caixas em vermelho representam os genes que codificam componentes estruturais do TTSS; em rosa, os genes que codificam proteínas não conservadas no TTSS, em amarelo os genes que codificam proteínas efetoras e que são conservadas em outros rizóbios; em verde o regulador transcricional do TTSS; (*) representam os genes que não estão na lista de genes diferencialmente expressos, tanto em PHA-VIG quanto TEP-VIG; seta acima dos blocos representa os *tts*-box (preto) e *nod*-box (rosa).

Outros dois genes que se encontram diferenciais e que não foram classificados pelo KAAS, mas são reguladores transcricionais importantes no processo de simbiose, foram *nodD2* e *syrM2*, e a regulação precisa desses genes garante uma nodulação eficiente. Em pNGR234a foram identificados 24 reguladores transcricionais através de análises computacionais (FREIBERG *et al.*, 1997), e entre eles destacam-se as proteínas NodD que regulam a expressão de genes que apresentam sequencias conservadas, denominadas *nod-boxes*. NodD1 é considerado um ativador chave no processo de nodulação em NGR234. Depois da indução por flavonóides, NodD1 ativa a transcrição de alguns *nod-boxes*, entre eles NB19, que controla a expressão de *SyrM2*. A ativação desse *nod-box* não é imediata, ocorrendo provavelmente quando existe um contato maior entre a bactéria e seu hospedeiro. *SyrM2* é o ativador do gene que codificará a proteína NodD2, que por sua vez irá regular a expressão de outros *nod-boxes* (NB6, NB15, NB16, NB17) (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Uma mutação em *nodD2* resultou em linhagem com propriedades simbióticas alteradas em muitos hospedeiros, entre elas na síntese de lipopolissacarídeos (LPSs) ricos em ramnose (discutido a seguir) (FELLAY *et al.*, 1998; BROUGHTON *et al.*, 2006). Além disso, NodD2 também pode atuar na repressão de NodD1 através de NB3 (FIGURA 8).

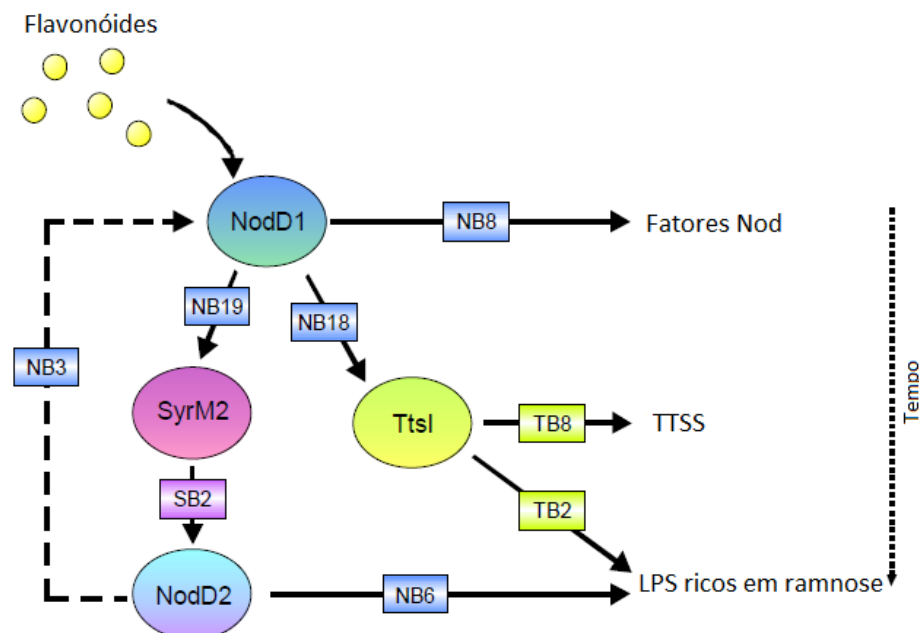


FIGURA 8. CASCATA REGULATÓRIA EM NGR234 COM FOCO NA EXPRESSÃO DE *SyrM2* e *NodD2*. FONTE: Adaptado de Kobayashi *et al.*, 2004. NOTA: Flavonóides liberados pelas plantas interagem com NodD1 que desencadeia uma cascata regulatória. Rapidamente, NodD1 ativa a transcrição de genes responsáveis pela síntese de fatores Nod. NodD1 também ativa a expressão de *TtsI* e *SyrM2* via *nod-boxes* específicos. *SyrM2* ativa a transcrição de *nodD2* que pode se ligar ao NB6 e induzir a transcrição de LPS ricos em ramnose ou reprimir a expressão de *nodD1*.

Os genes *syrM2*, *nodD2* e *nopB* foram analisados por RT-qPCR com o intuito de confirmar os resultados obtidos nos dados de RNA-Seq, que mostraram esses genes diferenciais em PHA-VIG e TEP-VIG. O valor de *fold change* obtido nos dados de RNA-Seq e o valor obtido através de RT-qPCR estão apresentados na tabela 14, mostrando a confirmação do perfil de expressão dos três genes em PHA-VIG e de apenas *syrM2* em TEP-VIG. O fato da maior expressão dos genes *nopB* e *nodD2* nos bacteroides de *T. vogelii* não ter sido confirmada pode ser devido à alguns erros experimentais e, também, por se tratar de uma amostra biológica diferente daquela que gerou os dados do RNA-Seq, já que novas sementes foram plantadas para extração de RNA de nódulos e, posterior geração do cDNA para o experimento de RT-qPCR.

TABELA 14: VALORES DE FOLD CHANGE DE *syrM2*, *nodD2* e *nopB* ATRAVÉS DE RT-qPCR.

	Gene	Fold Change RNA-Seq	Fold Change RT-qPCR
PHA-VIG (Pha+)	<i>nopB</i>	6,2	3,4 ± 1,03
	<i>syrM2</i>	5,83	4,46 ± 1,65
	<i>nodD2</i>	4,3	2,9 ± 0,83
TEP-VIG (Tep+)	<i>nopB</i>	6,25	1,78 ± 0,67
	<i>syrM2</i>	5,17	3,57 ± 1,34
	<i>nodD2</i>	2,57	1,53 ± 0,49

NOTA: Pha+ e Tep+: Maior expressão dos genes em *P. vulgaris* e *T. vogelii*, respectivamente; FC DE_Seq: *fold change* observado nos dados de RNA-Seq; FC RT-qPCR: *fold change* observado na RT-qPCR; Os genes destacados em cinza representam os que não foram validados.

A observação de que bacteroides em simbiose com *V. unguiculata* expressam pouco os genes dependentes de TtsI é altamente relevante, e explica porque esta planta não responde à presença/ausência de TTSS. Entretanto, como *ttsI* responde diretamente a NodD1, que é induzido por flavonóides, e os genes de nodulação são normalmente expressos nesta planta, a razão para tal observação deverá ser investigada.

5.3.6. Polissacarídeos de Superfície

Genes envolvidos com a síntese de lipopolissacarídeos foram observados nas tabelas de genes diferenciais de PHA-VIG e TEP-VIG com um alto nível de expressão, *fold change* entre 73-7 e 57-4, em *P. vulgaris* e *T. vogelii*, respectivamente. Entre os polissacarídeos de superfície, os mais requeridos pelos rizóbios são os lipopolissacarídeos (LPSs). LPSs são os principais componentes estruturais da membrana externa dos rizóbios, e são essenciais para o sucesso das infecções simbióticas (MATHIS *et al.*, 2005; MARIE *et al.*, 2004; BROUGHTON *et al.*, 2006; BECKER *et al.*, 2005). O pequeno operon que apareceu diferencial nas duas tabelas está localizado no plasmídeo simbiótico e é composto pelos genes *rmIBDA* e *wbgA*, e sintetiza antígeno O rico em ramnose que é ligado aos LPSs, provavelmente pelo produto do gene *fixF*, outro gene requerido para síntese de LPS e uma efetiva nodulação (BROUGHTON *et al.*, 2006; REUHS *et al.*, 2005; ARDISSONE *et al.*, 2011).

Esses genes estão localizados próximos um do outro, mas são regulados de maneira diferente (FIGURA 9). Depois da indução por flavonóides, a via de sinalização segue de maneira igual àquela que regula a síntese de fatores Nod. O *nod-box 6* (NB6) é encontrado antes de *fixF* e, sua expressão é controlada por $\text{NodD1} \rightarrow \text{SyrM2} \rightarrow \text{NodD2} \rightarrow \text{fixF}$. O operon *rmIBDA-wbgA* apresenta o *tts-box 2* (TB2) antes do gene *rmIB* (primeiro gene do operon) e é regulado por $\text{NodD1} \rightarrow \text{TtsI} \rightarrow \text{rmIB-wbgA}$ (MARIE *et al.*, 2004; KOBAYASHI, *et al.*, 2004). Mutações no *ttsI* resultou na ausência de ramnose em extratos de LPS, e mutantes em *syrM2* e *nodD2* ainda produziram um pouco de ramnose, uma vez que o operon *rmI* continua sendo expresso nesses mutantes (BROUGHTON *et al.*, 2006).

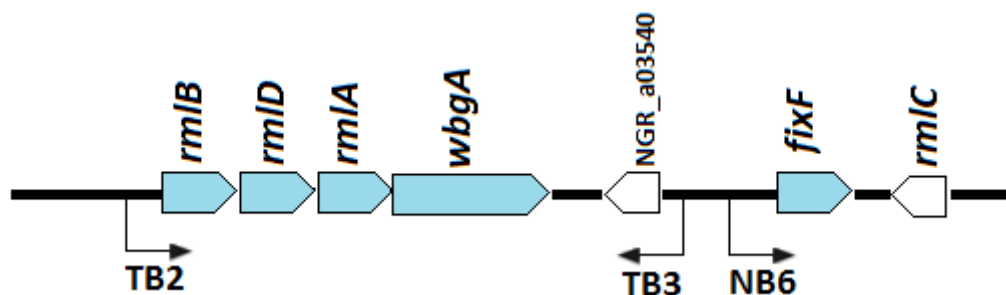


FIGURA 9. ORGANIZAÇÃO GENÉTICA DOS GENES ENVOLVIDOS COM A SÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS. FONTE: A autora. NOTA: Em azul, os genes requeridos para a síntese de LPS ricos em ramnose. *nod-box* e *tts-boxes* estão apresentados como flechas em preto.

Vários trabalhos já foram realizados relacionando a expressão de *rmlBDA*, *wbgA* e *fixF* com o processo de nodulação. Na tabela 15 é mostrado o efeito de mutações nos genes que codificam LPS ricos em ramnose na nodulação em diferentes plantas, que apresentam diferentes tipos de nódulos, por NGR234. Estirpes mutantes em genes da síntese de LPS são incapazes de apresentar uma simbiose efetiva ou fixar nitrogênio, ou porque a síntese de LPS ricos em ramnose não ocorre ou porque apresentam essas moléculas truncadas (BECKER *et al.*, 2005; ARDISSONE *et al.*, 2011).

TABELA 15: EFEITO FENOTÍPICO DE MUTAÇÕES EM GENES ENVOLVIDOS COM A SÍNTESE DE LPS.

Planta	Fenótipo depois da inoculação com:			
	Nódulo	NGR234	NGR Δ <i>rmlB-wbgA</i>	NGR Ω <i>fixF</i>
<i>Leucaena leucocephala</i>	Indeterminado	Fix ⁺	Fix ⁺	Fix ⁺
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Determinado	Fix ⁺	Fix ^{+/-}	Fix ⁻
<i>Tephrosia vogelii</i>	Indeterminado	Fix ⁺	Fix ⁻	Fix ⁻
<i>Vigna unguiculata</i>	Determinado	Fix ⁺	Fix ^{+/-}	Fix ⁻

FONTE: Adaptado de Broughton *et al.*, 2006. NOTA: NGR234: rizóbio tipo selvagem; NGR Δ *rmlB-wbgA*: mutação nos genes *rmlBDA* e *wbgA* por deleção; NGR Ω *fixF*: mutação no gene *fixF* por inserção de interposon ômega. Fix⁺: plantas inoculadas que apresentaram fenótipo de plantas inoculadas com NGR234 selvagem, apresentando folhas verdes e nódulos efetivos. Fix⁻: plantas inoculadas que apresentaram fenótipo de plantas não-inoculadas, com folhas amareladas, e/ou que não fixaram nitrogênio. Fix^{+/-}: plantas inoculadas que apresentaram um fenótipo intermediário, com folhas verde-amarelo.

A função exata da ramnose ainda não é conhecida, mas segundo dados da literatura, em nódulos, ela pode proteger o rizóbio, localizado no simbiossomo, do citoplasma da planta, permitindo a persistência desse bacteroide por mais tempo ou pode atuar como uma molécula sinal durante a simbiose (BROUGHTON *et al.*, 2006; MATHIS *et al.*, 2005).

O comportamento do operon *rml* e *tts* entre as comparações, com maior expressão em bacteroides de *P. vulgaris* e *T. vogelii* e menor, em bacteroides de *V. unguiculata*, confirma o mecanismo comum de regulação envolvido entre esses operons. Além disso, o fato da expressão desses genes ser menor na associação com *V. unguiculata* sugere que os alvos de TtsI não estão sendo expressos em NGR234 quando ele nodula essa planta.

Outros dois genes foram analisados por RT-qPCR, mas não participaram de nenhuma via ou discussão apresentada. O gene *NGR_c11890*, que segundo os dados de RNA-Seq está diferencial em PHA-VIG e TEP-VIG, com *fold change* 2,75 e 2,74, respectivamente, foi confirmado apenas em PHA-VIG com valor de *fold change* médio de $2,63 \pm 0,28$. Esse gene codifica o fator de alongação Tu que promove a ligação do aminoacil-RNAt no sítio A do ribossomo durante a biossíntese de proteínas (NCBI, 2016). O outro gene, *dnaA*, codifica uma proteína que promove o início da replicação cromossomal. Nos dados de RNA-Seq esse gene apresentou *fold change* 2,7 em TEP-VIG e na RT-qPCR foi confirmado com um valor médio de $2,37 \pm 0,30$.

5.4. OBTENÇÃO DE FUSÃO DE GENES COM GFP

As regiões promotoras do operon *pqq*, do gene *nopB* e *rmlB* foram clonadas no plasmídeo pPROBE-GT para obter uma fusão transcricional com o gene *gfp* (*green fluorescence protein*) e analisar qualitativamente a expressão desses genes nos bacteróides, através da observação da fluorescência por microscopia. Esses genes foram escolhidos por fazerem parte da lista dos genes diferencialmente expressos entre as plantas *P. vulgaris* e *V. unguiculata*. Na tabela 16 são mostradas as coberturas desses genes e seus RPKMs.

A região promotora do operon *pqq* foi clonada em duas direções, pois em uma direção ela regula o operon (*NGR_b03260-03300*) e na outra, uma álcool desidrogenase (*NGR_b03250*). A fusão na direção da álcool desidrogenase foi denominada de A32 e a fusão na direção do operon *pqq*, de A65. Como controles foram utilizados o *S. fredii* NGR234 selvagem, além do mesmo rizóbio contendo o plasmídeo pPROBE-GT sem nenhuma região promotora clonada (vazio).

TABELA 16: DADOS DO RNA-SEQ PARA OS GENES ANALISADOS.

Gene	Comprimento do gene (pb)	Fold Change	Valor de P	RPKM médio <i>Phaseolus</i>	RPKM médio <i>Vigna</i>	Cobertura média <i>Phaseolus</i>	Cobertura média <i>Vigna</i>
NGR_b03250 - (A32)	1767	17,524	1,5E-17	231,64	3179,11	0,728	5,303
<i>pqqA</i> – (A65)	363	11,085	2,0E-07	1144,62	9925,94	3,631	10,339
<i>pqqB</i>	912	10,468	2,3E-05	164,37	1374,57	0,513	2,357
<i>pqqC</i>	768	5,909	4,4E-10	133,50	618,58	0,449	1,439
<i>pqqD</i>	294	14,074	1,0E-03	49,72	533,16	0,201	0,876
<i>pqqE</i>	1125	6,920	1,5E-10	67,88	370,08	0,199	1,530
<i>nopB</i>	495	6,199	3,4E-12	1473,77	132,39	9,923	0,829
<i>rmlB</i>	1053	17,171	9,8E-09	652,07	20,64	4,203	0,138

Depois das fusões estarem prontas e inseridas no *S. fredii* NGR234 através da conjugação, esses rizóbios foram inoculados em *P. vulgaris* e *V. unguiculata*. Após três semanas os nódulos foram colhidos para realização dos cortes, preparo das lâminas, e posterior visualização no microscópio confocal. A intensidade de fluorescência verde entre as imagens das diferentes condições de *P. vulgaris* e *V. unguiculata* foram comparadas. Como pode ser visualizado no gráfico 1 e nas figuras 10, 11, 12 e 13 houve a confirmação qualitativa e quantitativa dos dados do transcriptoma: as fusões A32 e A65 sendo mais expressas em *V. unguiculata* com uma diferença de intensidade de fluorescência muito grande quando comparado com os mesmos genes em *P. vulgaris* (figuras 10 e 11). Os genes *nopB* e *rmlB* foram mais expressos em *P. vulgaris* (como o esperado) mas com uma baixa diferença de intensidade de fluorescência (figuras 12 e 13). Os valores de RPKM de *nopB* e *rmlB* em *P. vulgaris* (TABELA 16), mesmo sendo a planta com maior expressão desses genes, são muito menores do que os valores de RPKM dos genes do operon *pqq* quando em *V. unguiculata*. É possível que seja esse o motivo pelo qual não houve uma diferença tão grande nessa comparação. Além disso, as diferenças de intensidade de fluorescência quantificadas nas diferentes fusões não são tão grandes quando comparadas com os dados de RNA-Seq. Isso é esperado uma vez que a quantificação realizada através de RNA-Seq é muito mais sensível.

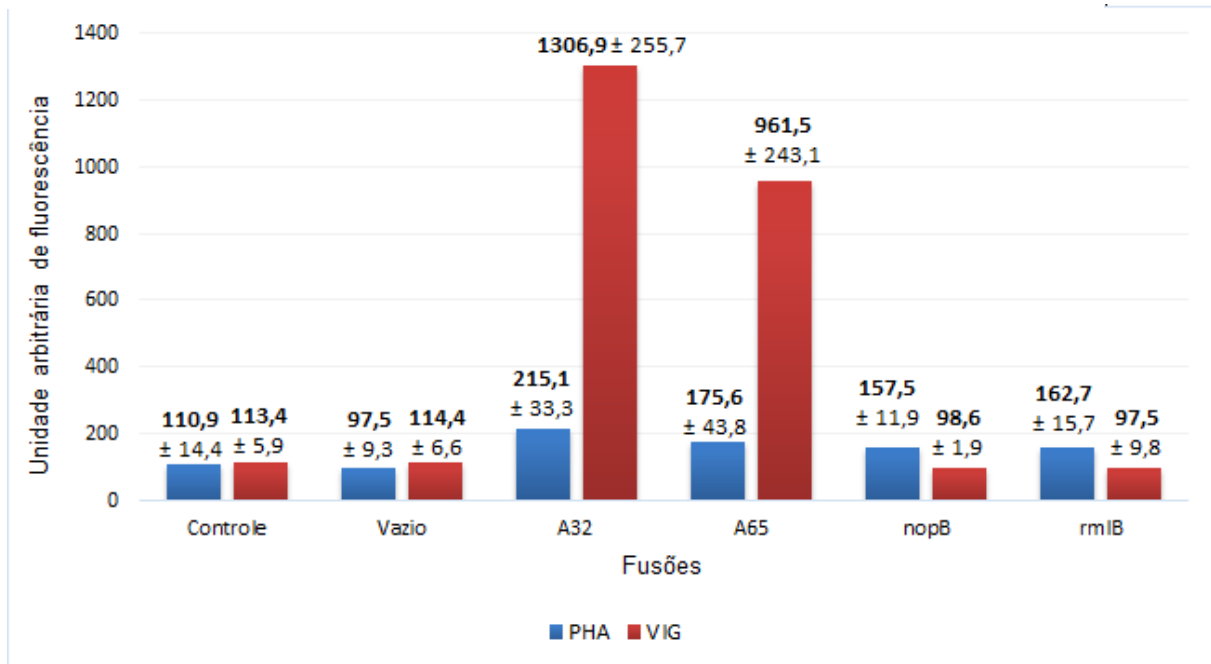


GRÁFICO 1: COMPARAÇÃO DE INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA ENTRE AS FUSÕES EXPRESSAS POR BACTÉRÓIDES NAS PLANTAS *V. unguiculata* e *P. vulgaris*, ATRAVÉS DAS IMAGENS GERADAS PELA MICROSCOPIA CONFOCAL. NOTA: Acima das barras estão indicados os valores médios de intensidade de fluorescência juntamente com o desvio padrão. Esses valores foram gerados a partir da análise de três imagens de corte de nódulos independentes.

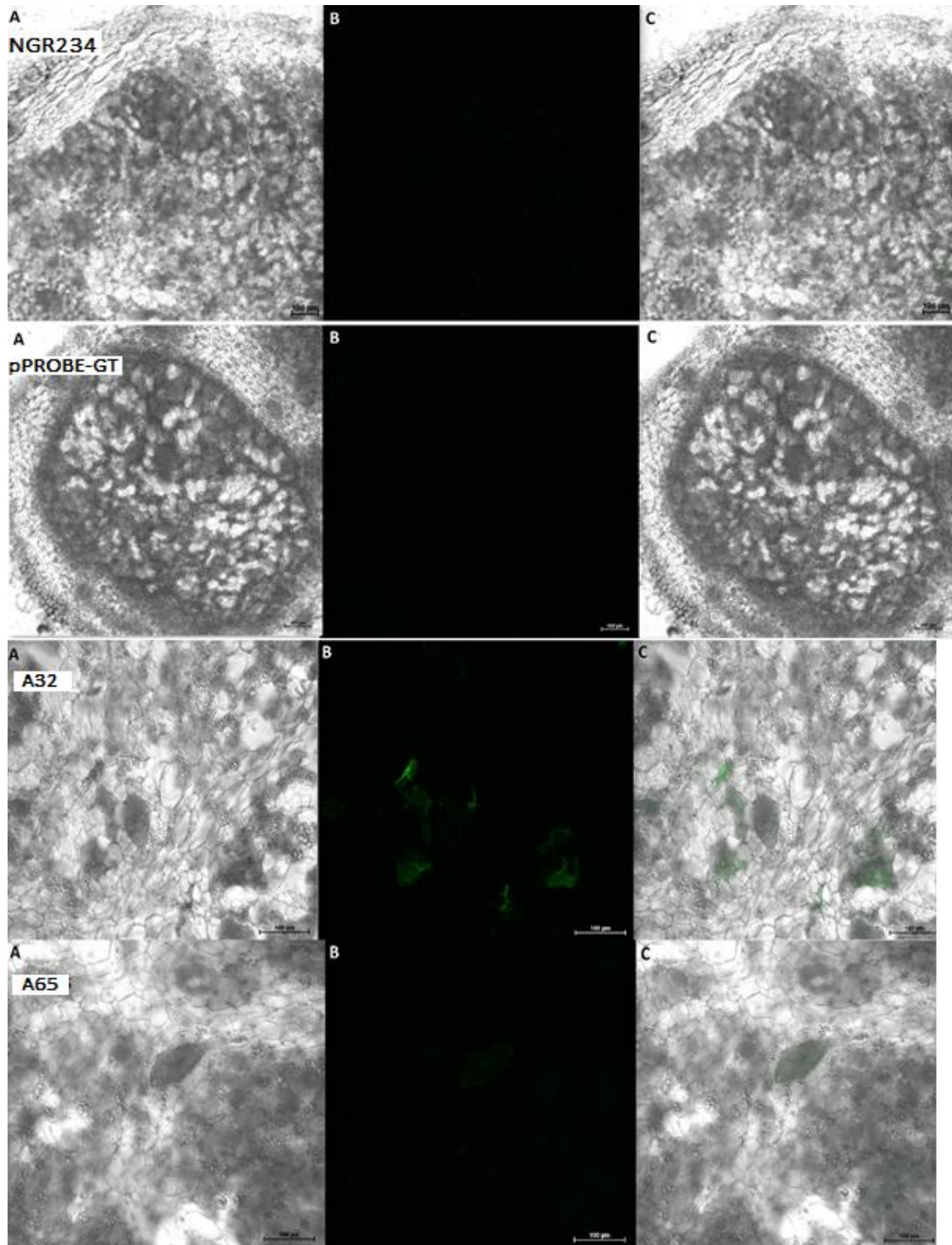


FIGURA 10. CORTES DE NÓDULOS DE 21 DIAS DE *Phaseolus vulgaris* INOCULADOS COM *S. fredii* NGR234 CONTENDO O PLASMÍDEO pPROBE-GT COM AS FUSÕES A32 e A65. NOTA: A: Imagem formada em campo claro; B: Imagem formada através de fluorescência; C: Sobreposição das duas imagens.

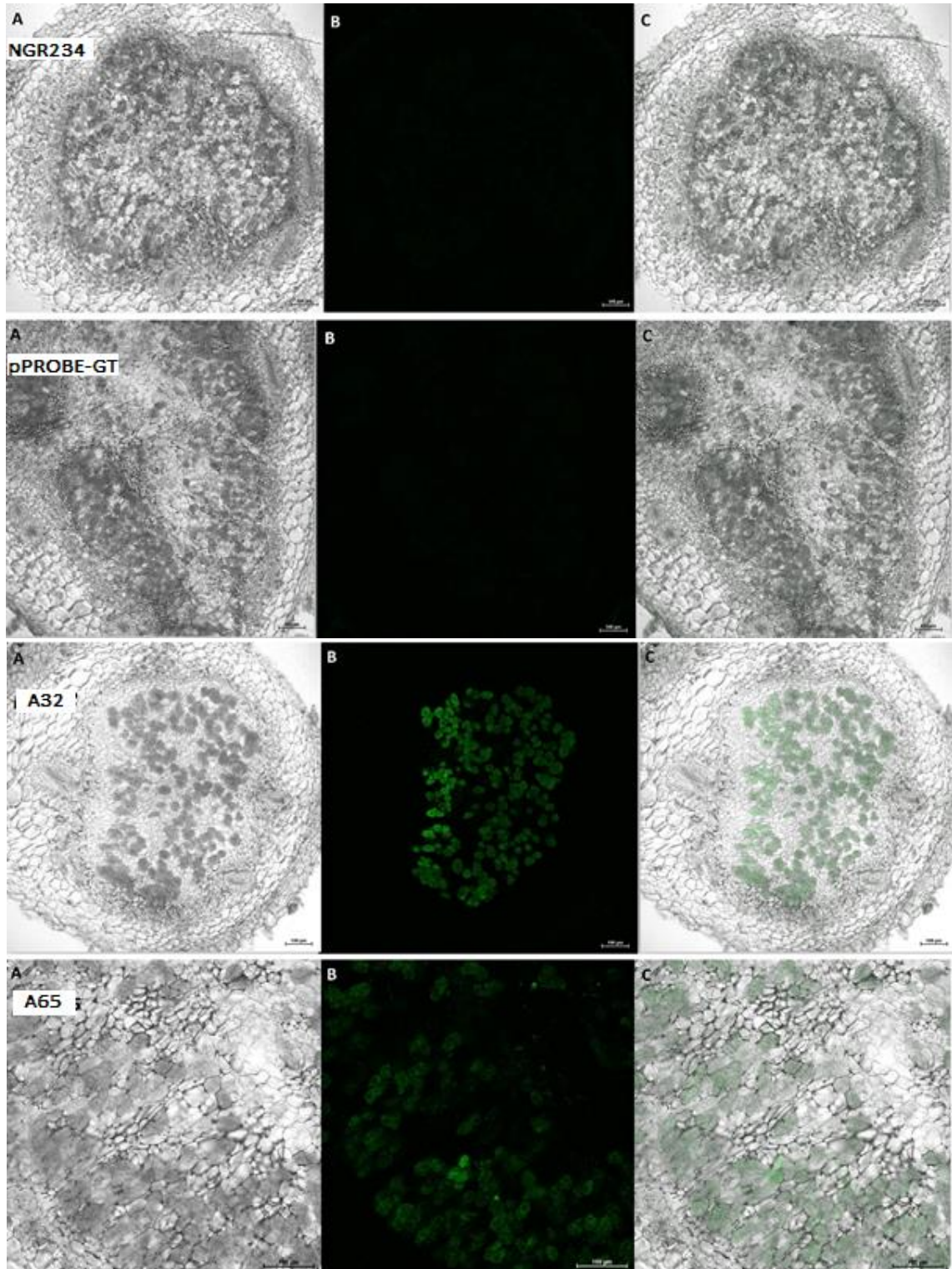


FIGURA 11. CORTES DE NÓDULOS DE 21 DIAS DE *Vigna unguiculata* INOCULADOS COM *S. fredii* NGR234 CONTENDO O PLASMÍDEO pPROBE-GT AS FUSÕES A32 e A65. NOTA: A: Imagem formada em campo claro; B: Imagem formada através de fluorescência; C: Sobreposição das duas imagens.

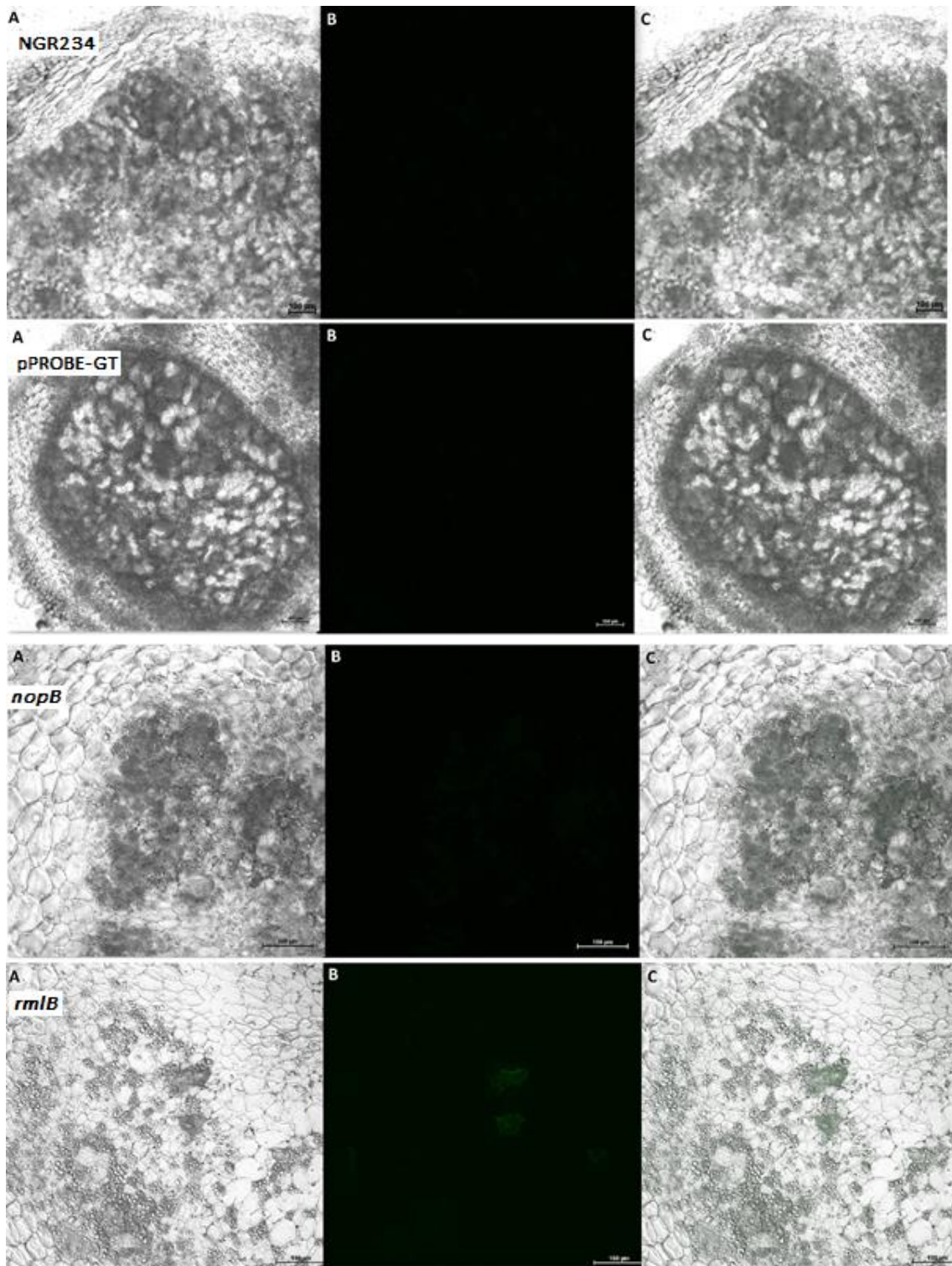


FIGURA 12. CORTES DE NÓDULOS DE 21 DIAS DE *Phaseolus vulgaris* INOCULADOS COM *S. fredii* NGR234 CONTENDO O PLASMÍDEO pPROBE-GT AS FUSÕES *nopB* e *rmlB*. NOTA: A: Imagem formada em campo claro; B: Imagem formada através de fluorescência; C: Sobreposição das duas imagens.

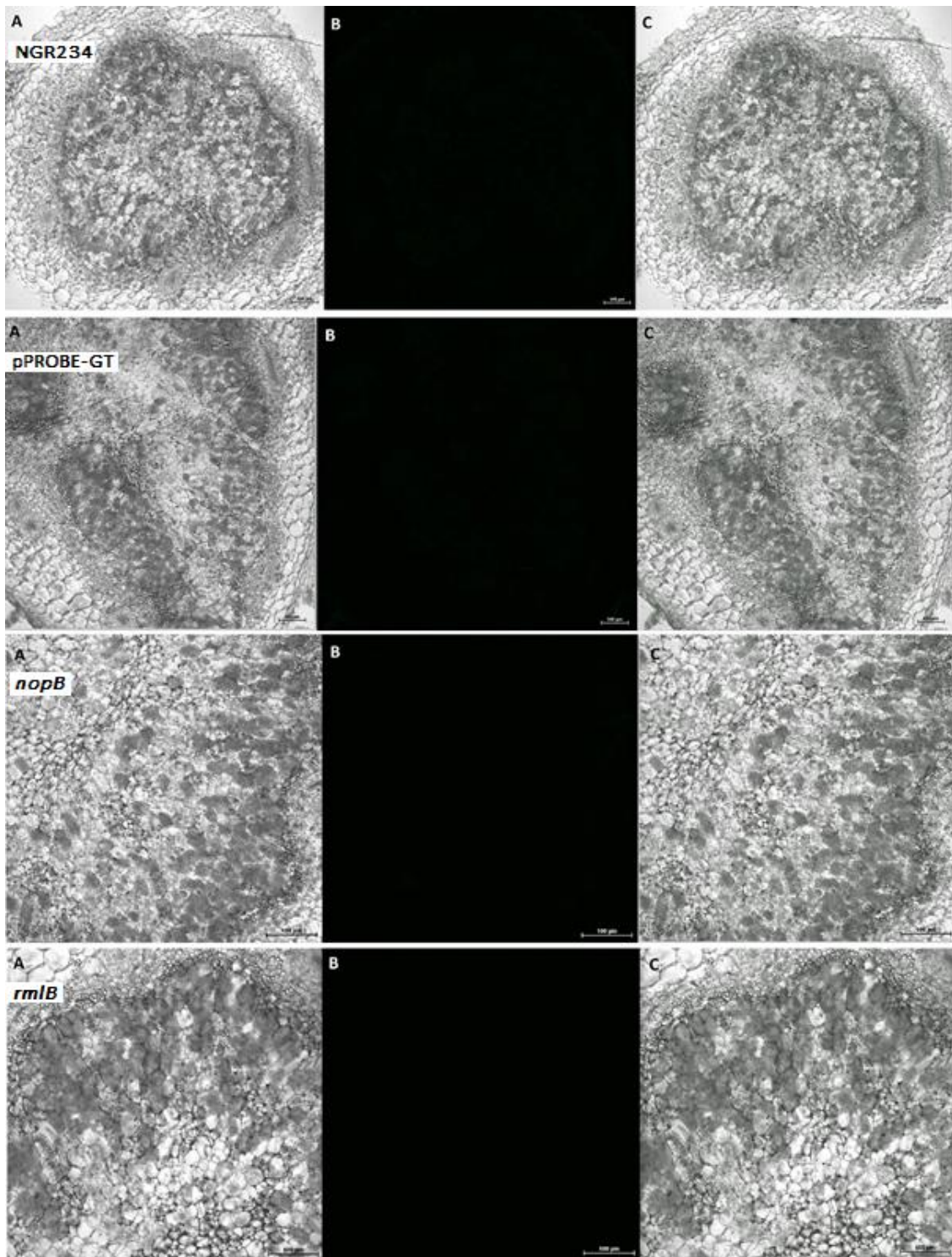


FIGURA 13. CORTES DE NÓDULOS DE 21 DIAS DE *Vigna unguiculata* INOCULADOS COM *S. fredii* NGR234 CONTENDO O PLASMÍDEO PPROBE-GT COM AS FUSÕES *nopB* e *rmlB*. NOTA: A: Imagem formada em campo claro; B: Imagem formada através de fluorescência; C: Sobreposição das duas imagens.

5.5. ANÁLISE DE RNAs NÃO CODIFICADORES

Buscando encontrar potenciais regiões transcritas em RNAs não codificadores (ncRNAs) no genoma de *S. fredii* NGR234 duas estratégias foram realizadas:

1. Identificar regiões transcritas em ncRNAs através da homologia de sequências comparando com o genoma de *Sinorhizobium meliloti*, já que esse organismo teve seu transcriptoma bem estudado, revelando mais de 1.000 candidatos a pequenos RNAs pertencentes às mais diferentes classes (SCHLUTER, 2010). As sequências correspondentes aos ncRNAs no *S. meliloti* foram obtidas através do material suplementar do artigo de Schluter (2010) e um Blast de nucleotídeos foi realizado contra o genoma do NGR234. Das 1.125 sequências que *S. meliloti* apresentou como candidatos a ncRNAs, apenas 283 apresentaram alguma similaridade com o genoma de NGR234, entre esses, 26 no mega plasmídeo (pB), 255 no cromossomo e nenhuma sequência no plasmídeo *a* (dados não mostrados). O genoma do rizóbio *S. meliloti* foi utilizado para a busca de sequências de ncRNAs através de homologia, pois a organização geral do genoma NGR234 é muito semelhante ao de *S. meliloti*. Em ambos os casos o genoma é dividido em três replicons, um plasmídeo simbiótico, um mega plasmídeo e um cromossomo, sendo que os genes relacionados a nodulação estão presentes no plasmídeo simbiótico (plasmídeo *a*) (STREIT *et al.*, 2004; FLORES *et al.*, 1998; GALIBERT *et al.*, 2001, SCHMEISSER *et al.*, 2009). Muitos genes *housekeeping*, envolvidos com o metabolismo e com muitos outros processos apresentam alto grau de similaridade entre as duas espécies (VIPREY *et al.*, 2000b).
2. A segunda estratégia de busca de regiões não codificadoras no genoma de NGR234 foi realizada através do software de predição de ncRNAs “RNASpace”. Após a execução do software, selecionando todas as opções de bancos de dados disponibilizadas pelo software (item 4.22.2 de materiais e métodos), tabelas foram geradas, indicando o início e o fim de transcrição dos candidatos. Um número de 510 potenciais regiões de ncRNA foi gerado pelo RNASpace,

além de indicar a provável família que ele pertence, o tamanho desse transcrito, a fita que se encontra (+ ou -) e um *score* (dados não mostrados).

Depois de obter as listas das duas diferentes metodologias, foi utilizado o programa Artemis que permite a visualização e o empilhamento de leituras no genoma de organismos. Um arquivo das leituras das bibliotecas do NGR234 vida livre em formato BAM foi criado para ser o *input* nesse software através do *software* Samtools. Primeiramente visualizou-se as regiões de potenciais ncRNAs geradas através da análise por homologia de sequência, e posteriormente, as geradas pelo *software* RNASpace. As regiões que apresentavam um bom número de leituras sobre as prováveis regiões transcritas em ncRNA e que se caracterizavam como ncRNAs, foram selecionadas em uma nova tabela, a fim de selecionar alguns candidatos para confirmação desses resultados. As regiões promotoras desses ncRNAs também foram analisadas com a finalidade de se certificar que se tratava de um gene e, para criar *primers* para validação por RT-qPCR. Sete candidatos comuns entre as metodologias foram selecionados, com o objetivo de realizar uma confirmação experimental (não realizada) (TABELA 17).

TABELA 17: CANDIDATOS A POTENCIAIS ncRNAs SELECIONADOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE SEQUÊNCIA E PELO SOFTWARE DE PREDIÇÃO RNASPACE.

	Nome	Início	Fim	Número de nucleotídeos	Fita	Tipo de RNA proposto	Possível gene alvo
1	ncRNA14	1130002	1130151	149	-	trans-encoded sRNA	-
2	ncRNA20	1434168	1434254	86	-	trans-encoded sRNA	-
3	ncRNA21	1434467	1434582	115	-	trans-encoded sRNA	-
4	ncRNA38	3006268	3006337	69	+	trans-encoded sRNA	-
5	ncRNA43	3321896	3322010	114	+	mRNA leader	<i>metA</i>
6	ncRNA47	3417308	3417420	112	+	mRNA leader	<i>tbpA</i>
7	ncRNA51	3772578	3772683	105	+	<i>mRNA leader*</i>	<i>dnaX</i>

NOTA: Na tabela é indicado o início e o fim de transcrição dos candidatos, o tamanho do candidato a ncRNA, a orientação da fita de DNA em que se encontram, a classe de RNA que eles pertencem e o possível gene alvo que ele regula. Todos os candidatos a ncRNAs estão localizados no cromossomo.

A classificação dos RNA proposta para os sete candidatos foi realizada a partir da observação da posição do ncRNA no genoma, seguindo a classificação feita por Schluter (2010), para os ncRNAs de *S. meliloti*. Foi analisada para verificar se a classificação se manteve entre essas duas espécies. Com exceção do ncRNA51 os outros ncRNAs, a princípio, mantêm as características tanto no *S.*

meliloti, quanto no NGR234. O ncRNA51, que no trabalho de Schluter (2010) é denominado de SmelC035, foi classificado por ele como *cis-encoded antisense sRNA* por orientar-se na fita oposta ao seu gene alvo (SMc02904), anotado como codificador de uma proteína hipotética. A figura 14 mostra o empilhamento das leituras desse ncRNA observadas em NGR234 obtido através do software Artemis com a ferramenta BamView. A partir da análise deste empilhamento, observa-se que as leituras se sobrepõem de uma forma em que a classificação como mRNA leader é mais provável por representar uma derivação estável da parte 5' do RNA mensageiro que codifica proteínas, apesar da possibilidade de classificação como *cis-encoded* não ser ainda descartada.

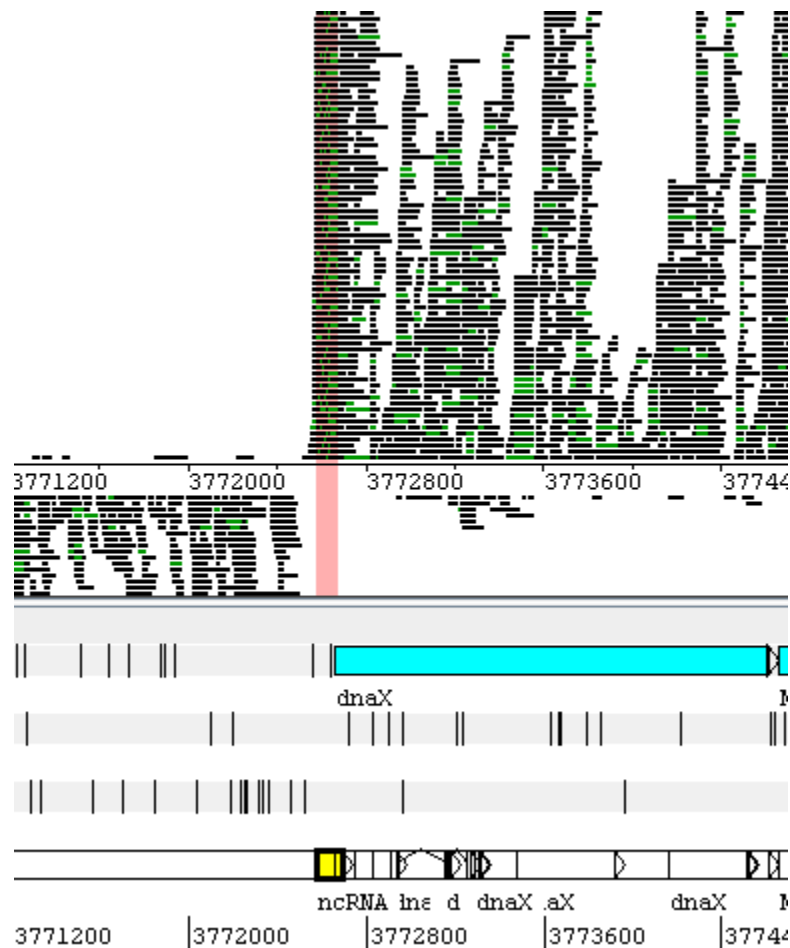


FIGURA 14. EMPILHAMENTO DAS LEITURAS SOBRE A REGIÃO DO CANDIDATO A ncRNA51. FONTE: Software Artemis. NOTA: As leituras apresentadas na figura são provenientes da biblioteca do NGR234 na condição de vida livre, das três replicadas biológicas. Essas leituras estão mapeadas separadamente em cada fita do genoma.

A análise realizada nesse trabalho é apenas preliminar, e deverá ser expandida para obtermos resultados mais completos e com maior confiança.

6. CONCLUSÃO

- A análise de expressão diferencial de genes de bacteroides de *S. fredii* NGR234 obtidos de *P. vulgaris*, *T. vogelii* e *V. unguiculata* permitiu a identificação de vias que são mais ou menos expressas durante a interação com cada um dos hospedeiros.
- Um pequeno número de genes diferencialmente expressos foi associado com o tipo de nódulo (determinado ou indeterminado), e entre eles encontram-se os genes que fazem parte do metabolismo de energia, e que foram mais expressos nos bacteroides de *T. vogelii*. Uma explicação para esta diferença na expressão é o fato de que *T. vogelii* forma nódulos indeterminados, que se caracterizam por sucessivas divisões celulares, exigindo desta forma uma alta produção de energia para sustentar o metabolismo basal do nódulo. O mesmo não ocorre em *P. vulgaris* e *V. unguiculata*, que possuem nódulos determinados, apresentando um menor custo energético, apenas para manutenção do nódulo.
- Genes relacionados com a fixação de nitrogênio, como de captação de ferro, enxofre, assimilação de C4-dicarboxilatos, síntese de aminoácidos para fornecer para a planta, são mais expressos em *T. vogelii* e *V. unguiculata*, sugerindo a fixação de nitrogênio está mais ativa nessas plantas do que em *P. vulgaris*.
- Os genes que compõem os operons do TTSS e de síntese de lipopolissacarídeos ricos em ramnose foram mais expressos nos bacteroides de *P. vulgaris* e *T. vogelii*, em relação aos de *V. unguiculata*. Esses resultados podem explicar o motivo pelo qual, em trabalhos anteriores de mutagênese nos genes do TTSS, a nodulação em *V. unguiculata* não foi prejudicada, e também confirma o mecanismo comum de regulação envolvido entre esses operons.

- A diferença de expressão gênica foi confirmada através de RT-qPCR, pois os valores de expressão gerados por essa metodologia se assemelharam aos dados de RNA-Seq, com exceção de dois genes, *nodD2* e *nopB* entre TEP-VIG. Além disso, variações no nível de expressão de alguns genes foram confirmadas através da observação de fluorescência nos nódulos de *P. vulgaris* e *V. unguiculata*, utilizando a microscopia confocal.
- Potenciais ncRNAs foram encontrados no cromossomo de *S. fredii* NGR234, a partir da análise do transcriptoma desse microrganismo em condição de vida livre, e 7 candidatos foram selecionados para serem analisados mais detalhadamente. A análise dos 7 candidatos foi realizada de maneira preliminar, necessitando de outras estratégias para obter resultados mais completos e com maior confiança, e a partir daí, seguir para confirmação da existência desses ncRNAs e demais conhecimentos a respeito.
- O conjunto de dados gerados nesse trabalho poderá ser utilizado como referência para futuras investigações e estudos de vias e sistemas envolvidos na simbiose. Esses estudos serão importantes para um entendimento mais específico do processo de nodulação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-BARAJAS, E. A., PÉREZ, C. D., DÍAZ, M. I. R., ROSAS, H. R., CERVANTES, C. Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions. **Biometals**, v. 24, n. 4, p. 687-707. 2011.

ALLAWAY, D., LODWIG, E. M., CROMPTON, L. A., WOOD, M., PARSONS, T. R., *et al.* Identification of alanine dehydrogenase and its role in mixed secretion of ammonium and alanine by pea bacteroids. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 508–15. 2000.

ANDERS, S., HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, v. 11, n. 10. 2010.

ARDISSONE, S., NOEL, K. D., KLEMENT, M., BROUGHTON, W. J., DEAKIN, W.J. Synthesis of the Flavonoid-Induced Lipopolysaccharide of *Rhizobium sp.* Strain NGR234 Requires Rhamnosyl Transferases Encoded by Genes *rgpF* and *wbgA*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 24, n. 12, p. 1513-1521. 2011.

AUSMEES, N., KOBAYASHI, H., DEAKIN, W. J., MARIE, C., KRISHNAN, H. B., BROUGHTON, W. J., PERRET, X. Characterization of NopP, a type III secreted effector of *Rhizobium sp.* strain NGR234. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 14, p. 4774-80. 2004.

BARNETT, M. J., TOMAN, C. J., FISHER, R. F., LONG, S. R. A dual-genome Symbiosis Chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote–host interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America - PNAS**, v. 101, n. 47, p. 16636-41. 2004.

BARTSEV, A. V., DEAKIN, W. J., BOUKLI, N. M., MCALVIN, C. B., STACEY, G., MALNOE, P., BROUGHTON, W.J., STAEHELIN, C. NopL, an effector protein of *Rhizobium sp.* NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. **Plant Physiology**, v. 134, n. 2, p. 871–879. 2004.

BECKER, A, OVERLÖPER, A, SCHLÜTER, J. P., REINKENSMEIER, J., ROBLEDO, M., GIEGERICH, R., FRANZ NARBERHAUS F., HACKENBERG, E. E. Riboregulation in plant-associated α -proteobacteria Riboregulation in plant-associated α -proteobacteria. **RNA Biology**, v.11, n.5, p.1–13. 2014.

- BECKER, A., FRAYSSE, N., SHARYPOVA, L. Recent Advances in Studies on Structure and Symbiosis-Related Function of Rhizobial K-Antigens and Lipopolysaccharides. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 18, n. 9, p. 899–905. 2005.
- BEGLEY, T. P., DOWNS, D. M., EALICK, S. E., MCLAFFERTY, F. W., VAN LOON, A. P., TAYLOR, S., CAMPOBASSO, N., CHIU, H. J., KINSLAND, C., REDDICK, J. J., XI, J. Thiamin biosynthesis in prokaryotes. **Archives Microbiology**, v. 171, p. 293–300. 1999.
- BENJAMINI, Y., HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 57, n. 1, p. 289-300. 1995.
- BERINGER, J. E. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 188-198. 1974.
- BERNARDELLI, C. E., LUNA, M. F., GALAR, M. L., BOIARDI, J. L. Periplasmic PQQ-dependent glucose oxidation in free-living and symbiotic rhizobia. **Current Microbiology**, v.42, n. 5, p. 310–315. 2001.
- BERNARDELLI, C. E., LUNA, M. F., GALAR, M. L., BOIARDI, J.L. Symbiotic phenotype of a membrane-bound glucose dehydrogenase mutant of *Sinorhizobium meliloti*. **Plant Soil**, v.313, p.217–225. 2008.
- BLAIR, M.W., GALEANO, C., MUNOZ, C., BOUNIOL, M., PANKHURST, C., LARIQUET, P., BROUGHTON, W. Generation of TILLING mutants in common bean. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Annu. Rpt., Biotechnol. Unit. CIAT, Colombia. 2005.
- BOIARDI, J. L., GALAR, M. L., NEIJSEL, O. M. PQQ linked extracellular glucose oxidation and chemotaxis towards this cofactor in rhizobia. **FEMS Microbiology Letters**, v. 140, p. 179-184. 1996.
- BOUSSAU, B., KARLBERG, E. O., FRANK, A. C., LEGAULT, B. A., ANDERSSON, S. E. G. Computational inferences of scenarios for a-proteobacterial genome evolution. **PNAS USA**, v. 101, p. 9722–9727. 2004.
- BROUGHTON W. J., JABBOURI S., PERRET X. Keys to symbiotic harmony. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 20, p. 5641-5652. 2000.

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

BUCAGU, C., VANLAUWE, B., GILLER, K.E. Managing *Tephrosia* mulch and fertilizer to enhance coffee productivity on smallholder farms in the Eastern African Highlands. **Europ. J. Agronomy**, v. 48, p. 19– 29. 2013.

CGIAR. Common Bean. Available online: <http://www.cgiar.org/our-research/crop-factsheets/beans/> (acessado dia 12 de abril de 2016) 2012.

CHAI, Y., WINANS. S.C. A small antisense RNA downregulates expression of an essential replicase protein of an *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1574-85. 2005.

CHAO, T.C., BECKER, A., BUHRMESTER, J., PUHLER, A., WEIDNER, S. The *Sinorhizobium meliloti* fur gene regulates, with dependence on Mn(II), transcription of the *sitABCD* operon, encoding a metal-type transporter. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 11, p. 3609–20. 2004.

CHENG, J, BRANISLAVA, P., MORTON R. A., FINAN, T. M. An ABC-Type Cobalt Transport System Is Essential for Growth of *Sinorhizobium meliloti* at Trace Metal Concentrations. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 17, p. 4405–4416. 2011.

CLC BIO WORKBENCH (2012). Disponível em:
<<http://clcbio.com/index.php?id=1240>> acessado em set/2015.

CORNELIS, G. R., Van GIJSEGEM, F. Assembly and Function of Type III Secretory Systems. **Annual Review. Microbiology**, v. 54, p.735–74. 2000.

DAI, W. J., ZENG, Y., XIE, Z. P., STAEHELIN, C. Symbiosis-promoting and deleterious effects of NopT, a novel type 3 effector of *Rhizobium sp.* strain NGR234. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 14, p. 5101-5110. 2008.

DALE, C., PLAGUE, G. R., WANG, B., OCHMAN, H., MORAN, N. A. Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 19, p. 12397–12402. 2002.

DAVIES, B.W., WALKER, G. C. Disruption of *sitA* compromises *Sinorhizobium meliloti* for manganese uptake required for protection against oxidative stress. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 5, p. 2101–9. 2007.

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 Interaction**, v. 18, n. 5, p. 499-507. 2005.

DEBOUCK, D.G.; TORO, O.; PAREDES, O.M.; JOHNSON, W.C.; GEPTS, P. Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in northwestern South America. **Econ. Bot.**, v. 47, p. 408–423. 1993.

DELWICHE, C. C., JOHNSON, C. M., REISENAUER, H. M. Influence of cobalt on nitrogen fixation by *Medicago*. **Plant Physiology**, v. 36, p. 73–78. 1960.

DERYLO, M., SKORUPSKA, A. Enhancement of symbiotic nitrogen fixation by vitamin-secreting fluorescent *Pseudomonas*. **Plant and Soil**, v. 154, n. 2, p. 211–217. 1993.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. **Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the 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.

FAUVART, M., MICHIELS, J. Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, n. 1, p. 1-9. 2008.

FELLAY, R., HANIN, M., MONTORZI, G., FREY, J., FREIBERG, C., GOLINOWSKI, W., STAEHELIN, C., BROUGHTON, W. J., JABBOURI, S. *nodD2* of *Rhizobium sp.* NGR234 is involved in the repression of the *nodABC* operon. **Molecular Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 1039-50. 1998.

FERRÁNDEZ, A., MIÑAMBRES, B., GARCÍA, B., OLIVERA, E. R., LUENGO, J. M., GARCÍA, J. L., DÍAZ, E. Catabolism of Phenylacetic Acid in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25974–25986. 1998.

FLORES, M., MAVINGUI, P., GIRARD, L., PERRET, X., BROUGHTON, W. J., MARTINEZ-ROMERO, E., DAVILA, G., PALACIOS, R. Three replicons of *Rhizobium sp.* strain NGR234 harbor symbiotic gene sequences. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 22, p. 6052– 6053. 1998.

FORWARD, J.A., BEHRENDT, M.C., KELLY, D.J. Evidence that the high affinity C4-dicarboxylate transport system of *Rhodobacter capsulatus* is a novel type of periplasmic permease. **Biochemical Society Transactions**, v. 21, n. 4. 1993.

FRAYSSE, N., JABBOURI, S., TREILHOU, M., COUDERC, F., POINSOT, V. Symbiotic conditions induce structural modifications of *Sinorhizobium sp.* NGR234 surface polysaccharides. **Glycobiology**, v.12, n. 11, p.741-748. 2002.

FREIBERG, C., FELLAY, R., BAIROCH, A., BROUGHTON, W.J., ROSENTHAL, A., PERRET, X. Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes. **Nature**, v. 387, n. 6631, p. 394–401. 1997.

FROTA, K.M.G., SOARES, R.A.M., ARÊAS, J.A.G. Chemical composition of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), BRS-Milênio cultivar. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, n. 2, p. 470-476. 2008.

GAGE, D.J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 2, p. 280-300. 2004.

GALIBERT, F., FINAN, T. M., LONG, S. R., PUHLER, A., ABOLA, P., AMPE, F., *et al.* The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Science**, v. 293, n. 5530, p. 668–672. 2001.

GAUDE, N., TIPPMANN, H., FLEMETAKIS, E., KATINAKIS, P., UDVARDI, M., DÖRMANN, P. The galactolipid digalactosyldiacylglycerol accumulates in the peribacteroid membrane of nitrogen-fixing nodules of soybean and *Lotus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p.34624-34630. 2004.

GEIGER, O., RÖHRS, V., WEISSENMAYER, B., FINAN, T. M., THOMAS-OATES, J. E. The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglycerol-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 1, p.63-73. 1999.

GHOSH, P. Process of Protein Transport by the Type III Secretion System. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 771–795. 2004.

GLENN, A. R. DILWORTH, M. J. The uptake and hydrolysis of disaccharides by fast- and slow-growing species of *Rhizobium*. **Archives of Microbiology**, v.129, n. 3, p. 233–239. 1981.

GOTTESMAN, S. The Small RNA Regulators of *Escherichia coli*: Roles and Mechanisms. **Annual Review Microbiology**, v. 58, p.303–28. 2004.

GONÇALVES, A., GOUFO, P., BARROS, A., DOMÍNGUEZ-PERLES, R., TRINDADE, H., ROSA, E.A.S., FERREIRA, L., RODRIGUESA, M. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system: nutritional advantages and constraints. **J Sci Food Agric**. 2016.

GROENEVELD, M., WEME, R. G. J. D. O., DUURKENS, R. H., SLOTBOOM, D. J. Biochemical Characterization of the C4-Dicarboxylate Transporter DctA from *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 11, p. 2900–2907. 2010.

GUEDON, E., VERSTRAETE, I. M. Cysteine metabolism and its regulation in bacteria. **Microbiology Monographs**, v. 5, p. 195-218. 2006.

GUERINOT, M. L. Iron uptake and metabolism in the rhizobia legume symbiosis. **Plant Soil**, v. 130, n. 1, p. 199–209. 1991.

HAYAT, I., AHMAD, A., MASUD, T., AHMED, A., & BASHIR, S. Nutritional and Health Perspectives of Beans (*Phaseolus vulgaris*): An Overview. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.596639>.

HORSBURGH, M. J., WHARTON S. J., KARAVOLOS, M., FOSTER, S. J. Manganese: elemental defence for a life with oxygen. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 496–501. 2002.

HUECK, C. J. Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 2, p. 379–433. 1998.

JAMET, A., SIGAUD, S., van de SYPE, G., PUPPO, A., HEROUART, D. Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 16, n. 3, p. 217–225. 2003.

JENSEN, J. B., AMPOMAH, O. Y., DARRAH, R., PETERS, N. K., BHUVANESWARI, T. V. Role of Trehalose Transport and Utilization in *Sinorhizobium meliloti*-Alfalfa Interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, n. 7, p. 694–702. 2005.

JENSEN, J. B., PETERS, N. K., BHUVANESWARI, T. V. Redundancy in periplasmic binding protein-dependent transport systems for trehalose, sucrose, and maltose in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 11, p. 2978- 2986. 2002.

JIMÉNEZ-ZURDO, J. I., VAN DILLEWIJN, P., SOTO, M. J., DE FELIPE, M. R., OLIVARES, J., TORO, N. Characterization of a *Rhizobium meliloti* proline dehydrogenase mutant altered in nodulation efficiency and competitiveness on alfalfa roots. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 8, n. 4, p. 492-498. 1995.

KALUME, M.K., LOSSON, B., ANGENOT, L., TITS, M., WAUTERS, J.N., FRÉDÉRICH, M., SAEGERMAN, C. Rotenoid content and in vitro acaricidal activity of *Tephrosia vogelii* leaf extract on the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **Veterinary Parasitology**, v. 190, p. 204–209. 2012.

KAMBARA, K., ARDISSONE, S., KOBAYASHI, H., SAAD, M. M., SCHUMPP, O., BROUGHTON, W. J., DEAKIN, W. J. Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 92-106. 2009.

KAMBARA, Kumiko. Regulation and effects of the type-three secretion system of "Rhizobium" species NGR234. Tese de doutorado: Univ. Genève, 2008, no. Sc. 3967.

KANEHISA, M., GOTO, S., SATO, Y., FURUMICHI, M., TANABE, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular datasets. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 109–114. 2012.

KANEKO, T., NAKAMURA, Y., SATO, S., MINAMISAWA, K., UCHIUMI, T., SASAMOTO, S., WATANABE, A., IDESAWA, K., IRIGUCHI, M., KAWASHIMA, K., KOHARA, M., MATSUMOTO, M., SHIMPO, S., TSURUOKA, H., WADA, T., YAMADA, M., TABATA, S. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. **DNA Research**, v. 9, n. 6, p. 189–197. 2002.

KANEKO, T., Y. NAKAMURA, S. SATO, ASAMIZU, E., KATO, T. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **DNA Research**, v. 7. p. 331–338. 2000.

KELLY, D. J., THOMAS, G. H. The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 405-424. 2001.

KERESZT, A., MERGAERT, P., KONDOROSI, E. Bacteroid Development in Legume Nodules: Evolution of Mutual Benefit or of Sacrificial Victims? **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 24, n. 11, p. 1300–1309. 2011.

KERTESZ, M. A. Riding the sulfur cycle-metabolism of sulfonates and sulfate esters in gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 135–175. 2000.

KIM, W. S., KRISHNAN, H. B. A *nopA* deletion mutant of *Sinorhizobium fredii* USDA257, a soybean symbiont, is impaired in nodulation. **Current Microbiology**, v. 68, p. 239–246. 2014.

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, n. 2, p. 335–347. 2004.

KRISHNAN, H. B., LORIO, J., KIM, W.S., JIANG, G., KIM, K.Y., DEBOER, M., PUEPPKE, S. G. Extracellular proteins involved in soybean cultivar specific nodulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 16, p. 617–625. 2003.

KRYSCIAC, D., GROTE, J., ORBEGOSO, M. R., UTPATEL, C., FÖRSTNER, K. U., LI, L., SCHMEISSER, C., KRISHNAN, H. B., STREIT, W. R. RNA Sequencing Analysis of the Broad-Host-Range Strain *Sinorhizobium fredii* NGR234 Identifies a Large Set of Genes Linked to Quorum Sensing-Dependent Regulation in the Background of a *tral* and *ngrI* Deletion Mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 18, p. 5655–5671. 2014.

LE QUÉRÉ, A. J., DEAKIN, W. J., SCHMEISSER, C., CARLSON, R. W., STREIT, W. R., BROUGHTON, W. J., FORSBERG, L. S. Structural characterization of a K-antigen capsular polysaccharide essential for normal symbiotic infection in *Rhizobium sp.* NGR234: deletion of the *rkpMNO* locus prevents synthesis of 5,7-diacetamido-3,5,7,9-tetradeoxy-non-2-ulonic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 39, p. 28981-92. 2006.

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

LI L, JIAO Z, HALE L, WU W, GUO Y. Disruption of gene *pqqA* or *pqqB* reduces plant growth promotion activity and biocontrol of crown gall disease by *Rahnella aquatilis* HX2. **PLoS One**, v. 9, n. 12. 2014.

LI, Y., PARSONS, R., DAY, D. A., BERGERSEN, F. J. Reassessment of major products of N₂ fixation by bacteroids from soybean root nodules. **Microbiology**, v. 148, n. 6, p. 1959–66. 2002.

LI, Y., TIAN, C. F., CHEN, W. F., WANG, L., SUI, X. H., CHEN, W. X. High-Resolution Transcriptomic Analyses of *Sinorhizobium* sp. NGR234 bacteroids in determinate Nodules of *Vigna unguiculata* and Indeterminate Nodules of *Leucaena leucocephala*. **PLoS One**. v 8, n. 8. 2013.

LI, W., HUANG, C., WANG, K., FU, J., CHENG, D., ZHANG, Z. Laboratory evaluation of aqueous leaf extract of *Tephrosia vogelii* against larvae of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and non-target aquatic organisms. **Acta Tropica**, v. 146, p. 36–41. 2015.

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. 10-7. 2003.

LOHSE, M., BOLGER, A. M., NAGEL, A., FERNIE, A. R., LUNN, J. E., STITT, M., USADEL, B. RobiNA: A user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq based transcriptomics. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 622–627. 2012.

LOPEZ-LARA I. M., GAO, J. L., SOTO, M. J., SOLARES, A., P., WEISSENMAYER B, SOHLENKAMP, C., VERROIOS, G.P., THOMAS, J. O., GEIGER, O. Phosphorus-free membrane lipids of *Sinorhizobium meliloti* are not required for the symbiosis with alfalfa but contribute to increased cell yields under phosphorus-limiting conditions of growth. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.18, n. 9, p. 973– 982. 2005.

LORIO, J. C., KIM, W. S., KRISHNAN, H. B. NopB, a soybean cultivar-specificity protein from *Sinorhizobium fredii* USDA257, is a type III secreted protein. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 17, p. 1259–1268. 2004.

MADSEN, L. H., TIRICHINE, L., JURKIEWICZ, A., SULLIVAN, J. T., HECKMANN, A. B., BEK, A. S., RONSON, C. W., JAMES, E. K., STOUGAARD, J. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. **Nature Communications**. 1:10 doi: 10.1038/ncomms1009. 2010.

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

MARIE, C., DEAKIN, W. J., OJANEN-REUHS, T., DIALLO, E., REUHS, B., BROUGHTON, W. J., PERRET, X. 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, n. 9, 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, n. 9, p. 743–751. 2003.

MARTINEZ-BLANCO, H., REGLERO, A., RODRIGUEZ-APARICIO, L. B., LUENGOE, J. M. Purification and Biochemical Characterization of Phenylacetyl-CoA Ligase from *Pseudomonas putida*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 12, p. 7084-7090. 1990.

MATHIS, R., Van GIJSEGEM, F., De RYCKE, R., D'HAENZE, W., Van MAELSAEKE, E., ANTHONIO, E., Van MONTAGU, M., HOLSTERS, M., VEREECKE, D. Lipopolysaccharides as a communication signal for progression of legume endosymbiosis. **PNAS USA**, v.102, n. 7, p. 2655–2660. 2005.

MCCLURE, R.; BALASUBRAMANIAN, D.; SUN, Y.; BOBROVSKYY, M.; SUMBY, P.; GENCO, C. A.; ANDERPOOL, C. K.; TJADEN, B.: Computational analysis of bacterial RNA-Seq data. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 14, p. 140. 2013.

MICHIELS, J., DOMBRECHT, B., VERMEIREN, N., XI, C., LUYTEN, E., VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 193-205. 1998.

MILLER, W.G., LEVEAU, J.H., LINDOW, S.E. Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 11, p. 1243-50. 2000.

MIÑAMBRES, B., MARTÍNEZ-BLANCO, H., OLIVERA, E. R., GARCÍA, B., DÍEZ, B., BARREDO, J. L., MORENO, M. A., SCHLEISSNER, C., SALTO, F., LUENGO, J. M. Molecular Cloning and Expression in Different Microbes of the DNA Encoding *Pseudomonas putida* U Phenylacetyl-CoA Ligase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 52, p. 33531–33538. 1996.

MIRANDA-RÍOS, J., MORERA, C., TABOADA, H., DÁVALOS, A., ENCARNACIÓN, S., *et al.* Expression of thiamin biosynthetic genes (*thiCOGE*) and production of symbiotic terminal oxidase cbb sub(3) in *Rhizobium etli*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 22, p. 6887–6893. 1997.

MISRA, H.S., RAJPUROHIT, Y.S., KHAIRNAR, N.P. Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. **Journal Biosciences**, v. 37, n. 2, p. 313–325. 2012.

MIZUNO, T., CHOU, M., INOUE, M. A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). **PNAS USA**, v. 81, n. 7, p. 1966-1970. 1984.

MORALES, F.J. Common beans. In: Loebenstein G, Carr JP, editors. Natural resistance mechanisms of plants to viruses. **Springer**, p. 367–82. 2006.

MOREIRA, F. M. S., SILVA, K., NÓBREGA, R. S. A., CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n. 2, p. 74-99. 2010.

MORIYA, Y., ITOH, M., OKUDA, S., YOSHIZAWA, A., KANEHISA, M. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p.182-185. 2007.

MORTAZAVI, A., B. A. WILLIAMS, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, n.7, p. 621-628. 2008.

MULLIGAN, C., FISCHER, M., THOMAS, G. H. Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in bacteria and archaea. **FEMS Microbiology Letters**, v. 35, n.1, p. 68–86. 2011.

O'HARA, G. W. Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 41, n. 3, p. 417-433. 2001.

O'NEIL, D., GLOWATZ, H., e SCHLUMPBERGER, M. Ribosomal RNA Depletion for Efficient UNIT 4.19 Use of RNA-Seq Capacity. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 103, n. 4, p. 191-194. 2013.

OKAZAKI, S., TITTABUTR, P., TEULET, A., THOUIN, J., FARDOUX, J., CHAINTREUIL, C., GULLY, D., ARRIGHI, J. F., FURUTA, N., MIWA, H., YASUDA, M., NOUWEN, N., TEAUMROONG, N., GIRAUD, E. *Rhizobium*–legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS. **The ISME Journal**, v. 10, n. 1, p. 64-74. 2016.

OLDROYD, G. E., MURRAY, J. D., POOLE, P. S., DOWNIE, J. A. The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. **Annual Review of Genetics**, v. 45, p. 119-144. 2011.

OLDROYD, G. E.D., DOWNIE, J. A. Calcium, Kinases and Nodulation Signalling in Legumes. **Nature Reviews**, v. 5, n. 7, p. 566-76. 2004.

OVERLÖPER A, KRAUS A, GURSKI R, WRIGHT PR, GEORG J, HESS WR, NARBERHAUS F. Two separate modules of the conserved regulatory RNA AbcR1 address multiple target mRNAs in and outside of the translation initiation region. **RNA Biology**, v. 11, n. 5, p. 624-40. 2014.

PAPA, R., ACOSTA, J., DELGADO-SALINAS, A., GEPTS, P. A genome-wide analysis of differentiation between wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* from Mesoamerica. **Theor. Appl. Genet**, v. 111, n. 6, p. 1147–1158. 2005.

PENG, J., HAO, B., LIU, L., WANG, S., MA, B., *et al.* RNA-Seq and Microarrays Analyses Reveal Global Differential Transcriptomes of *Mesorhizobium huakuii* 7653R between Bacteroids and Free-Living Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4. 2014.

PEPKE, S., WOLD, B., MORTAZAVI, A. Computation for ChIP-seq and RNA-seq studies. **Nature Methods**, v. 6, p. 22-32. 2009.

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

PETERS, J. W., SZILAGYI, R. K. Exploring new frontiers of nitrogenase structure and mechanism. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 101–108. 2006.

PETRY, N., BOY, E., WIRTH, J.P., HURRELL, R.F. Review: The Potential of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) as a Vehicle for Iron Biofortification. **Nutrients**, v. 7, p. 1144-1173. 2015.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 29. 2001.

PLANO, G.V., DAY, J.B., FERRACCI F. Type III export: new uses for an old pathway. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 284–93. 2001.

PLATERO, R. A., JAUREGUY, M., BATTISTONI, F. J., FABIANO, E. R. Mutations in *sitB* and *sitD* genes affect manganese-growth requirements in *Sinorhizobium meliloti*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 218, n.1, p.65–70. 2003.

PORCH, T.G., BLAIR, M.W., LARIGUET, P., GALEANO, C., PANKHURST, C.E., BROUGHTON, W.J. Generation of a Mutant Population for TILLING Common Bean Genotype BAT 93. **J. Amer. Soc. Hort. Sci**, v. 134, n. 3, p. 348–355. 2009.

PUEPPKE, S. G.; BROUGHTON, W. J. *Rhizobium species* strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 4, p.293-318, 1999.

RAMACHANDRAN, V. K., EAST, A. K., KARUNAKARAN, R., DOWNIE, J. A., POOLE, P. S. Adaptation of *Rhizobium leguminosarum* to pea, alfalfa and sugar beet rhizospheres investigated by comparative transcriptomics. **Genome Biology**, v. 12, n. 10. 2011.

RAO, J. R., COOPER, J.E. Rhizobia Catabolize nod Gene-Inducing Flavonoids via C-Ring Fission Mechanisms. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 17, p. 5409-5413. 1994.

RELIC, B., FELLAY, R., LEWIN, A., PERRET, X., PRICE, N.P.J., ROCHEPEAU, P., BROUGHTON, W.J. *nod* genes and Nod factors of *Rhizobium species* NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, n. 6, p. 764-774. 1993.

RESENDIS-ANTONIO, O., HERNANDEZ, M., SALAZAR, E., CONTRERAS, S., BATALLAR, G. M., *et al.* Systems biology of bacterial nitrogen fixation: High-throughput technology and its integrative description with constraint-based modeling. **BMC Systems Biology**, v. 5, n. 120. 2011.

REUHS, B. L., RELIĆ, B., FORSBERG, L. S., MARIE, C., OJANEN-REUHS, T., STEPHENS, S. B., WONG, C. H., JABBOURI, S., BROUGHTON, W. J. Structural Characterization of a Flavonoid-Inducible *Pseudomonas aeruginosa* A-Band-Like O Antigen of *Rhizobium sp.* Strain NGR234, Required for the Formation of Nitrogen-Fixing Nodules. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 18, p. 6479-6487. 2005.

RNASPACE. Disponível em: <http://www.rnaspaces.org/>. Acessado em setembro de 2015.

ROCHE, P., MAILLET, F., PLAZANET, C., DEBELLÉ, F., FERRO, M., TRUCHET, G., PROMÉ, J.-C., DÉNARIÉ, J. The common *nodABC* genes of *Rhizobium meliloti* are host-range determinants. **PNAS USA**, v. 93, n. 26, p. 15305–15310. 1996.

RODELAS, B., GONZALEZ-LOPEZ, J., SALMERON, V., POZO, C., MARTINEZ-TOLEDO, M. V. Enhancement of nodulation, N₂-fixation and growth of faba bean (*Vicia faba* L.) by combined inoculation with *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* and *Azospirillum brasilense*. **Symbiosis**, v.21, p. 175–186. 1996.

RODIONOV, D. A., VITRESCHAK, A. G., MIRONOV, A. A., GELFAND, M. S. Comparative genomics of the vitamin B12 metabolism and regulation in prokaryotes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n.42, p. 41148-41159. 2003.

ROSTAS, K., KONDOROSI, E., HORVATH, B., SIMONCSITS, A., KONDOROSI, A. Conservation and extended promoter regions of nodulation genes in *Rhizobium*. **PNAS USA**, v. 83, n. 6, p. 1757–1761. 1986.

SAAD, M. M., KOBAYASHI, H., MARIE, C., BROWN, I. R., MANSFIELD, J. W., BROUGHTON, W. J., DEAKIN, W. J. NopB, a Type III Secreted Protein of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is associated with pilus-like surface appendages. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 3, p. 1173–1181. 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMTOOLS (2012). <<http://samtools.sourceforge.net>> acessado em set/2015.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **PNAS USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467. 1977.

SANGER. Disponível em: <http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis>. 2012. Acessado setembro de 2015.

SANTOS, R., HEROUART, D., SIGAUD, S., TOUATI, D., PUPPO, A. Oxidative burst in alfalfa *Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 14, n. 1, p. 86–89. 2001.

SARMA, A. D., EMERICH, D. W. A comparative proteomic evaluation of culture grown vs nodule isolated *Bradyrhizobium japonicum*. **Proteomics**, v. 6, n. 10, p. 3008–3028. 2006.

SCHLUTER, J. P., REINKENSMEIER, J., DASCHKEY, S., HACKENBERG, E. E., JANSSEN, S., JANICKE, S., BECKER, J. D., GIEGERICH, R., BECKER, A. A genome-wide survey of sRNAs in the symbiotic nitrogen-fixing alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 245. 2010.

SCHMEISSER, C.; LIESEGANG, H.; KRYSCIAK, D.; BAKKOU, N.; LE QUÉRÉ, A.; WOLLERR, A.; HEINEMEYER, I.; MORGENSTER, B.; POMMERENING-ROSER, A.; FLORES, M.; PALACIOS, R.; BRENNER, S.; GOTTSCHALK, G.; SCHMITZ, R. A.; BROUGHTON, W. J.; PERRET, X.; STRITTMATTER, A. X.; STREIT, W. R. *Rhizobium* sp. Strain NGR234 Possesses a Remarkable Number of Secretion Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 4035-4045. 2009.

SCHWINGHAMER, E. A. Requirement of riboflavin for effective symbiosis of clover by an auxotrophic mutant strain of *Rhizobium trifolii*. **Journal Australian Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 6, p. 1187-96. 1970.

SENA, J. Análise da função dos ativadores transcricionais SyrM1 e SyrM2 de *Rhizobium* sp. NGR234 no processo de nodulação. 2013. Dissertação. Universidade Federal do Paraná, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. 2013.

SIMON, R., PRIEGER, U., PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Biotechnology**, v.1, n. 9, p.784-791. 1983.

SKORPIL, P., SAAD, M.M., BOUKLI, N.M., KOBAYASHI, H., ARES-ORPEL, F., BROUGHTON, W.J., DEAKIN, W.J. NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 5, p.1304–1317. 2005.

SLATNI, T., KROUMA, A., AYDI, S., CHAIFFI, C., GOUIA, H., ABDELLEY, C. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) subjected to iron deficiency. **Plant Soil**, v. 312, p. 49–57. 2008.

STREIT, W. R., JOSEPH, C. M., PHILLIPS, D. A. Biotin and other water-soluble vitamins are key growth-factors for alfalfa root colonization by *Rhizobium meliloti* 1021. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 9, n. 5, p. 330–338. 1996.

STREIT, W.R., SCHMITZ, R.A., PERRET, X., *et al.* An evolutionary hot spot: The pNGR234*b* replicon of *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 2, p. 535–542. 2004.

TAGA, M. E., WALKER, G. C. *Sinorhizobium meliloti* requires a cobalamin-dependent ribonucleotide reductase for symbiosis with its plant host. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 23, p.1643–1654. 2010.

TAMPAKAKI, A., P. Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 114. 2014.

THEUNIS, M.; KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W. J.; PRINSEN, E. Flavonoids, NodD1, NodD2, and Nod-Box NB15 Modulate Expression of the y4wEFG Locus That Is Required for Indole-3-Acetic Acid Synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 10, p. 1153-1161. 2004.

TSUKADA, S., AONO, T., AKIBA, N., LEE, K. B., LIU, C. T., *et al.* Comparative genome-wide transcriptional profiling of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 grown under free-living and symbiotic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5037–5046. 2009.

UDVARDI, M. K.; POOLE, P. S. Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p.781–805. 2013.

Van Der PLOEG, J. R., IWANICKA, N. R., BYKOWSKI, T., HRYNIEWICZ, M. M., LEISINGER, T. The *Escherichia coli* *ssuEADCB* Gene Cluster Is Required for the Utilization of Sulfur from Aliphatic Sulfonates and Is Regulated by the Transcriptional Activator Cbl. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 41, p. 29358–29365. 1999.

Van SLOOTEN, J. C., BHUVANASVARI, T. V., BARDIN, S., STANLEY, J. Two C4-dicarboxylate transport systems in *Rhizobium* sp. NGR234: rhizobial dicarboxylate transport is essential for nitrogen fixation in tropical legume symbioses. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 5, p. 179–186. 1992.

VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A., SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 7, n. 3, p. 1- 12. 2002.

VEDAM, V., HAYNES, J. G., KANNENBERG, E. L., CARLSON, R. W., SHERRIER, D. J. A *Rhizobium leguminosarum* lipopolysaccharide lipid-A mutant induces nitrogen-fixing nodules with delayed and defective bacteroid formation. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 17, n. 13, p. 283–291. 2004.

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, n. 6, p.1381-1389, 1998.

VIPREY, V., PERRET, X., BROUGHTON, W. J. Host-plant invasion by rhizobia. **Subcellular Biochemistry**, v. 33, p. 437–456. 2000a.

VIPREY, V., ROSENTHAL, A., BROUGHTON, W.J., PERRET, X. Genetic snapshots of the *Rhizobium* species NGR234 genome. **Genome Biology**, v. 1, n. 6, p. 1-17. 2000b.

WANG, Z., GERSTEIN, M., SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomes. **Nature Review Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57–63. 2009.

WASSEM, R., KOBAYASHI, H., KAMBARA, K., QUÉRÉ, A. L., WALKER, G. C., BROUGHTON, W. J., DEAKIN, W. J. TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR234 by binding to tts boxes. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 736–748. 2008.

WILMS, I., VOSS, B., HESS, W.R., LEICHERT, L.I., NARBERHAUS, F. Small RNA-mediated control of the *Agrobacterium tumefaciens* GABA binding protein. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 492-506. 2011.

XIN, D. W., LIAO, S., XIE, Z. P., HANN, D. R., STEINLE, L., BOLLER, T., STAEHELIN, C. Functional analysis of NopM, a novel E3 ubiquitin ligase (NEL) domain effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 5. 2012.

YURGEL, S. N., KAHN, M. L. Dicarboxylate transport by rhizobia. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 489–501. 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DE *S. fredii* NGR234 QUANDO INOCULADO EM *Phaseolus vulgaris* e *Tephrosia vogelii*. 113

APÊNDICE 2- GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DE *S. fredii* NGR234 QUANDO INOCULADO EM *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*..... 119

APÊNDICE 3 - GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DE *S. fredii* NGR234 QUANDO INOCULADO EM *Tephrosia vogelii* e *Vigna unguiculata*. 127

APÊNDICE 1 - GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DE *S. fredii* NGR234 QUANDO INOCULADO EM *Phaseolus vulgaris* e *Tephrosia vogelii*.

NOTA: Na coluna *Fold Change*, os valores presentes nas células pretas representam os genes mais expressos em *T. vogelii*, e nas brancas, os mais expressos em *P. vulgaris*.

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM PHA1	RPKM PHA2	RPKM PHA3	RPKM TEP1	RPKM TEP2
NGR_a01800		0,000872	2,03284	2322,673	3357,114	2654,496	5407,651	4896,175
NGR_b00600		0,019118	2,07162	1186,202	1575,817	1441,44	835,7237	531,2966
NGR_b01440		3,02E-09	5,308068	117750,3	92956,17	102653	19433,44	20561,36
NGR_b02510		5,81E-16	6,440002	196,1834	134,2593	144,7408	920,3054	1157,687
NGR_b02620		1,16E-07	3,549314	1401,854	1484,021	1152,774	415,3826	354,4126
NGR_b02900	<i>thiE</i>	3,88E-24	26,64873	67,01314	22,93042	65,92156	1337,71	1482,929
NGR_b02910	<i>thiG</i>	6,95E-23	16,10265	52,46765	125,6729	51,61301	1152,089	1335,835
NGR_b02920		1,13E-26	11,73669	117,9665	60,54831	130,5505	1221,571	1235,062
NGR_b02930	<i>thiC</i>	2,36E-34	13,86774	166,1619	106,133	70,83061	1448,383	1797,637
NGR_b03210		4,31E-30	23,43527	93,35623	255,5556	22,95889	3074,887	2798,925
NGR_b03220		2,49E-14	8,046057	46,04304	69,32163	63,41026	551,4639	416,3178
NGR_b03230		3,43E-10	5,47847	120,2495	105,8059	59,14536	514,3731	547,731
NGR_b03240		1,60E-44	18,85253	280,8434	211,4166	221,015	4709,182	4410,478
NGR_b03250		4,41E-60	39,99883	298,7716	283,107	113,0404	9278,685	9630,145
NGR_b03260	<i>pqqA</i>	5,06E-56	26,35911	1510,288	1263,258	660,3052	28138,33	33460,98
NGR_b03270	<i>pqqB</i>	6,89E-60	30,00538	311,6993	60,94665	120,4586	5022,131	5149,338
NGR_b03280	<i>pqqC</i>	6,60E-18	14,36034	185,0714	72,37415	143,0446	1662,47	2252,173
NGR_b03290	<i>pqqD</i>	1,51E-15	34,87368	0	47,26475	101,9094	1930,124	1511,891
NGR_b03300	<i>pqqE</i>	1,86E-33	19,68429	108,2932	86,46298	8,877437	1387,116	1357,108
NGR_b03480		1,09E-06	59,05671	29,42751	40,27779	0	1821,03	980,2999
NGR_b09010		0,009413	2,568249	1389,924	1240,7	1486,178	422,2146	661,4524
NGR_b09060		2,10E-05	3,290242	1645,511	1529,817	1168,218	495,8116	398,9294
NGR_b09580		0,000275	2,112838	5452,263	6754,921	7698,402	3190,066	3153,882
NGR_b09900		0,00026	2,768753	393,9238	196,0612	334,6653	750,6037	988,4505
NGR_b11170		2,21E-09	3,801673	2113,188	1676,722	1867,877	672,4865	335,2157
NGR_b11180		8,73E-25	16,39266	24204,13	29251,74	21023,6	1652,144	1417,934
NGR_b11200		8,50E-05	2,3806	465,5463	441,1377	546,0328	1108,034	1227,042
NGR_b11490		3,66E-06	3,169621	1568,818	1717,808	2270,801	626,3315	554,6068
NGR_b11690		0,004748	2,105533	292,6844	400,6007	494,8571	785,0909	896,6527
NGR_b11710		0,004461	2,194084	283,9857	404,8903	465,5998	779,473	923,4993
NGR_b11720		5,34E-16	4,427156	831,198	961,6027	827,3927	4009,804	3823,743
NGR_b12470	<i>kdpB</i>	0,027421	2,20207	904,3885	958,3336	703,116	2310,048	1513,308
NGR_b12770		0,034455	2,641517	265,4246	454,1123	228,4635	993,446	694,7223
NGR_b13280		8,06E-05	3,67196	1346,759	2103,281	1919,293	310,1985	673,7776
NGR_b13310		1,74E-06	3,431454	576,313	853,0118	903,1254	227,4106	229,6148
NGR_b13320		9,39E-06	3,378034	948,8309	1284,247	1524,513	336,7194	411,4031
NGR_b13330		3,50E-05	3,937931	5333,98	8266,949	9248,555	1946,102	1951,789
NGR_b13340	<i>phcN</i>	2,21E-09	4,923744	1204,329	1483,541	1623,055	120,2034	469,9658

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM PHA1	RPKM PHA2	RPKM PHA3	RPKM TEP1	RPKM TEP2
NGR_b13670		0,00014	2,448633	400,0193	361,3575	566,6449	1133,891	1058,433
NGR_b13810		8,91E-05	3,137003	38801,42	44762,97	29799,62	14167,26	10275,86
NGR_b14080		5,75E-23	13,70645	30,01475	71,89273	88,57753	838,8121	907,0181
NGR_b14090		3,93E-15	12,72609	30,08145	123,5185	73,97864	990,7968	944,8224
NGR_b14100		2,30E-70	79,4836	119,5817	106,3874	158,8057	9667,669	10966,15
NGR_b14110		2,24E-18	8,621294	373,0574	291,7761	419,4065	3351,12	2967,364
NGR_b14380		0,00025	2,431341	6462,312	8931,278	8216,351	3233,984	3306,65
NGR_b14390		0,016311	2,452453	1050,982	1208,334	1199,281	251,7553	700,2142
NGR_b14470		0,001096	2,479532	1014,147	1041,056	1160,284	330,07	545,5741
NGR_b14480		3,81E-06	4,302721	3335,118	5168,983	5596,645	1174,858	1026,981
NGR_b14520		0,001318	2,602887	839,4824	1292,636	1445,164	523,677	399,5021
NGR_b18230		0,000997	2,196587	1138,404	1515,652	1415,096	578,4469	669,8074
NGR_b18290	<i>exoU1</i>	0,000182	2,375424	752,0363	853,2531	924,733	454,3127	263,7064
NGR_b18340	<i>exoZ2</i>	0,000614	2,109285	1432,206	1248,886	1658,838	806,963	582,6356
NGR_b18620		0,009176	2,040112	1862,842	1529,817	2290,623	1053,6	827,4091
NGR_b18840		0,010552	2,269295	1066,073	1051,944	902,3768	346,4325	554,5286
NGR_b18850		0,000701	2,764947	4626,935	4893,637	3385,463	1450,319	1710,58
NGR_b18970		6,72E-12	4,451728	356,2277	365,6799	253,0848	1264,175	1676,419
NGR_b19330		0,012297	4,251132	20443,11	23821,43	11413,85	5652,505	3220,985
NGR_b20620	TRAP	8,31E-06	2,752774	365,2748	573,479	433,3035	1265,303	1278,169
NGR_b20630	TRAP	0,131047	1,935285	206,3514	338,9228	365,3823	535,4916	648,1251
NGR_b20640	TRAP	0,005507	2,409465	240,7705	173,9268	236,8486	413,8704	649,2895
NGR_b20640		0,005507	2,409465	240,7705	173,9268	236,8486	413,8704	649,2895
NGR_b20650		2,87E-07	11,13112	15382,56	29391,8	27056,01	2456,521	1874,028
NGR_b20660		2,93E-09	4,059012	1660,63	2272,925	1720,21	627,8284	311,322
NGR_b20820	<i>cah</i>	6,71E-33	12,68734	162,4398	389,0834	266,3231	3674,956	3285,405
NGR_b21320		0,000846	2,1968	818,3018	892,219	757,2199	429,1361	330,019
NGR_b21330	<i>wcaK</i>	5,25E-07	2,939423	1495,679	1209,682	1330,129	512,6891	417,0026
NGR_b22770		2,46E-16	5,202182	242,2065	221,0073	284,5898	1275,877	1351,149
NGR_b22780		5,06E-12	9,431829	228,1459	104,0887	336,6444	2125,305	2135,26
NGR_b23010		1,55E-05	3,309547	1815,734	2770,26	2928,914	785,9687	740,2072
NGR_b23070		1,33E-05	2,613954	1535,671	1440,185	1594,582	4257,626	3816,462
NGR_b23090		6,76E-08	3,497926	4781,97	4518,664	4966,419	17053,8	16673,85
NGR_b23100	<i>thuA</i>	2,34E-10	3,645193	3590,83	3394,403	3672,108	12711,56	13547,81
NGR_b23110	<i>thuK</i>	1,27E-09	3,471818	4571,589	3453,644	3523,72	12207,19	14993,59
NGR_b23120	<i>thuG</i>	2,38E-14	4,214897	949,5135	866,4071	1293,296	4446,922	4391,199
NGR_b23130	<i>thuF</i>	5,34E-16	4,208061	1337,207	1027,757	1062,459	4640,51	5139,87
NGR_b23140	<i>thuE</i>	0,000446	2,544131	10594,6	9175,873	9773,615	23684,13	27190,93
NGR_c00040		0,047131	2,16843	38,43707	55,72095	70,53202	158,1996	162,5186
NGR_c00290		0,001467	2,952206	298,653	448,4375	600,2821	200,1021	208,6563
NGR_c00430		0,034909	2,048221	124,4787	166,5716	169,6822	89,4545	114,761
NGR_c00740	<i>argB</i>	0,001263	2,177551	205,582	228,4733	243,6095	138,6325	144,2266
NGR_c00790		0,017971	2,935777	40,10979	15,33517	72,55002	133,6396	198,919

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM PHA1	RPKM PHA2	RPKM PHA3	RPKM TEP1	RPKM TEP2
NGR_c00940		0,022666	2,020837	159,7293	128,2454	200,985	93,91643	124,9168
NGR_c02140		0,032418	4,440582	105,2443	140,8332	104,2866	57,75541	14,05236
NGR_c02200	<i>trnT2</i>	0,011711	37,05578	13160,6	35856,69	14239,99	1018,805	550,8527
NGR_c03370	<i>trnH</i>	0,030578	3,848292	1808,289	2688,633	1504,256	661,562	777,9899
NGR_c03790		0,000257	2,085229	168,5659	204,5397	231,2024	529,158	612,2704
NGR_c03800		0,000791	2,544913	155,4156	106,3483	175,0015	77,53466	77,81737
NGR_c04320		0,142971	2,851697	1738,525	765,8871	2133,487	712,8637	748,5545
NGR_c04330		2,52E-05	2,684952	561,4374	638,4764	584,5694	302,6886	304,1665
NGR_c04390		0,00059	2,400431	121,0949	176,013	199,9883	97,38918	89,20691
NGR_c05640		0,026513	2,138436	198,3451	339,7329	318,8319	239,4628	121,8232
NGR_c05680	<i>trnQ2</i>	0,031493	8,557812	6188,368	15651,07	7926,247	2320,612	853,8216
NGR_c05860		0,000853	2,041244	487,7137	759,6258	651,4097	1809,893	1713,408
NGR_c05870		0,020044	2,461699	62,78054	66,0079	39,49793	221,4794	161,6633
NGR_c07370		0,001409	2,034189	216,7677	233,9263	267,5315	177,4755	142,3814
NGR_c07470		0,000152	2,677216	51,33638	84,30873	59,09051	236,9017	239,9075
NGR_c07730		0,000386	2,440024	928,2552	770,5922	1154,492	495,2526	562,3287
NGR_c08030		0,00591	2,008525	92,64024	132,2314	132,596	73,43353	87,9605
NGR_c08130	<i>trnS1</i>	3,82E-09	4,153509	14783,32	21047,52	18869,31	7782,542	4154,347
NGR_c08250		1,15E-23	9,419928	4428,93	4302,868	5154,577	610,3954	729,0697
NGR_c08250		0,008722	8,702582	4428,93	4302,868	5154,577	610,3954	729,0697
NGR_c08260		3,98E-13	4,310234	961,9738	938,9104	1173,782	367,3577	278,0747
NGR_c08270	<i>acpS</i>	0,066341	1,739594	154,7092	211,9539	259,5578	161,7152	162,3048
NGR_c08370	<i>ugdH</i>	0,000554	2,154321	562,793	575,0688	731,1175	410,2876	374,1522
NGR_c08440		0,000469	2,812503	1358,723	1761,363	2004,239	713,8586	934,9239
NGR_c08480		0,010969	2,03136	57,2997	43,33852	87,77318	181,1483	161,3306
NGR_c08790		2,52E-05	2,191862	222,0886	166,2243	192,7146	547,4117	618,2014
NGR_c08810		3,50E-05	2,954434	151,6757	81,18618	139,1624	527,1597	472,5452
NGR_c09220		0,003885	2,147554	2382,376	3440,693	2828,251	1979,682	1690,704
NGR_c09380		0,017622	3,603775	204,9128	415,8776	462,4985	103,08	167,2014
NGR_c09490		0,024484	2,086428	267,3986	396,1585	299,6631	248,9365	172,1415
NGR_c09610		0,002136	2,296683	511,2896	513,1383	436,756	278,1639	306,0293
NGR_c10390		5,44E-14	7,146575	195,8523	198,9172	309,4881	40,59448	47,97385
NGR_c10580	<i>nuo1</i>	0,000466	2,193046	144,6468	197,7676	162,7182	474,5452	537,4172
NGR_c10590	<i>nuoJ</i>	0,025728	2,088359	50,31193	67,32513	63,70246	179,4644	164,584
NGR_c12650		0,019118	2,017828	61,5758	48,06545	50,84622	112,6374	184,9878
NGR_c13080		0,004596	2,116381	99,41153	87,2996	95,77059	255,7243	290,3591
NGR_c13600	<i>exoR</i>	0,000138	2,447418	249,2217	261,667	240,6217	152,5473	127,9862
NGR_c13890		1,46E-07	5,019586	34959,66	29961,94	38448,21	8637,882	10081,84
NGR_c14440	<i>lrnK1</i>	0,024516	24,18629	1180,675	2805,73	1075,799	111,7111	81,54069
NGR_c14810		0,00231	2,626491	169,0811	113,1283	307,1612	719,1022	654,7019
NGR_c14820		0,016455	3,582542	14,12869	47,26593	62,22277	193,8367	198,0806
NGR_c14930		4,93E-06	2,436545	160,3777	98,05462	170,487	477,9918	468,8893
NGR_c14990		0,000261	3,319127	393,5585	399,5215	403,4246	130,3296	199,3217

Nome - <i>locus_tag</i>	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM PHA1	RPKM PHA2	RPKM PHA3	RPKM TEP1	RPKM TEP2
NGR_c15000		0,001568	2,345365	100,3302	118,1464	172,3232	77,08212	72,3396
NGR_c15080	<i>trnA1</i>	0,003893	5,457585	5048,405	5693,181	3137,747	1508,1	842,5871
NGR_c15490	<i>gcvT</i>	2,52E-05	2,46956	128,1101	148,1861	182,8858	92,34786	75,37984
NGR_c15530		0,005239	2,736761	26,11126	48,04372	43,12274	125,3804	165,6044
NGR_c15620		0,006488	3,609418	705,0039	1310,283	1034,946	376,1413	392,221
NGR_c15630		4,17E-05	3,11552	31285,64	41379,39	36926,91	15879,53	16168,55
NGR_c15650		0,008867	2,164584	82,78753	108,4745	81,65438	312,3428	227,9867
NGR_c16510		4,50E-07	3,90979	102,5181	112,2423	140,2355	42,62071	39,40587
NGR_c16710	<i>fbcC</i>	0,058361	1,617955	316,8106	327,377	401,1298	816,1648	714,4164
NGR_c16720	<i>fbcB</i>	7,82E-05	2,18065	318,8386	297,3658	320,4582	858,2833	1006,241
NGR_c16730	<i>fbcF3</i>	0,003995	1,872029	379,425	418,3402	508,9452	1099,747	1113,122
NGR_c16870		1,64E-05	2,453779	489,9124	707,3346	705,6729	343,6447	359,0379
NGR_c17320	<i>dgkA</i>	0,011141	2,215768	57,88439	52,81244	89,80237	194,9245	203,7593
NGR_c17450		7,13E-07	2,822704	247,1312	342,5104	305,4088	148,7661	139,7334
NGR_c17580		0,001073	2,129615	795,6473	621,0743	965,2307	586,2174	422,9761
NGR_c17750	<i>dctP</i>	4,86E-09	3,547025	505,9144	523,6399	598,5569	2553,916	2690,818
NGR_c18200	<i>cobW</i>	1,78E-07	2,825354	84,25477	48,59736	65,57491	227,1984	287,0641
NGR_c18290		0,000975	3,389041	163,6207	115,3396	143,152	40,0852	74,12323
NGR_c18580		9,88E-05	4,90676	116,5924	102,0122	148,1172	49,21765	17,96259
NGR_c19210		0,001475	2,614974	40,92836	41,07634	54,07455	168,4533	153,0146
NGR_c19550		0,000973	3,508983	246,0207	419,9585	480,9658	129,8172	164,2451
NGR_c19800		0,023017	2,145199	153,612	154,1674	163,0865	90,31963	109,8775
NGR_c19840		0,017136	2,185202	512,3702	854,8119	633,7188	2282,27	1701,424
NGR_c19850	<i>asr</i>	5,38E-12	4,203907	713,3813	621,0743	634,0241	235,8346	192,2246
NGR_c19860		0,012195	4,334039	238,0141	336,1941	262,0536	36,28225	141,2443
NGR_c19870		0,034877	3,102184	152,7992	81,78756	134,5855	52,40769	56,10536
NGR_c20140		0,000448	5,433312	791,5354	842,5426	534,7721	263,2572	104,0855
NGR_c20820		0,001551	4,844311	1266,267	1298,175	2563,455	504,3591	436,3189
NGR_c20890		0,013388	2,333233	65000,53	82544,49	83819,71	48623,39	41298,82
NGR_c21170		0,048285	2,362631	92421,25	90232,63	78995,99	45703,32	56017,77
NGR_c21260		0,000701	3,64182	142,0924	195,059	289,9603	70,58233	83,41296
NGR_c21270		0,003315	3,430984	100,4012	128,2454	211,0343	56,34986	57,88828
NGR_c21380		0,002208	3,989152	109,5286	134,3524	160,788	25,04438	67,02853
NGR_c21430		0,012029	2,019696	51,29973	52,38847	86,20785	174,0978	169,4377
NGR_c21540	<i>ribH1</i>	2,81E-05	2,844607	326,3907	336,3061	344,9819	170,1591	152,5304
NGR_c21690		0,023679	3,665626	151,9108	87,37479	112,9697	40,21985	48,03948
NGR_c21910	<i>cbtB</i>	7,13E-05	3,005783	174,8126	152,0521	279,0797	791,4449	840,2837
NGR_c21920	<i>cbtA</i>	5,33E-17	6,861993	31,37322	34,11054	49,65401	333,5759	377,0094
NGR_c22020		0,000906	12,41177	857,2631	618,3857	464,5495	73,50689	71,53931
NGR_c22520		0,000898	2,377995	55,2014	68,03631	97,56267	255,1	215,298
NGR_c22600		0,003592	2,116422	1192,796	1374,897	1174,573	772,3133	846,2526
NGR_c22780		0,001419	2,461336	602,9692	520,2161	559,0476	348,3096	275,4263
NGR_c22900		0,000872	2,151076	444,6731	458,6776	448,7864	313,5047	259,7584

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM PHA1	RPKM PHA2	RPKM PHA3	RPKM TEP1	RPKM TEP2
NGR_c23150		8,73E-11	3,748658	43,06021	48,01767	58,69722	250,3691	257,3566
NGR_c24100	<i>ilvD3</i>	6,17E-08	3,365167	177,8267	138,2431	169,6822	62,73433	68,96965
NGR_c24110		6,96E-06	2,829025	228,7193	249,7579	228,0634	94,72854	133,9678
NGR_c24120	<i>gguC</i>	0,012658	2,176755	89,94721	106,3209	113,8867	53,47412	76,0625
NGR_c24250	<i>trnR3</i>	0,006633	12,54851	13943,92	23552,43	10153,73	1984,686	1529,153
NGR_c24710		2,27E-09	3,884504	40,1441	28,92562	50,99845	177,9351	243,2658
NGR_c25170		5,87E-05	2,412121	110,811	96,95375	114,9643	339,134	369,8907
NGR_c25580		8,49E-09	3,323241	59,74542	86,26032	109,0558	327,8676	434,5522
NGR_c25590		1,34E-07	3,37173	202,8973	328,072	344,3928	1275,826	1388,42
NGR_c25610		1,82E-36	11,54055	27,53209	59,51431	48,96689	706,051	715,4298
NGR_c25620	<i>ssuB</i>	2,56E-29	8,016854	96,69325	52,71464	47,31523	727,1567	738,7737
NGR_c25630		8,43E-24	11,38588	22,18053	24,73414	18,31557	344,8764	338,113
NGR_c25640	<i>ssuD</i>	5,68E-20	8,645125	13,22301	24,77219	23,29365	221,3217	257,7708
NGR_c25650		2,57E-16	6,769218	16,06534	42,9958	21,22552	220,4062	278,8584
NGR_c26130	<i>paaN</i>	3,39E-10	5,802626	13,53142	22,13093	27,31316	185,6424	141,5274
NGR_c26160	<i>paaJ</i>	0,011808	5,287735	47,42044	39,65992	16,3156	333,4213	178,0774
NGR_c26170	<i>paaI</i>	1,09E-09	4,934771	27,55634	28,97293	32,50665	189,0277	210,2491
NGR_c26180	<i>paaB</i>	7,86E-09	10,09678	10,85679	36,32013	11,95332	297,8963	253,6821
NGR_c26190	<i>paaA</i>	4,79E-11	3,936165	55,41822	47,3788	50,84622	249,2103	304,2022
NGR_c26200		7,59E-05	2,707703	267,1238	119,1509	187,8993	631,1545	797,5475
NGR_c26560		0,006117	2,007864	1148,677	895,4917	1230,512	719,335	762,2585
NGR_c26760		0,003565	2,185364	78,27548	64,69524	124,2025	246,3629	276,6559
NGR_c26800	<i>trnL4</i>	0,008382	9,206007	3382,015	5753,363	2614,442	839,1324	336,2763
NGR_c26970		0,000262	2,255965	171,5048	240,5792	226,5922	116,8355	140,5559
NGR_c27490		0,00102	7,230244	496,1139	253,3214	517,4729	71,64595	87,16023
NGR_c27530	<i>trnM3</i>	0,008828	13,18402	9845,13	12071,96	4601,252	992,343	885,2989
NGR_c27870	<i>sqdB</i>	0,009902	3,162573	106,4338	118,6874	210,6516	48,67348	74,43955
NGR_c28410		0,00197	2,103983	64,08666	53,59864	73,86688	197,8263	167,1276
NGR_c28770	<i>trnV2</i>	0,035608	6,021206	25619,84	43199,17	18600,56	8942,848	4461,906
NGR_c28780		3,42E-08	2,803093	274,1682	292,6299	215,6137	1020,955	997,9846
NGR_c28790		3,50E-05	12,29898	202,5954	221,8122	233,1965	0	49,18327
NGR_c29860	<i>modC</i>	0,001421	4,401958	104,2983	189,9665	223,2854	43,72214	61,89356
NGR_c29950		0,001108	3,165131	62,94897	42,11771	58,64423	179,3672	294,176
NGR_c29960		5,59E-06	2,502679	88,2314	116,0316	97,14277	325,577	363,579
NGR_c29970		1,07E-06	3,289009	42,6784	35,69392	46,98892	165,8974	208,9441
NGR_c29980	<i>hmgA</i>	1,33E-19	12,55047	18,17435	57,76021	43,7718	579,7168	779,5657
NGR_c30010		8,66E-35	11,69313	163,1428	83,25393	156,7872	1965,078	2320,448
NGR_c30490	<i>trnR4</i>	0,024068	8,8762	6791,131	6560,265	2698,812	992,343	697,5082
NGR_c31020		1,38E-05	2,793793	939,1838	806,6197	953,1982	384,2074	497,0442
NGR_c31030		1,07E-05	2,553586	545,641	487,5099	578,7721	292,1306	282,0899
NGR_c31040		0,000989	2,540604	147,3421	153,886	180,0287	69,02476	103,1649
NGR_c31050		0,008867	2,425295	90,79178	58,31684	95,96328	59,78905	31,51886
NGR_c31180		0,00032	2,494148	189,3708	242,0945	256,8984	92,78738	158,0315

Nome - <i>locus_tag</i>	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM PHA1	RPKM PHA2	RPKM PHA3	RPKM TEP1	RPKM TEP2
NGR_c31940	<i>trnG3</i>	0,001128	8,331851	67205,67	79525,11	39903,77	15508,48	5178,015
NGR_c31990		1,31E-12	6,458106	93,22221	115,4561	144,1295	16,32701	33,10413
NGR_c32610	<i>tbpA</i>	1,42E-15	7,542915	12,02793	20,11902	28,14084	177,3916	228,8528
NGR_c32920		3,96E-06	2,829572	252,6571	273,2542	415,3579	170,9405	127,0843
NGR_c33480		0,022215	2,966886	17,18991	23,00275	75,70437	141,5008	156,84
NGR_c33730		0,000973	2,236976	575,1542	699,8249	773,5205	1994,328	2158,046
NGR_c33960		0,002066	2,921347	32,63907	61,14655	68,27767	232,8493	191,7525
NGR_c34270	<i>trnM5</i>	0,011711	7,384442	1084,974	1935,816	951,2205	385,9112	107,309
NGR_c35090		0,002661	2,922944	20396,63	15089,33	27070,65	8573,925	10717,14
NGR_c35810	<i>trnA5</i>	0,011296	7,64781	88713,51	147614,1	67775,33	24855,73	11796,22
NGR_c36170		0,003714	2,490697	198,1032	147,2737	276,9672	133,7355	90,2693
NGR_c36620		0,00054	2,777286	222,7812	204,2644	277,078	124,5207	104,662
NGR_c36780		4,99E-05	4,991028	483,5407	812,7993	992,6364	209,1466	201,9581
NGR_c36790		0,000103	4,66452	157,5329	204,8372	320,7073	65,24531	65,4832
NGR_c36800		0,009564	5,351872	69,73843	164,5393	204,0785	55,39176	17,15289
NGR_c36810	<i>ugpC</i>	0,00535	5,449224	103,1395	210,6568	267,4556	40,96075	54,36046
NGR_c36820		0,000373	7,758679	77,27061	80,92173	157,2037	13,82744	22,42885
NGR_c36850	<i>cysK1</i>	1,83E-07	3,136464	36,53441	82,73469	68,07205	250,6144	281,4302

APÊNDICE 2- GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DE *S. fredii* NGR234 QUANDO INOCULADO EM *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*.

NOTA: Na coluna *Fold Change*, os valores presentes nas células pretas representam os genes mais expressos em *V. unguiculata*, e nas brancas, os mais expressos em *P. vulgaris*.

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM PHA1	RPKM PHA2	RPKM PHA3	RPKM VIG1	RPKM VIG2	RPKM VIG3
NGR_a00300		0,0002779	2,14662297	2084,3738	1898,9735	1991,7637	2286,2762	2484,7587	2239,5839
NGR_a00470	<i>syrm2</i>	0,0005877	5,83307769	1067,8955	682,19427	654,68408	135,11236	61,662211	40,486022
NGR_a00570	<i>nopP</i>	1,53E-20	22,4021669	3991,2595	2845,4682	3431,5899	105,55653	77,077764	72,296468
NGR_a00620	<i>rhcQ-pA</i>	1,56E-06	4,76424043	384,3234	353,64887	390,7784	39,987989	23,359501	65,731385
NGR_a00630		1,93E-07	3,93397316	1075,0546	1173,0291	1222,6343	208,51837	93,699002	186,75914
NGR_a00640	<i>rhcN-pA</i>	1,75E-15	5,95489238	1791,3238	1442,2356	1539,4594	171,50601	111,31939	160,9716
NGR_a00650	<i>rhcL</i>	1,21E-11	5,88813162	2154,1854	1880,8015	1664,6786	219,80001	140,43642	178,76945
NGR_a00660	<i>nolU</i>	2,45E-06	6,54210907	852,31097	653,36916	597,16321	53,918077	39,371177	83,090025
NGR_a00670	<i>rhcJ</i>	4,12E-11	8,62487717	1527,4588	1414,4079	1206,1667	79,203796	14,458725	169,52275
NGR_a00680	<i>nopB</i>	3,44E-12	6,19894146	1232,2867	1420,5308	1768,4972	191,40917	50,82461	154,93352
NGR_a00690	<i>rhcC1-pA</i>	0,0032845	4,00687746	506,87911	306,0757	747,93384	36,65282	35,685365	41,839658
NGR_a00700	<i>nopX</i>	1,53E-13	9,39883754	4421,481	3165,4103	3618,8567	274,12872	175,58754	214,10411
NGR_a00710		4,09E-11	7,70972979	1054,1162	945,11125	1037,8402	55,570405	81,155426	76,121184
NGR_a00720		9,63E-13	10,2468007	634,20869	479,77809	535,01943	37,613156	9,1550881	42,935894
NGR_a00730		3,97E-27	12,0495546	2521,1207	2296,639	2442,2297	102,23635	74,653359	151,71532
NGR_a00740		3,00E-09	12,2132589	2417,3782	1490,6228	1998,5093	136,00125	44,137162	93,148291
NGR_a00750		1,23E-23	16,0888602	1229,5229	919,94334	1141,9427	45,646067	33,330925	34,389671
NGR_a00760		2,33E-13	11,9966742	412,39224	313,48134	392,57952	21,267686	20,706323	9,710933
NGR_a00770	<i>nopL</i>	1,48E-07	4,54608198	524,81237	446,53486	557,29534	59,286027	37,106463	87,011678
NGR_a00810	<i>nodD2</i>	2,27E-09	4,30887989	893,21101	741,0417	872,5137	128,42149	80,377578	113,08738
NGR_a00900		0,0001549	2,79492487	16579,078	16300,853	20328,216	25608,014	29659,523	25448,357
NGR_a01100	<i>nifE</i>	0,0016333	2,57997513	15516,93	16791,096	17741,769	24754,174	22306,584	23550,087
NGR_a01160		0,00087	2,09667914	1243,44	1460,463	1785,1138	2032,0837	1627,4319	1499,541
NGR_a01170		0,0020055	2,11420294	2152,2598	2423,8877	2253,6457	2684,3407	2808,8251	2402,4029
NGR_a01180	<i>dctA1-pA</i>	4,35E-05	3,1037583	7002,857	6874,9825	7645,0803	11922,328	12753,455	11740,374
NGR_a01190	<i>nifQ</i>	0,0013851	2,43503781	16613,865	17185,887	17045,269	22384,93	23034,439	22209,976
NGR_a01550		0,0125267	2,42890534	405,8003	545,75542	528,1485	202,66854	73,994653	69,404609
NGR_a01660		0,0008234	2,73770677	16150,256	19148,318	19210,357	26956,319	28380,719	25937,484
NGR_a01730		8,69E-05	2,33595399	1216,2436	1521,4506	1469,6989	1973,0231	1652,4258	1758,1931
NGR_a01790		2,86E-05	3,46714633	19253,331	19088,847	16042,005	32451,647	35645,135	35059,712
NGR_a01800		9,93E-06	2,62479921	2322,6727	3357,1139	2654,4964	3821,1464	4439,6792	3643,742
NGR_a01900	<i>bxrH</i>	3,40E-07	3,42316147	4985,4718	4547,0834	4713,4965	8674,8745	9168,2468	8816,0126
NGR_a01910	<i>y4qG</i>	2,53E-05	3,40962484	8466,5801	7384,4271	9111,0027	14541,129	18453,069	13301,004
NGR_a01920	<i>bxrF</i>	0,0001926	2,99561217	8035,9491	8514,6595	8398,7853	14606,675	13734,257	12642,67
NGR_a01940		9,99E-10	4,93405651	8299,0737	8909,1201	8329,5665	23707,393	23617,885	21679,261
NGR_a02080		0,0002266	3,68252622	675,506	624,57933	522,00724	83,463302	73,13425	114,3293
NGR_a02290	<i>y4nM</i>	0,0002105	2,35403283	1980,4608	1789,8311	2123,7886	2571,2509	2473,6446	2537,0047

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM PHA1	RPKM PHA2	RPKM PHA3	RPKM VIG1	RPKM VIG2	RPKM VIG3
NGR_a02300		0,0067862	2,01721352	701,75991	868,55812	812,13311	1254,6148	622,4947	804,21214
NGR_a02390	<i>nodS</i>	0,0002462	7,15348184	1489,1483	911,35727	930,953	79,386293	77,290882	99,682503
NGR_a02400	<i>nodU</i>	1,75E-21	8,0745878	1084,7068	956,52359	1057,3993	46,225829	82,510436	77,39214
NGR_a02570		0,0184007	2,14428728	36734,677	42652,597	42363,346	49233,768	48201,618	45168,821
NGR_a02780		0,0290119	2,02921816	1320,3072	998,81075	977,77492	1109,3032	1524,7383	1027,9243
NGR_a03290		3,34E-06	3,71471309	8543,1641	8259,9824	7710,6295	15776,1	16961,851	17021,925
NGR_a03300		5,49E-05	2,37758418	2734,922	2737,4813	2939,3979	3629,3168	3448,8128	3839,2867
NGR_a03350		0,0351708	2,62648145	657,3081	378,85925	451,50626	99,004745	144,58725	67,809101
NGR_a03460	<i>nolO</i>	0,0006673	2,3452798	88,619665	90,971108	114,41868	80,68105	107,37133	131,8697
NGR_a03500		4,12E-05	2,51855589	520,04287	445,07192	540,6989	119,63073	141,95155	66,572997
NGR_a03530	<i>fixF</i>	7,30E-07	7,40191051	1576,6696	963,28646	1225,3569	92,617342	104,04542	82,952572
NGR_a03550	<i>wbgA</i>	2,02E-09	12,1694411	1005,4647	638,55593	799,59845	37,861155	23,038628	49,701835
NGR_a03560	<i>rmlA</i>	1,39E-08	73,4237689	822,31676	442,36914	664,78622	0	0	13,703581
NGR_a03570	<i>rmlD</i>	0,0003838	8,27883925	562,35306	353,48858	314,90336	9,66713	56,471789	13,242181
NGR_a03580	<i>rmlB</i>	9,80E-09	17,1712954	806,85439	493,87224	655,48345	16,359758	11,945955	33,614768
NGR_a03860	<i>nolL</i>	3,69E-08	4,52057128	514,45212	419,1195	545,3577	70,409369	45,700603	64,298548
NGR_b00710		3,12E-05	2,25138859	2825,3108	2188,4881	2611,3103	4974,838	3761,6906	4583,0165
NGR_b02620		8,71E-09	4,33631687	1401,8541	1484,0214	1152,774	227,90625	212,3103	278,13553
NGR_b03250		1,48E-17	17,523552	298,77165	283,10703	113,04037	3754,3008	2153,3816	3629,6332
NGR_b03260	<i>pqqA</i>	2,00E-07	11,0850305	1510,2878	1263,2579	660,30523	10359,752	6144,7164	13273,357
NGR_b03270	<i>pqqB</i>	2,28E-05	10,4681894	311,69927	60,946653	120,45864	1691,0794	683,37379	1749,2689
NGR_b03280	<i>pqqC</i>	4,37E-10	5,90865418	185,07144	72,37415	143,04464	715,23391	427,10862	713,40134
NGR_b03290	<i>pqqD</i>	0,0010328	14,0744948	0	47,264751	101,90935	718,60236	223,14246	657,73377
NGR_b03300	<i>pqqE</i>	1,52E-10	6,91952108	108,29323	86,462985	8,877437	431,92792	291,57282	386,74745
NGR_b03520		0,0002349	3,43661664	1175,0568	1190,1527	1040,3246	146,71465	379,65211	223,81218
NGR_b03530		0,0002596	5,9583405	724,12231	455,10383	516,07371	107,63345	23,87332	93,825195
NGR_b03540		4,23E-14	7,01621321	1385,7999	1608,1235	1215,0498	208,97042	129,78019	127,51317
NGR_b03550		8,74E-05	4,10400205	605,58715	390,05858	613,244	74,129506	86,3209	141,35506
NGR_b03560		2,24E-09	7,32514184	655,34594	455,84227	697,51291	89,426071	52,066574	51,157071
NGR_b03570		0,0367314	3,29165595	214,60549	214,65114	178,63135	51,529047	26,668245	65,506005
NGR_b04010		5,31E-08	3,18623119	2146,7219	1534,6244	1876,3674	4837,1375	4660,7473	4199,5304
NGR_b06210		1,06E-28	42,684482	207,19368	94,529502	158,52566	4383,4744	5876,0848	4914,7329
NGR_b06410		0,0139868	2,73758516	798,68306	1310,3991	951,87344	3089,664	1852,6563	1543,9993
NGR_b08780		0,0002825	2,27192994	2412,473	1926,1556	2966,4703	4044,0949	4546,8038	4148,2813
NGR_b09060		4,89E-05	2,80393944	1645,5107	1529,8169	1168,2178	419,95386	326,01318	455,83766
NGR_b09450	<i>rkpL</i>	0,0006625	2,16876709	2804,8922	2364,6569	2599,2496	634,44172	886,53897	1225,9262
NGR_b09470	<i>rkpN</i>	0,0204057	2,16024548	1123,2543	1005,2307	963,29635	299,67247	279,16546	525,72053
NGR_b10710		8,82E-08	3,00928808	4079,5395	2887,0346	3648,2618	7669,3575	9061,7237	7873,2834
NGR_b11140		5,67E-14	4,4330645	3219,0823	2372,4599	2841,8625	10992,863	9467,2271	8515,7807
NGR_b11150		4,19E-08	3,11040333	3894,1059	2887,0346	4013,088	7476,4177	9436,1751	8866,6416
NGR_b11160		2,28E-06	3,08680844	846,04087	492,14422	957,09868	1980,6478	1913,4466	1577,8759
NGR_b11180		5,29E-27	11,5714718	24204,126	29251,743	21023,604	2105,0363	1426,1714	1459,6447
NGR_b11310		3,34E-06	2,60998285	2098,706	1597,8417	1858,0682	3766,8133	3983,6984	3435,2568

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM PHA1	RPKM PHA2	RPKM PHA3	RPKM VIG1	RPKM VIG2	RPKM VIG3
NGR_b11320		0,0004186	2,33468657	13068,077	14857,856	15159,931	27248,296	25736,908	24336,993
NGR_b11330		0,0002326	2,14397217	2402,7561	1736,9796	2097,2945	3239,4594	3608,2136	3464,6126
NGR_b11450		4,67E-17	5,50940279	390,66822	280,72398	504,39983	1686,9009	1640,886	1658,7293
NGR_b11720		1,52E-10	3,6631564	831,19804	961,60274	827,3927	2470,9835	2621,5977	2277,3871
NGR_b12230		0,0003818	2,17474256	238,9946	287,86103	338,54633	457,55077	416,97384	569,01403
NGR_b12470	<i>kdpB</i>	0,0247495	4,72468225	904,38851	958,33357	703,11597	4330,6117	3613,2407	1450,9204
NGR_b12560		4,74E-13	11,456911	294,27508	50,347235	542,77808	2066,7629	2733,4952	2977,6751
NGR_b12620		0,0114734	2,24304851	604,31491	578,9932	733,18118	1341,3911	1204,0395	767,35606
NGR_b13280		9,48E-05	2,7038897	1346,7589	2103,2814	1919,2928	682,67224	334,71369	520,7059
NGR_b13310		9,65E-05	2,38418608	576,31299	853,01176	903,1254	195,23217	281,46881	265,91547
NGR_b13320		4,63E-05	2,90499903	948,83088	1284,2466	1524,5131	482,65006	204,37347	317,9388
NGR_b13330		0,0010065	2,27354979	5333,9795	8266,9493	9248,555	2681,6717	2172,314	2845,8238
NGR_b13340	<i>phcN</i>	3,40E-05	2,62737831	1204,3286	1483,5413	1623,0545	451,10838	389,10963	420,54389
NGR_b13350	<i>gcdH</i>	8,30E-16	4,52322832	581,11898	467,87329	411,92653	1725,0086	1435,7752	1966,8343
NGR_b13360		9,80E-06	2,80033722	358,92643	350,90497	226,97992	818,04531	469,38806	759,60499
NGR_b14100		2,81E-27	17,9951743	119,58175	106,38744	158,80574	1567,7212	1989,7527	1736,7193
NGR_b14390		0,0006673	2,22592945	1050,9824	1208,3336	1199,2811	1749,6405	2105,3006	2035,1617
NGR_b14580		0,0376643	3,29723311	75,203633	51,466062	84,066638	163,60906	242,97735	124,79225
NGR_b16700		0,0044986	2,27092047	79,264727	45,204414	64,977987	109,96439	128,04922	94,359333
NGR_b18140	<i>exsI</i>	0,0006427	2,03552591	6687,7516	6396,4963	7807,3888	9976,5961	10283,148	12405,59
NGR_b18290	<i>exoU1</i>	0,0047938	2,04236818	752,03633	853,25314	924,73302	350,056	319,70704	282,71013
NGR_b18710		0,0008547	2,37443256	1224,0591	837,69229	1877,0113	2472,2979	2210,0599	2514,3156
NGR_b18720		0,0010378	2,24537904	3242,3123	2274,3685	3787,5293	4427,7954	5827,0915	5757,4679
NGR_b18840		0,0077722	2,17933698	1066,0735	1051,9437	902,37684	335,34777	320,40969	413,19172
NGR_b18850		2,90E-08	4,01151881	4626,9354	4893,6374	3385,4633	954,88856	864,83463	667,64313
NGR_b18970		1,08E-16	5,36360283	356,22773	365,67992	253,08483	1523,7732	1150,9453	1382,1384
NGR_b19330		0,0316876	2,63252204	20443,11	23821,435	11413,848	5030,2165	5355,4191	5919,6039
NGR_b20650		2,24E-05	4,29858605	15382,561	29391,8	27056,007	2560,8375	6162,7891	3808,8764
NGR_b20660		4,50E-06	2,96200293	1660,6304	2272,925	1720,2097	549,77088	365,82091	559,11445
NGR_b20680		2,92E-05	2,8283896	1416,6266	1454,2155	2593,5535	4667,573	4068,4579	3122,9607
NGR_b21580	<i>ftsK1</i>	0,0005926	2,17453762	1092,8407	1465,8687	1232,7119	432,08964	364,85834	543,50946
NGR_b21730		0,0010378	2,03741414	4081,6628	4808,7374	5438,2772	7203,5772	7178,0331	7995,733
NGR_b21870	<i>dctA2</i>	0,0001428	3,0062756	19357,721	19123,766	20049,381	41077,452	48845,029	45021,109
NGR_b22880		0,0102714	6,45415408	2865,8682	1001,5018	2699,2207	190,33252	394,01732	193,56729
NGR_b23070		0,0178033	2,33393165	1535,6708	1440,1848	1594,5816	2367,1607	2021,4082	3836,7803
NGR_b23370		4,59E-14	4,40667376	366,2221	538,38245	466,99944	1637,0885	1358,5307	1646,9706
NGR_b23380		1,95E-06	3,89531553	1032,2067	797,2194	986,38189	2838,401	2072,4538	3592,6975
NGR_b23390		1,03E-11	3,86574643	737,33171	737,48855	827,61022	2242,5211	2229,5547	2370,6587
NGR_c00790		9,06E-11	5,79146143	40,109791	15,335168	72,550019	267,29859	159,58049	226,67434
NGR_c00900		0,0116227	2,09076157	105,11028	131,86291	245,91865	265,04388	228,69816	396,66111
NGR_c01510	<i>argD</i>	5,78E-05	2,42956099	164,73664	178,91029	228,69028	75,252981	58,180389	77,049394
NGR_c01520	<i>argF</i>	2,54E-05	3,02984944	141,56397	162,37236	187,40542	55,244542	35,20158	56,142253
NGR_c02020		2,89E-08	3,55981928	313,10194	382,00998	486,67093	1346,8134	1218,2261	1131,2413

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM PHA1	RPKM PHA2	RPKM PHA3	RPKM VIG1	RPKM VIG2	RPKM VIG3
NGR_c02030		2,33E-06	4,1708735	383,08943	236,59973	316,33611	984,56701	1256,6964	1227,1092
NGR_c02160		5,10E-05	4,5065831	29,895496	110,01316	74,058621	376,91928	234,16703	248,97869
NGR_c02200	<i>trnT2</i>	0,0273618	10,6248484	13160,595	35856,689	14239,992	2704,7728	861,73467	2018,5947
NGR_c02860		0,0445182	2,07980404	144,93454	115,01376	120,60745	84,991602	29,33465	56,142253
NGR_c03560		3,56E-08	3,4053599	248,52882	157,9707	246,26722	752,02208	562,37704	685,6288
NGR_c03620		0,0003772	2,69260297	87,948379	74,89268	180,45809	272,17078	222,67046	316,28978
NGR_c03760		0,0002206	2,41201559	121,18214	145,94435	131,93907	61,114066	51,561583	33,641376
NGR_c03790		1,01E-13	4,68793876	168,56588	204,5397	231,2024	817,68514	780,77299	916,08293
NGR_c03830		0,020066	3,65688665	114,5994	104,55796	166,3202	13,135066	18,134147	65,073975
NGR_c04320		0,0017042	2,43040471	1738,525	765,88707	2133,4867	3216,4492	3379,7517	3282,1686
NGR_c05150		0,000396	3,04182635	204,91284	292,48532	236,88949	60,282123	47,557101	113,77172
NGR_c05170	<i>fabI3</i>	0,0011671	2,38380658	188,90011	212,33309	247,49505	133,37144	32,880596	86,526933
NGR_c05180	<i>gpmB</i>	0,0061903	2,58238169	100,49486	123,86097	145,58532	46,680003	36,826268	44,050075
NGR_c05580		0,0089392	2,06539548	249,22175	248,84018	232,17882	116,01828	66,739055	143,69495
NGR_c05860		2,01E-05	2,51097005	487,71374	759,62575	651,40967	1431,4167	1363,8566	1439,9509
NGR_c07330	<i>cycF</i>	0,0015259	3,00641163	214,58546	351,98841	266,74358	113,45523	48,195451	93,680319
NGR_c07340	<i>cycG</i>	0,00202	2,51701238	108,21189	101,81546	134,03396	34,108105	35,316995	52,80593
NGR_c07370		1,10E-06	3,01160556	216,76768	233,92629	267,53154	79,344703	66,942665	65,515154
NGR_c07650		0,0019798	2,32627676	141,71834	126,42734	136,52791	49,632501	61,669943	40,981702
NGR_c07670		2,07E-06	2,46603654	850,90056	586,57017	738,11758	1788,0108	1279,1374	1811,9035
NGR_c07730		0,0006427	2,04025989	928,25516	770,59218	1154,4916	1733,8287	1466,1458	2004,2784
NGR_c07910		0,002897	2,05106022	1598,6617	2127,7545	2413,0767	1192,0072	448,82014	1109,5113
NGR_c08080		0,0025851	2,13189296	189,99375	139,22718	258,98863	433,45717	299,21343	386,16267
NGR_c08250		1,99E-05	2,53829857	4428,9298	4302,8677	5154,5768	1784,8236	1196,8537	1979,0144
NGR_c08260		0,0001909	2,31747379	961,97383	938,91039	1173,7817	412,61788	276,19701	516,21182
NGR_c08790		4,71E-10	3,29931183	222,08862	166,22426	192,71459	711,88222	458,64832	572,12848
NGR_c08810		1,70E-15	5,91267937	151,67568	81,186182	139,16244	854,1656	492,82212	652,65369
NGR_c08860	<i>rpsR</i>	0,0076482	10,0185343	62,132206	91,456723	116,29285	0	0	25,872785
NGR_c08870	<i>rpsF</i>	2,17E-06	2,61932332	653,21659	570,46824	741,9028	147,37544	263,30782	243,37667
NGR_c08930		0,0002099	2,37559772	223,79317	240,87787	242,37896	119,60964	55,04398	98,762035
NGR_c09120		9,06E-11	4,0547698	1488,7957	1365,1633	1493,5155	305,30462	234,16703	438,82493
NGR_c09130	<i>ndk</i>	4,69E-06	2,79907427	936,3015	778,17819	877,84852	368,89972	178,25481	304,60158
NGR_c09220		8,34E-09	3,84986345	2382,3763	3440,6933	2828,2512	567,76785	589,99831	862,00103
NGR_c09230		0,0481863	2,0551257	120,41663	150,62716	126,81442	59,407836	45,565497	70,854658
NGR_c09250		0,0193131	2,1985246	41,813295	107,24256	122,76384	228,44364	133,43302	166,86198
NGR_c09640	<i>ribH</i>	0,0093443	2,60618453	107,15788	188,20433	158,53674	67,551767	34,972998	55,777693
NGR_c09740		8,71E-05	2,42533034	670,11515	705,67763	882,14835	1454,6529	1622,8525	1753,137
NGR_c09750		0,0002482	2,75691637	2662,6074	2581,6918	3157,0332	6460,3564	6926,4725	7093,4094
NGR_c09950	<i>nirK</i>	9,30E-05	2,63370228	744,13617	827,36687	896,10276	1693,5873	2019,0954	2019,2782
NGR_c10390		4,67E-12	4,61741678	195,85226	198,91724	309,48814	39,082204	34,335967	63,07375
NGR_c10590	<i>nuoJ</i>	0,0061622	5,03164788	50,311933	67,325127	63,702456	253,73103	332,78371	204,26879
NGR_c11050		0,001227	2,74277879	232,23455	196,51357	229,36919	86,117319	59,446376	71,107323
NGR_c11770	<i>nusG</i>	0,0008282	2,11478931	576,88174	569,22063	522,87339	249,78888	212,99939	248,71494

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM PHA1	RPKM PHA2	RPKM PHA3	RPKM VIG1	RPKM VIG2	RPKM VIG3
NGR_c11780	<i>rplK</i>	9,20E-05	2,62313173	663,55458	627,34777	607,48785	200,05716	138,09851	330,37556
NGR_c11790	<i>rplA</i>	0,0003134	2,19487403	588,73599	636,77145	711,55607	306,95465	200,33174	290,3193
NGR_c11810	<i>rplJ</i>	0,0082608	1,90617594	973,51023	802,74909	964,65132	391,43836	329,74541	586,16379
NGR_c11820	<i>rplL</i>	0,0005167	2,12941906	934,70138	830,25557	807,31611	355,57034	350,64074	377,47989
NGR_c11860	<i>rpsL</i>	1,78E-09	3,61443795	1156,1601	1235,4704	1025,6721	325,09288	231,64911	303,06629
NGR_c11870	<i>rpsG</i>	1,54E-08	3,24289051	1110,2273	1177,9753	1244,059	281,60912	285,8727	410,33908
NGR_c11880	<i>fusA-c</i>	1,73E-06	2,92887211	997,50594	1113,0046	1120,9654	336,23892	294,93895	357,39556
NGR_c11890		2,91E-06	2,74631246	673,56383	751,69706	708,28002	192,40191	196,93129	312,25548
NGR_c11900	<i>rpsJ</i>	1,08E-05	3,2163784	640,86656	475,68797	545,73294	126,24966	174,29908	156,36707
NGR_c11910	<i>rplC</i>	4,64E-11	4,15658234	923,45797	888,0132	878,08264	241,92958	118,29368	237,21734
NGR_c11920	<i>rplD</i>	2,10E-07	3,21337452	353,76337	363,3768	455,32337	100,51181	95,401383	129,6764
NGR_c11930	<i>rplW</i>	2,26E-05	4,15479901	736,71044	584,45767	538,81425	145,96007	109,91514	153,38865
NGR_c11940	<i>rplB</i>	1,05E-09	3,86387841	517,54569	551,57136	541,32693	149,14655	70,781671	165,48382
NGR_c11950	<i>rpsS</i>	1,67E-08	4,23426251	731,95747	623,30037	610,51909	139,82489	173,73683	92,363061
NGR_c11960	<i>rplV</i>	7,84E-06	2,71616707	436,35926	642,3076	524,10716	170,04858	179,52806	173,44717
NGR_c11970	<i>rpsC</i>	2,30E-06	2,69617985	832,04944	797,36429	741,93461	262,2598	241,38226	288,73158
NGR_c11980	<i>rplP</i>	8,39E-06	2,53497612	508,22344	615,07358	526,63908	226,15157	221,15775	124,48934
NGR_c11990	<i>rpmC</i>	0,0059543	3,36613593	384,84874	597,38489	398,29537	155,26824	53,590465	176,28248
NGR_c12000	<i>rpsQ</i>	0,0148335	2,4259103	1292,5072	786,16999	1042,1329	345,66838	363,60113	448,51619
NGR_c12010	<i>rplN</i>	0,0013657	1,97225628	1207,4864	1430,6589	1149,4139	634,32757	540,04375	549,95444
NGR_c12020	<i>rplX</i>	1,83E-06	2,56511742	1318,995	1838,0083	1550,4837	600,17147	552,39402	474,91487
NGR_c12030	<i>rplE</i>	2,22E-05	2,44993555	1253,1999	1409,8461	1440,8251	608,23829	405,38593	496,45145
NGR_c12040	<i>rpsN</i>	0,0001785	2,3732939	980,83606	1035,1238	1035,3686	395,21095	281,61264	494,7536
NGR_c12050	<i>rpsH</i>	0,0013813	2,12458661	542,83927	778,28859	631,81841	303,09411	202,47525	330,99657
NGR_c12060	<i>rplF</i>	0,0017042	2,09372601	1048,7777	1124,2918	998,40451	540,60389	312,66122	536,86029
NGR_c12130		0,0026492	2,11210971	610,90297	589,22433	628,92859	290,08288	179,52806	322,11617
NGR_c12140	<i>rpoA</i>	0,000389	2,23261244	1159,9364	1099,6271	1177,6859	397,44293	410,19764	576,68672
NGR_c12340		5,61E-06	2,85710441	441,11955	360,96626	519,7396	1110,3172	1013,643	1242,2121
NGR_c12350		3,39E-05	2,32883589	195,00172	135,18701	206,93677	382,11373	331,24767	406,00824
NGR_c12470		0,0015976	2,04863474	252,16462	300,09602	277,63325	153,75134	86,34616	129,10468
NGR_c12810		0,0003997	2,09469491	327,73287	225,72794	212,25524	473,96719	419,45808	571,98199
NGR_c12890		0,0002245	2,3481438	294,68418	254,67332	506,94889	789,51128	598,42686	805,29044
NGR_c13890		4,70E-07	3,64184261	34959,659	29961,942	38448,214	8423,3021	6966,7604	10176,307
NGR_c14380	<i>glxB</i>	8,81E-05	6,38837472	167,34548	205,65374	188,00754	874,09079	1254,3185	1006,1686
NGR_c14390	<i>glxC</i>	6,36E-09	3,21462076	144,12501	132,59228	126,44944	374,77956	360,62404	431,36373
NGR_c14400	<i>glxD</i>	1,06E-07	3,56603717	162,97432	204,06504	107,66084	463,78939	526,83177	535,64842
NGR_c14810		0,0001652	6,31902928	169,08109	113,12829	307,16116	959,29046	1265,5256	950,50674
NGR_c14820		5,56E-05	7,69266376	14,128693	47,265928	62,222768	249,38632	319,7075	235,33602
NGR_c14930		4,67E-12	4,01175123	160,37772	98,054625	170,48705	505,50635	486,12155	538,29959
NGR_c14990		0,00202	2,93191957	393,55847	399,52147	403,42459	51,330455	94,488451	226,04644
NGR_c15080	<i>trnA1</i>	0,0044072	3,79961721	5048,4052	5693,181	3137,7468	769,95682	1133,8614	1398,6623
NGR_c15150		2,13E-09	3,4804629	314,40282	282,18989	428,47546	995,82354	967,71629	1197,4579
NGR_c15540		0,0166352	2,63963688	58,601967	47,051083	109,68531	236,43118	102,00458	170,81918

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM PHA1	RPKM PHA2	RPKM PHA3	RPKM VIG1	RPKM VIG2	RPKM VIG3
NGR_c15580		0,0009409	2,06707086	321,93821	255,29065	301,94228	496,09549	560,37659	558,58296
NGR_c15620		0,0405303	2,53748592	705,00392	1310,2833	1034,9458	3506,065	1568,0299	1957,1616
NGR_c15760		0,0047381	3,40002205	75,789381	85,984726	97,956131	191,10891	298,25747	281,29421
NGR_c15770		1,07E-62	94,481664	30,972811	41,446399	57,971813	3377,8419	3488,1277	3917,6291
NGR_c16180		0,0026862	2,28467095	176,81051	111,72765	91,926732	247,68981	273,56656	265,87367
NGR_c16210	<i>purQ</i>	0,004115	2,33686857	147,34209	172,52064	172,36262	75,46799	48,087872	67,107536
NGR_c17450		2,21E-12	4,5278676	247,13123	342,51041	305,40882	82,664204	43,89439	52,504674
NGR_c18100		0,0010249	2,01517511	296,47376	257,0348	232,17028	452,76093	486,97894	478,17516
NGR_c18580		0,0278774	2,38774319	116,59244	102,0122	148,11724	11,307578	78,055677	37,346803
NGR_c18730		0,000905	2,11566184	210,22056	232,9578	274,85025	488,67465	400,22178	465,05095
NGR_c19500		0,0076637	2,74126606	142,80849	63,699927	209,64286	360,10288	193,33791	479,04457
NGR_c19800		0,0097622	2,53886429	153,61196	154,16738	163,08654	69,168698	28,648094	74,246636
NGR_c19850	<i>asr</i>	9,50E-06	2,46544696	713,38128	621,07429	634,02408	1441,2451	1226,7751	1731,3744
NGR_c19860		0,030884	2,05816671	238,01414	336,19406	262,05358	733,54291	368,26268	468,03205
NGR_c19900		5,93E-10	4,28289525	400,24269	463,48828	326,26323	1824,4018	1460,3402	1306,0929
NGR_c19980		1,96E-08	5,46845493	20,356473	22,700084	93,385322	205,32182	165,35479	268,43015
NGR_c20990	<i>comL</i>	0,0028362	2,0031073	267,66296	267,43684	359,53026	116,98844	105,60474	178,33421
NGR_c21260		0,0076091	2,28148085	142,09237	195,05896	289,96032	98,84059	51,171893	96,915397
NGR_c21270		0,0489621	2,85745169	100,40125	128,24543	211,0343	69,046275	7,9437193	66,513664
NGR_c21690		0,0001232	7,21930533	151,91084	87,374793	112,9697	13,440532	13,916904	16,646831
NGR_c21910	<i>cbtB</i>	2,70E-12	5,46288438	174,81265	152,05209	279,07966	1212,2107	638,99817	1128,3165
NGR_c21920	<i>cbtA</i>	1,71E-17	7,06571301	31,37322	34,110544	49,654005	262,05205	177,48021	289,86373
NGR_c22010		1,08E-05	3,37722092	373,6937	230,02752	732,35747	1206,1417	1326,9465	1353,8216
NGR_c22050		2,77E-05	3,08316338	105,24435	56,333269	42,487145	238,84375	122,12793	233,73509
NGR_c22600		5,66E-09	3,4634537	1192,7961	1374,8973	1174,5735	327,5745	260,3842	393,42434
NGR_c22660		0,0012468	7,76083551	52,622175	14,083317	40,555911	185,76736	311,42622	230,08298
NGR_c22770		8,61E-06	2,6404607	886,35475	1148,3405	1086,7717	487,63932	224,41007	369,09145
NGR_c22780		0,0002418	2,90520469	602,96916	520,21607	559,04764	120,03429	193,33791	198,22534
NGR_c23150		2,60E-33	12,7566159	43,060213	48,017672	58,697223	568,75096	492,54218	642,52464
NGR_c23190	<i>rplY</i>	0,0008157	2,06592735	445,88676	370,65569	565,30336	255,53152	156,79306	187,54945
NGR_c23230		0,0038884	6,15302615	203,37359	194,38945	135,94798	54,945275	0	30,24565
NGR_c23240		1,04E-24	10,3807229	909,59183	830,07072	813,82195	75,545393	63,262268	83,852464
NGR_c23310		1,25E-06	3,22712187	249,53096	278,25909	256,41802	880,89683	694,94732	692,72296
NGR_c23490		0,0044072	3,0151027	106,46654	186,99011	168,50327	41,947468	23,164911	76,199525
NGR_c24020		1,78E-09	4,02671505	102,45642	95,971745	154,16618	387,52794	416,12463	440,8654
NGR_c24100	<i>ilvD3</i>	3,88E-07	2,97048209	177,82666	138,24314	169,6822	51,246168	47,166649	47,603376
NGR_c24110		4,19E-08	3,24862322	228,71931	249,75791	228,06337	54,40885	60,093073	80,865985
NGR_c24130		0,0193131	2,04937991	106,95944	119,27353	100,93916	41,74032	35,462332	68,93021
NGR_c24140		3,87E-05	2,75216061	126,90988	123,99921	140,83674	43,176398	31,557666	54,524873
NGR_c24250	<i>tmr3</i>	0,031074	4,13299442	13943,919	23552,428	10153,725	4610,4081	2727,8938	3262,995
NGR_c24610		2,41E-05	2,48813822	289,81336	188,20433	295,62243	580,33109	534,13306	603,41322
NGR_c24640		4,90E-05	2,60249171	100,8973	67,508075	98,744827	183,74815	165,86831	280,10102
NGR_c24650		0,0171184	2,36802975	349,08741	127,39985	235,84822	380,1086	497,15462	644,23235

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM PHA1	RPKM PHA2	RPKM PHA3	RPKM VIG1	RPKM VIG2	RPKM VIG3
NGR_c24660		3,53E-06	3,10333861	66,164938	46,873532	77,132752	166,84012	169,36609	186,38169
NGR_c24760	<i>gltB2</i>	7,47E-08	2,92142881	77,241007	71,440264	83,791728	226,2761	166,08322	219,94717
NGR_c24770		2,16E-07	2,66516564	134,22259	102,40951	142,59384	323,60844	225,43477	367,71253
NGR_c25170		0,0003528	2,14012893	110,81099	96,953746	114,96428	214,93744	148,37029	266,21171
NGR_c25580		8,44E-08	3,26095477	59,74542	86,260318	109,05583	245,80193	229,88349	255,33599
NGR_c25590		1,75E-21	7,36409323	202,8973	328,07203	344,39282	2110,439	1618,6956	2006,6253
NGR_c25610		1,12E-43	22,721126	27,532095	59,514306	48,966891	1068,067	726,22232	976,71092
NGR_c25620	<i>ssuB</i>	4,30E-12	10,2337984	96,693246	52,714639	47,31523	496,66968	648,29576	678,53176
NGR_c25630		3,62E-17	11,9201356	22,180529	24,734141	18,315573	191,09402	218,77971	292,48303
NGR_c25640	<i>ssuD</i>	9,47E-18	8,9778008	13,223008	24,772194	23,293652	136,70572	151,90836	198,22534
NGR_c25650		5,40E-07	8,50236406	16,065337	42,995797	21,225524	149,88706	178,96878	287,66346
NGR_c26160	<i>paaJ</i>	4,16E-09	6,50737672	47,420442	39,659917	16,315596	283,98918	165,08327	178,95343
NGR_c26200		3,41E-05	3,59519132	267,12379	119,15094	187,89933	589,37702	671,61575	579,34564
NGR_c26560		0,0010249	2,13322589	1148,677	895,49173	1230,5125	561,02985	336,23984	495,56335
NGR_c26700	<i>argJ</i>	0,0032356	2,25808922	122,07328	130,01555	130,28831	34,550934	39,027838	80,399367
NGR_c26760		3,11E-08	3,41420863	78,275485	64,695239	124,20248	272,84581	216,39543	321,1575
NGR_c27320		0,0114831	2,09486583	165,90798	138,75654	156,7872	90,642519	33,691592	80,601009
NGR_c27490		0,0017042	4,19183616	496,11387	253,32144	517,47289	65,841596	113,62535	81,548399
NGR_c27530	<i>trnM3</i>	0,021914	5,37031593	9845,1305	12071,964	4601,2525	1570,5786	1049,1899	2007,9969
NGR_c27700		0,00202	2,028807	333,45841	404,71007	478,13285	219,98766	114,73598	209,90026
NGR_c27870	<i>sqdB</i>	0,0243249	2,18691516	106,43384	118,68742	210,65159	51,120256	44,110088	81,782157
NGR_c28710		3,21E-06	2,69138163	187,52629	210,60961	294,95208	675,51767	442,99131	543,8325
NGR_c28780		9,15E-20	5,83547473	274,16819	292,62994	215,61371	1522,5869	1113,5285	1535,8282
NGR_c28790		0,0034042	5,0645134	202,59537	221,81225	233,19649	46,44184	32,058582	38,347164
NGR_c28870		0,000118	2,14077055	182,72739	171,16221	198,9475	394,20711	268,58528	410,0429
NGR_c29070		0,0044072	2,08851424	142,86209	139,8816	176,47302	65,897205	60,65137	68,921254
NGR_c29260	<i>speF</i>	1,20E-07	3,00272745	403,82647	319,48266	446,11502	92,88368	109,23665	144,86706
NGR_c29320		0,0004104	2,13741201	416,09912	408,71842	426,44628	145,10583	177,21654	198,15444
NGR_c29840	<i>modA</i>	1,49E-08	3,22113364	115,45462	154,49609	165,25021	446,39619	375,13325	424,68053
NGR_c29860	<i>modC</i>	9,80E-06	6,21134355	104,29833	189,96654	223,28535	14,610916	20,171692	39,208898
NGR_c29950		1,87E-10	9,48397089	62,948967	42,117714	58,644228	396,82699	505,71284	468,80758
NGR_c29960		1,25E-18	8,5966113	88,231398	116,03158	97,142773	686,62685	783,78031	833,00446
NGR_c29970		5,41E-26	9,5724921	42,678398	35,693925	46,988918	340,78702	315,72175	418,38078
NGR_c29980	<i>hmgA</i>	2,51E-14	46,5543702	18,174355	57,760213	43,771798	1337,6068	1870,4135	1620,041
NGR_c30010		1,22E-45	42,0241322	163,14285	83,253927	156,7872	4594,8784	5034,4865	5420,4178
NGR_c30020		1,06E-11	4,73589873	55,751061	53,288228	56,997497	210,87106	235,6739	252,884
NGR_c30490	<i>trnR4</i>	0,0181373	5,81636707	6791,1308	6560,2653	2698,8115	861,28503	699,45996	1003,9985
NGR_c30640		0,0336543	2,63844149	82,042754	62,734777	96,781152	265,98508	81,603662	244,0274
NGR_c31020		4,75E-17	5,9611118	939,18384	806,61967	953,19821	150,70531	101,05884	159,99148
NGR_c31030		2,65E-18	6,6117314	545,64103	487,50993	578,7721	75,505443	63,703504	79,66314
NGR_c31040		1,13E-09	5,47095148	147,34209	153,886	180,02868	22,654556	31,276665	22,44712
NGR_c31050		0,0003218	3,70644093	90,79178	58,316835	95,963283	9,1575459	25,285642	22,684238
NGR_c31090		4,23E-14	4,63365297	72,870272	78,759421	114,17371	374,56353	317,10119	399,7275

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM PHA1	RPKM PHA2	RPKM PHA3	RPKM VIG1	RPKM VIG2	RPKM VIG3
NGR_c31180		0,0019429	2,18275113	189,37082	242,09453	256,89843	123,64188	52,975492	112,65265
NGR_c31490		2,54E-05	2,30322238	257,84866	272,55361	275,54163	639,25827	407,33257	642,87892
NGR_c31500		5,26E-05	2,21134612	730,19088	1038,1773	633,1029	1611,0798	1350,4323	1871,8846
NGR_c31990		3,12E-06	3,39651505	93,222206	115,45612	144,12947	45,01286	10,357388	41,296945
NGR_c32000		2,17E-06	2,51784722	233,71504	257,22289	321,65033	87,545537	100,22913	95,206751
NGR_c32340		0,0006048	2,87053934	131,45226	125,16203	186,47767	44,620591	44,001975	47,370026
NGR_c32650		0,0007772	2,48363148	129,25406	146,48811	136,5002	43,234859	36,732083	71,3983
NGR_c32920		0,0103759	2,48968069	252,65707	273,25416	415,35786	187,6375	42,17102	118,90194
NGR_c32930		1,86E-17	5,5161902	55,213845	44,330785	89,969859	323,00449	246,03417	358,67326
NGR_c32950		1,10E-16	4,80372294	159,4524	113,43823	97,778635	595,47345	425,10557	619,85826
NGR_c33470	<i>rho</i>	0,0014886	2,11932318	139,3116	121,00974	187,01849	43,140287	59,559071	83,963932
NGR_c33930		0,0004534	2,2777477	630,77026	510,43296	523,20477	182,69682	222,55544	248,46427
NGR_c34270	<i>trmM5</i>	0,0081232	5,12117079	1084,9736	1935,816	951,22046	101,32765	419,67598	125,49981
NGR_c35080		0,0043494	2,0023671	137,25277	161,37589	146,71389	73,922929	44,070195	86,008625
NGR_c35090		0,0018963	2,74581798	20396,626	15089,331	27070,653	7229,1272	4404,9152	9018,6994
NGR_c35650		0,0003112	3,09629219	125,16925	147,39627	170,88607	56,812348	34,859817	36,485651
NGR_c36780		2,70E-05	3,43486381	483,54067	812,79931	992,63637	204,21539	178,28421	203,33738
NGR_c36790		0,0012379	3,03909484	157,5329	204,83718	320,70726	48,717089	51,737192	99,01746
NGR_c36800		0,0164128	3,74292813	69,738426	164,53926	204,0785	32,393596	25,555595	45,852836
NGR_c36810	<i>ugpC</i>	0,003897	3,86505745	103,13946	210,65678	267,45556	58,174515	28,346535	48,034868
NGR_c36830	<i>gshB2</i>	0,0053734	2,25871661	117,50065	128,84453	122,1811	53,496297	39,768873	54,365599

APÊNDICE 3 - GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS DE *S. fredii* NGR234 QUANDO INOCULADO EM *Tephrosia vogelii* e *Vigna unguiculata*.

NOTA: Na coluna *Fold Change*, os valores presentes nas células pretas representam os genes mais expressos em *V. unguiculata*, e nas brancas, os mais expressos em *T. vogelii*.

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM TEP1	RPKM TEP2	RPKM VIG1	RPKM VIG2	RPKM VIG3
NGR_a00300		2,12E-07	3,050073	1530,606	1020,506	2286,276	2484,759	2239,584
NGR_a00470	<i>syrM2</i>	8,44E-11	5,173593	654,8714	648,3212	135,1124	61,66221	40,48602
NGR_a00570	<i>nopP</i>	4,15E-38	19,98732	2815,451	2735,105	105,5565	77,07776	72,29647
NGR_a00620	<i>rhcQ-pA</i>	0,000601	3,856804	281,9148	268,6289	39,98799	23,3595	65,73138
NGR_a00630		0,000226	3,109278	829,2599	820,9653	208,5184	93,699	186,7591
NGR_a00640	<i>rhcN-pA</i>	2,40E-12	4,612273	1194,188	1046,47	171,506	111,3194	160,9716
NGR_a00650	<i>rhcL</i>	1,58E-12	5,230691	1533,446	1538,082	219,8	140,4364	178,7694
NGR_a00660	<i>nolU</i>	1,76E-08	6,853026	744,405	596,4927	53,91808	39,37118	83,09002
NGR_a00670	<i>rhcJ</i>	1,41E-07	5,883131	872,4776	839,2778	79,2038	14,45873	169,5228
NGR_a00680	<i>nopB</i>	5,91E-11	6,254925	1431,216	1243,161	191,4092	50,82461	154,9335
NGR_a00690	<i>rhcC1-pA</i>	0,033897	3,01228	143,5566	234,4991	36,65282	35,68536	41,83966
NGR_a00700	<i>nopX</i>	1,74E-22	8,418206	3192,752	2897,415	274,1287	175,5875	214,1041
NGR_a00710		1,51E-06	5,80593	740,0111	641,9309	55,57041	81,15543	76,12118
NGR_a00720		4,72E-12	8,413137	390,3925	427,8102	37,61316	9,155088	42,93589
NGR_a00730		1,33E-17	7,019702	1231,307	1317,27	102,2364	74,65336	151,7153
NGR_a00740		1,02E-21	8,853779	1251,776	1341,428	136,0013	44,13716	93,14829
NGR_a00750		7,74E-31	14,90589	992,2295	854,2069	45,64607	33,33092	34,38967
NGR_a00760		7,70E-13	12,57091	341,5229	366,6261	21,26769	20,70632	9,710933
NGR_a00770	<i>nopL</i>	0,019052	2,621501	268,6922	261,8996	59,28603	37,10646	87,01168
NGR_a00810	<i>nodD2</i>	0,002098	2,571967	463,4631	440,1541	128,4215	80,37758	113,0874
NGR_a00820		0,003808	2,015904	593,3767	583,8663	158,8772	165,7324	202,0872
NGR_a01060		0,001773	2,161094	3421,774	2897,507	4573,312	4043,279	3806,512
NGR_a01550		0,002675	2,933556	496,1147	576,2855	202,6685	73,99465	69,40461
NGR_a01910	<i>y4qG</i>	0,002471	3,943679	7017,648	6007,118	14541,13	18453,07	13301
NGR_a01920	<i>bxrF</i>	0,013832	3,349551	7176,119	6295,37	14606,67	13734,26	12642,67
NGR_a01940		0,005783	3,281184	11552,79	11615,02	23707,39	23617,89	21679,26
NGR_a02390	<i>nodS</i>	0,000268	3,372136	388,6613	564,3349	79,38629	77,29088	99,6825
NGR_a02400	<i>nodU</i>	5,60E-11	4,465285	519,0123	514,8167	46,22583	82,51044	77,39214
NGR_a03530	<i>fixF</i>	1,74E-22	8,240814	1264,046	1280,063	92,61734	104,0454	82,95257
NGR_a03550	<i>wbgA</i>	1,87E-20	8,484644	526,4268	506,3277	37,86116	23,03863	49,70184
NGR_a03560	<i>rmlA</i>	9,56E-15	57,64872	493,6947	421,3586	0	0	13,70358
NGR_a03570	<i>rmlD</i>	0,000111	4,801306	193,1005	242,2412	9,66713	56,47179	13,24218
NGR_a03580	<i>rmlB</i>	2,48E-08	9,219472	317,1742	318,3628	16,35976	11,94596	33,61477
NGR_a03640	<i>nopM</i>	2,11E-05	3,293645	326,8734	274,2492	83,98209	45,99302	39,54498
NGR_a03860	<i>nolL</i>	8,90E-09	5,089778	533,1544	471,3234	70,40937	45,7006	64,29855
NGR_a1900	<i>bxrH</i>	0,03452	2,325225	5932,136	6717,548	8674,874	9168,247	8816,013
NGR_b02510		1,29E-06	3,38479	920,3054	1157,687	163,2998	285,2343	249,1127

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM TEP1	RPKM TEP2	RPKM VIG1	RPKM VIG2	RPKM VIG3
NGR_b02910	<i>thiG</i>	0,000247	2,971602	1152,089	1335,835	409,4362	169,5191	395,575
NGR_b02920		0,001063	2,552702	1221,571	1235,062	583,0229	214,3918	327,6727
NGR_b02930	<i>thiC</i>	5,50E-05	2,242317	1448,383	1797,637	691,5519	554,7519	421,983
NGR_b03240		0,000133	2,529908	4709,182	4410,478	1461,059	862,0151	1849,933
NGR_b03250		0,007324	2,29753	9278,685	9630,145	3754,301	2153,382	3629,633
NGR_b03260	<i>pqqA</i>	0,002328	2,393867	28138,33	33460,98	10359,75	6144,716	13273,36
NGR_b03270	<i>pqqB</i>	1,99E-05	2,871351	5022,131	5149,338	1691,079	683,3738	1749,269
NGR_b03280	<i>pqqC</i>	0,000777	2,442124	1662,47	2252,173	715,2339	427,1086	713,4013
NGR_b03290	<i>pqqD</i>	0,052517	2,515098	1930,124	1511,891	718,6024	223,1425	657,7338
NGR_b03300	<i>pqqE</i>	2,08E-05	2,857433	1387,116	1357,108	431,9279	291,5728	386,7475
NGR_b03480		0,000601	20,53264	1821,03	980,2999	91,85613	0	70,06294
NGR_b03520		0,033731	2,480399	844,4291	805,2463	146,7146	379,6521	223,8122
NGR_b03540		2,21E-08	5,036477	1042,381	984,4555	208,9704	129,7802	127,5132
NGR_b04010		2,42E-08	4,052437	1446,618	1496,619	4837,137	4660,747	4199,53
NGR_b06210		4,74E-23	74,038	91,91065	87,64586	4383,474	5876,085	4914,733
NGR_b06350		6,83E-05	7,553567	285,6775	160,248	1821,889	870,3666	1229,297
NGR_b08340		0,037651	2,073605	2771,46	3427,459	1173,717	700,8962	1583,902
NGR_b09180		0,020839	2,36592	1139,471	1397,054	2375,717	1580,816	2976,972
NGR_b10710		0,002675	2,101548	5598,681	4632,924	7669,358	9061,724	7873,283
NGR_b11070		0,000107	4,392734	562,9528	581,5668	2151,815	2126,052	1492,081
NGR_b11140		1,07E-09	3,812548	3460,1	3142,425	10992,86	9467,227	8515,781
NGR_b11150		6,11E-06	3,118608	3285,176	3949,016	7476,418	9436,175	8866,642
NGR_b11160		1,54E-07	3,837903	717,7648	523,4101	1980,648	1913,447	1577,876
NGR_b11200		0,00069	2,608156	1108,034	1227,042	223,5652	289,2587	511,5707
NGR_b11210		0,1263	2,685245	516,9065	501,4199	278,7191	28,84955	141,728
NGR_b11220		0,335748	4,84918	94,61391	406,0066	59,17902	30,6274	30,09239
NGR_b11450		4,21E-06	2,851044	770,0999	752,9576	1686,901	1640,886	1658,729
NGR_b12300		1,03E-05	2,885927	1023,095	1111,921	360,7416	243,5185	251,2279
NGR_b12560		3,37E-11	11,11569	367,1431	245,075	2066,763	2733,495	2977,675
NGR_b13350	<i>gcdH</i>	4,21E-11	4,153382	494,7161	577,4999	1725,009	1435,775	1966,834
NGR_b14080		0,000132	2,747626	838,8121	907,0181	265,4527	193,9509	273,9342
NGR_b14090		0,003791	2,907817	990,7968	944,8224	187,7947	194,3819	381,9728
NGR_b14100		1,36E-10	4,452567	9667,669	10966,15	1567,721	1989,753	1736,719
NGR_b14110		0,004619	2,081539	3351,12	2967,364	1497,183	1119,226	888,1995
NGR_b14370		0,002203	2,302568	3201,706	3181,023	6098,669	5534,819	5264,862
NGR_b14380		6,83E-05	2,838947	3233,984	3306,65	7042,303	6717,419	7571,519
NGR_b14390		2,25E-09	5,414474	251,7553	700,2142	1749,641	2105,301	2035,162
NGR_b14480		0,000505	2,85306	1174,858	1026,981	2449,497	2060,025	2724,67
NGR_b16700		0,019474	2,255605	65,9281	62,86894	109,9644	128,0492	94,35933
NGR_b18140	<i>exsI</i>	1,15E-05	2,618865	5388,262	5483,344	9976,596	10283,15	12405,59
NGR_b18700		0,036304	2,781795	1574,081	1063,238	410,2312	318,4655	365,0529
NGR_b18710		0,011721	2,21847	1006,128	1816,087	2472,298	2210,06	2514,316
NGR_b18720		0,000843	2,576541	2548,457	2893,101	4427,795	5827,091	5757,468

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM TEP1	RPKM TEP2	RPKM VIG1	RPKM VIG2	RPKM VIG3
NGR_b20620	TRAP	0,004816	2,129293	1265,303	1278,169	648,339	347,1105	392,2042
NGR_b20630	TRAP	0,072305	2,845385	535,4916	648,1251	257,6452	66,67061	163,765
NGR_b20640	TRAP	0,001499	3,459405	413,8704	649,2895	153,0935	86,43463	116,7716
NGR_b20820	cah	3,48E-05	2,463809	3674,956	3285,405	1492,968	962,1903	816,4668
NGR_b21160		0,007768	2,053143	354,956	341,1719	93,97569	127,6695	165,7591
NGR_b21730		5,62E-10	3,772087	2733,114	2434,18	7203,577	7178,033	7995,733
NGR_b22770		1,91E-20	10,10829	1275,877	1351,149	70,00301	108,6877	117,468
NGR_b22780		1,95E-09	25,05365	2125,305	2135,26	79,127	0	120,7077
NGR_b23010		0,001876	2,015999	785,9687	740,2072	1151,146	1019,804	1368,698
NGR_b23090		0,000232	2,76055	17053,8	16673,85	4956,404	4219,09	4889,81
NGR_b23100	thuA	1,41E-06	3,049201	12711,56	13547,81	3064,208	3088,224	3731,342
NGR_b23130	thuF	0,000386	2,152006	4640,51	5139,87	1669,604	1761,401	1779,613
NGR_b23370		4,68E-05	2,689226	473,828	1026,326	1637,088	1358,531	1646,971
NGR_b23380		0,002856	2,847188	1192,135	1396,462	2838,401	2072,454	3592,698
NGR_b23390		0,000872	2,173027	1339,765	1403,558	2242,521	2229,555	2370,659
NGR_c00010	dnaA	0,000321	2,165433	329,482	326,3888	91,91815	100,7746	104,9166
NGR_c00630	mexE	0,010334	2,016918	179,5159	205,542	80,86888	44,65872	66,77367
NGR_c00900		0,000632	2,313979	207,2941	175,4308	265,0439	228,6982	396,6611
NGR_c01390	trnT1	0,00076	4,405673	279,2778	217,4418	769,9568	708,6634	678,1393
NGR_c01520	argF	0,001697	2,63149	189,5925	193,5185	55,24454	35,20158	56,14225
NGR_c02020		0,000188	2,675473	631,6998	774,6365	1346,813	1218,226	1131,241
NGR_c02030		0,002406	3,211903	525,5742	580,3626	984,567	1256,696	1227,109
NGR_c02240	hisD	0,043441	2,111511	276,2488	195,6662	98,72669	50,62613	76,86069
NGR_c02850		0,001251	2,263634	400,9956	293,818	105,8934	93,56511	104,9238
NGR_c03370	trnH	0,012918	2,329625	661,562	777,9899	1013,277	979,2439	1338,665
NGR_c03560		2,99E-07	3,80023	238,676	290,3591	752,0221	562,377	685,6288
NGR_c03620		2,31E-05	3,321385	142,5977	101,4167	272,1708	222,6705	316,2898
NGR_c03770		0,002787	2,057626	258,2732	292,8076	100,9997	62,74767	106,3296
NGR_c03790		0,002618	2,228432	529,158	612,2704	817,6851	780,773	916,0829
NGR_c03850		1,60E-05	2,698071	321,3118	296,1735	105,0518	54,87757	70,33104
NGR_c04320		1,07E-10	6,890711	712,8637	748,5545	3216,449	3379,752	3282,169
NGR_c05160	dnaJ3	0,0095	2,43745	193,5053	164,785	33,34286	35,80332	79,53486
NGR_c05170	fabI3	0,015268	2,497056	295,4411	315,2774	133,3714	32,8806	86,52693
NGR_c07190		0,017291	2,365483	313,246	273,3238	615,443	274,0886	524,5658
NGR_c07470		0,003834	2,748466	236,9017	239,9075	52,95631	32,49377	92,31082
NGR_c07670		3,56E-05	2,48413	955,1301	1007,028	1788,011	1279,137	1811,903
NGR_c07720		0,012918	2,291029	151,608	141,4019	267,0406	160,2929	249,2566
NGR_c07730		1,86E-12	4,9402	495,2526	562,3287	1733,829	1466,146	2004,278
NGR_c08080		0,000109	3,008232	161,3605	211,4018	433,4572	299,2134	386,1627
NGR_c08110		0,022873	2,77791	166,8983	144,7754	46,68	27,6197	38,54382
NGR_c08250		5,68E-09	3,681388	610,3954	729,0697	1784,824	1196,854	1979,014
NGR_c08740		0,016075	2,178492	131,7618	181,2015	63,17594	43,61005	34,77638
NGR_c08860	rpsR	0,032164	9,858328	102,2897	132,7356	0	0	25,87279

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM TEP1	RPKM TEP2	RPKM VIG1	RPKM VIG2	RPKM VIG3
NGR_c08870	<i>rpsF</i>	3,53E-05	2,431752	830,1378	812,5077	147,3754	263,3078	243,3767
NGR_c08900		0,154153	1,962316	89,84175	98,36654	33,02531	22,79721	40,90364
NGR_c08930		0,004416	2,078777	273,6571	285,8198	119,6096	55,04398	98,76203
NGR_c09040	<i>pepA</i>	0,021714	2,40628	153,4346	201,8687	26,11188	43,25977	77,61836
NGR_c09120		4,68E-11	4,089466	1925,641	2041,747	305,3046	234,167	438,8249
NGR_c09130	<i>ndk</i>	0,001104	2,246477	963,4094	922,9712	368,8997	178,2548	304,6016
NGR_c09610		0,006366	2,513376	278,1639	306,0293	377,8857	444,9841	633,2198
NGR_c09720	<i>fabH2</i>	0,005599	2,041897	196,5288	263,5252	64,21588	66,49187	92,79067
NGR_c10080		0,029016	3,155153	746,8096	774,6365	2004,739	1570,87	1133,372
NGR_c10220	<i>rpsI</i>	0,31317	1,545438	780,0683	587,0465	208,3929	356,7545	289,0786
NGR_c10230	<i>rplM</i>	0,015396	2,106542	757,7137	919,5685	209,7373	347,4737	200,8897
NGR_c10450	<i>trnV1</i>	6,83E-05	3,072027	670,2667	625,1453	1283,261	921,2624	1822,499
NGR_c10650		8,87E-05	2,395501	190,8733	174,6183	49,11475	58,12059	40,55419
NGR_c11070	<i>accB</i>	0,003524	2,058102	587,4808	617,8649	223,5014	124,227	246,8599
NGR_c11160		0,011526	2,026526	292,9024	228,8528	83,40575	73,27676	100,1722
NGR_c11690		0,001451	2,64965	164,242	153,6977	359,9243	208,3808	278,0169
NGR_c11770	<i>nusG</i>	0,000292	2,25398	815,4281	801,3817	249,7889	212,9994	248,7149
NGR_c11780	<i>rplK</i>	4,21E-06	3,05747	1038,992	967,8443	200,0572	138,0985	330,3756
NGR_c11790	<i>rplA</i>	6,28E-06	2,682914	1105,285	1025,461	306,9546	200,3317	290,3193
NGR_c11800		8,49E-05	2,620467	995,7461	1173,112	192,6476	265,9675	357,9069
NGR_c11810	<i>rplJ</i>	1,76E-05	2,595449	1595,493	1781,137	391,4384	329,7454	586,1638
NGR_c11820	<i>rplL</i>	3,19E-05	2,437279	1370,789	1307,199	355,5703	350,6407	377,4799
NGR_c11830	<i>rpoB</i>	0,01251	2,209386	1201,886	1329,765	360,6389	331,4964	447,0596
NGR_c11840	<i>rpoC</i>	0,022961	2,056263	1146,54	1342,261	375,6423	366,227	456,4461
NGR_c11860	<i>rpsL</i>	3,15E-11	3,93029	1472,064	1915,768	325,0929	231,6491	303,0663
NGR_c11870	<i>rpsG</i>	1,40E-06	2,81459	1396,982	1368,36	281,6091	285,8727	410,3391
NGR_c11880	<i>fusA-crom</i>	6,16E-06	3,069593	1570,658	1486,318	336,2389	294,939	357,3956
NGR_c11890		3,36E-06	2,743766	924,0866	1004,744	192,4019	196,9313	312,2555
NGR_c11900	<i>rpsJ</i>	0,004061	3,080584	549,5175	902,4892	126,2497	174,2991	156,3671
NGR_c11910	<i>rplC</i>	2,72E-10	3,841422	1102,39	1152,947	241,9296	118,2937	237,2173
NGR_c11920	<i>rplD</i>	4,85E-08	3,529347	560,5344	595,4265	100,5118	95,40138	129,6764
NGR_c11930	<i>rplW</i>	0,000488	3,752732	591,993	948,5345	145,9601	109,9151	153,3887
NGR_c11940	<i>rplB</i>	8,13E-11	4,239874	846,9759	750,2653	149,1466	70,78167	165,4838
NGR_c11950	<i>rpsS</i>	4,80E-11	4,993504	1141,135	969,9153	139,8249	173,7368	92,36306
NGR_c11960	<i>rplV</i>	1,24E-06	3,038264	783,6965	836,8723	170,0486	179,5281	173,4472
NGR_c11970	<i>rpsC</i>	6,20E-08	3,029041	1212,864	1209,33	262,2598	241,3823	288,7316
NGR_c11980	<i>rplP</i>	1,24E-06	2,856325	892,07	793,3476	226,1516	221,1578	124,4893
NGR_c11990	<i>rpmC</i>	0,006965	3,047145	549,1074	585,7948	155,2682	53,59046	176,2825
NGR_c12000	<i>rpsQ</i>	0,00043	2,516201	1200,07	1751,921	345,6684	363,6011	448,5162
NGR_c12010	<i>rplN</i>	0,00016	2,167976	1783,14	2004,118	634,3276	540,0437	549,9544
NGR_c12020	<i>rplX</i>	1,21E-06	2,641277	2190,541	2191,493	600,1715	552,394	474,9149
NGR_c12030	<i>rplE</i>	4,11E-05	2,449002	1909,499	1791,752	608,2383	405,3859	496,4515

Nome - locus_tag	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM TEP1	RPKM TEP2	RPKM VIG1	RPKM VIG2	RPKM VIG3
NGR_c12040	<i>rpsN</i>	2,19E-05	2,698981	1636,97	1498,643	395,211	281,6126	494,7536
NGR_c12050	<i>rpsH</i>	0,011437	1,923057	648,9884	952,6023	303,0941	202,4753	330,9966
NGR_c12060	<i>rplF</i>	0,001924	2,114232	1494,502	1411,947	540,6039	312,6612	536,8603
NGR_c12070	<i>rplR</i>	0,001309	2,305647	1251,288	1075,528	429,8749	192,8814	408,1913
NGR_c12080	<i>rpsE</i>	0,000428	2,076187	1012,848	1072,713	328,5149	330,7096	327,7673
NGR_c12100	<i>secY</i>	8,02E-05	2,206351	433,6824	516,0393	130,9099	144,5864	146,5256
NGR_c12110	<i>adk</i>	0,000973	2,110257	733,1645	817,003	249,294	204,6434	278,166
NGR_c12140	<i>rpoA</i>	0,000136	2,405686	1582,961	1769,43	397,4429	410,1976	576,6867
NGR_c12370		0,012438	2,08076	253,0908	212,7276	327,7359	306,5113	322,9891
NGR_c12650		0,001205	3,727131	112,6374	184,9878	19,40853	26,79523	32,05136
NGR_c12810		0,001185	2,38099	277,7118	341,0653	473,9672	419,4581	571,982
NGR_c13080		3,19E-05	4,683636	255,7243	290,3591	78,33563	10,81494	32,34098
NGR_c13430	<i>fabZ</i>	0,053028	1,820588	502,0995	413,1395	176,1794	138,9895	187,0352
NGR_c13440	<i>lpxA</i>	0,001945	2,31357	287,1787	243,92	62,37945	79,49582	83,20344
NGR_c14000	<i>phbC2</i>	0,006403	2,046585	188,6677	248,5555	321,3926	265,6431	298,5467
NGR_c14020	<i>thrA-crom</i>	8,07E-05	2,610361	285,5684	274,8018	70,76852	52,9221	92,52014
NGR_c14180		0,002537	2,214611	559,6672	606,349	232,9024	133,9762	160,2568
NGR_c14380	<i>glxB</i>	0,000709	8,505282	182,7328	198,3617	874,0908	1254,319	1006,169
NGR_c14390	<i>glxC</i>	4,81E-11	4,924403	92,68609	147,335	374,7796	360,624	431,3637
NGR_c14400	<i>glxD</i>	7,34E-08	4,755973	153,3191	174,0844	463,7894	526,8318	535,6484
NGR_c14410	<i>glnT</i>	3,53E-05	2,6871	84,38119	75,80541	140,1777	123,5285	164,9983
NGR_c15150		0,009549	2,00652	736,4352	854,9479	995,8235	967,7163	1197,458
NGR_c15510		0,000833	2,337282	559,9263	625,2009	813,7294	842,5703	1086,895
NGR_c15620		0,001063	9,073945	376,1413	392,221	3506,065	1568,03	1957,162
NGR_c15630		4,42E-07	5,848932	15879,53	16168,55	74747,28	51930,15	60048,82
NGR_c15760		0,012918	4,017538	122,0614	74,79629	191,1089	298,2575	281,2942
NGR_c15770		5,36E-42	179,3335	33,99418	26,88095	3377,842	3488,128	3917,629
NGR_c16180		0,000633	3,355154	121,2864	118,0399	247,6898	273,5666	265,8737
NGR_c16200	<i>purS</i>	0,011095	3,302474	419,2615	314,5301	128,4318	44,32792	53,02324
NGR_c16210	<i>purQ</i>	0,005591	2,568714	284,2649	202,881	75,46799	48,08787	67,10754
NGR_c17570		0,002241	2,244102	220,5207	295,0996	371,5347	326,4146	453,1938
NGR_c17680	<i>dctQ</i>	1,30E-05	12,27065	154,7665	143,4512	20,3183	0	5,592295
NGR_c17750	<i>dctP</i>	3,31E-15	6,134566	2553,916	2690,818	324,2119	184,8798	357,9069
NGR_c18080		0,005413	2,046751	806,4022	725,5855	181,7724	289,5614	253,9984
NGR_c18200	<i>cobW</i>	0,003468	2,12182	227,1984	287,0641	76,92339	60,68554	105,8598
NGR_c18290		0,030641	6,920044	40,0852	74,12323	217,3425	325,49	212,9191
NGR_c18840		0,006025	2,472331	162,1945	209,5635	56,53789	35,47985	59,41537
NGR_c19500		0,004143	3,233941	174,1548	137,7132	360,1029	193,3379	479,0446
NGR_c19550		0,004164	2,11628	129,8172	164,2451	262,4603	164,7046	193,7294
NGR_c19850	<i>asr</i>	6,30E-23	10,28756	235,8346	192,2246	1441,245	1226,775	1731,374
NGR_c19860		4,30E-05	8,851711	36,28225	141,2443	733,5429	368,2627	468,032
NGR_c19900		0,008959	2,340878	1288,29	693,7044	1824,402	1460,34	1306,093

Nome - <i>locus_tag</i>	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM TEP1	RPKM TEP2	RPKM VIG1	RPKM VIG2	RPKM VIG3
NGR_c19980		5,62E-06	3,95954	83,78334	77,01065	205,3218	165,3548	268,4301
NGR_c20160	<i>ilvH</i>	0,136397	1,839986	237,0693	158,6225	68,08228	75,195	67,45888
NGR_c20170	<i>ilvI</i>	0,000624	2,234669	178,9639	161,4008	52,62886	51,46673	45,26647
NGR_c20260		0,030843	9,133787	159,7589	166,5885	20,97373	0	17,31807
NGR_c20820		6,23E-05	3,263579	504,3591	436,3189	823,9978	977,628	1233,184
NGR_c21000	<i>lpxC</i>	0,001913	2,32135	173,5387	203,5383	44,9814	56,45536	57,40016
NGR_c21430		0,008985	2,202595	174,0978	169,4377	40,84937	42,29719	73,08046
NGR_c22010		1,52E-09	4,910089	348,6251	459,0439	1206,142	1326,947	1353,822
NGR_c22050		0,012895	2,209187	115,5108	149,8919	238,8437	122,1279	233,7351
NGR_c22520		0,001596	2,467339	255,1	215,298	80,5864	40,45703	72,58956
NGR_c23150		1,48E-07	3,373534	250,3691	257,3566	568,751	492,5422	642,5246
NGR_c23240		1,72E-21	8,185663	888,0857	942,3515	75,54539	63,26227	83,85246
NGR_c23310		2,35E-08	4,206998	365,1632	177,6944	880,8968	694,9473	692,723
NGR_c23460	<i>leuA</i>	1,51E-06	2,885933	245,7645	340,6589	66,15925	59,84269	75,34881
NGR_c23490		0,02042	2,988703	209,9689	199,9062	41,94747	23,16491	76,19953
NGR_c23500		0,013824	2,186242	198,8409	207,0198	59,49412	41,06851	87,72227
NGR_c24020		0,000381	2,672425	187,4182	287,2824	387,5279	416,1246	440,8654
NGR_c24250	<i>trnR3</i>	7,11E-05	3,009177	1984,686	1529,153	4610,408	2727,894	3262,995
NGR_c24610		3,02E-09	3,779428	304,0512	153,6469	580,3311	534,1331	603,4132
NGR_c24640		0,005318	2,120509	153,8052	142,2038	183,7481	165,8683	280,101
NGR_c24650		0,020839	3,086132	152,3854	349,5796	380,1086	497,1546	644,2323
NGR_c24710		0,033572	2,065769	177,9351	243,2658	54,50659	48,37582	102,8714
NGR_c25590		0,00104	2,162787	1275,826	1388,42	2110,439	1618,696	2006,625
NGR_c26700	<i>argJ</i>	0,020531	2,295605	150,3873	201,2475	34,55093	39,02784	80,39937
NGR_c26800	<i>trnL4</i>	0,016757	5,398205	839,1324	336,2763	3039,24	1941,408	1310,938
NGR_c26820		0,003235	2,22881	182,5816	218,416	279,6498	270,2573	334,8161
NGR_c26980		0,033738	2,102978	1214,548	872,1834	325,0929	239,3707	438,4359
NGR_c27460		0,004636	3,082463	179,6835	65,5777	288,9714	199,4756	272,6909
NGR_c27530	<i>trnM3</i>	0,000567	2,434788	992,343	885,2989	1570,579	1049,19	2007,997
NGR_c27590		0,010616	2,225226	514,5482	563,372	193,4437	89,02218	212,9694
NGR_c28170	<i>rpmE</i>	0,000417	2,560543	382,4345	372,1977	579,8954	582,2532	754,5064
NGR_c28250	<i>thiE</i>	0,000188	3,166734	1337,71	1482,929	418,3546	216,5145	398,8732
NGR_c28280		0,000265	2,515792	2342,081	2623,673	4013,216	4054,858	4220,833
NGR_c28410		0,000792	2,439982	197,8263	167,1276	55,54985	38,3458	56,29215
NGR_c28780		0,001913	2,065951	1020,955	997,9846	1522,587	1113,528	1535,828
NGR_c29320		3,19E-05	2,664137	595,1534	818,5954	145,1058	177,2165	198,1544
NGR_c29900	<i>bkdA2</i>	0,009082	2,154474	108,8467	124,2678	215,4462	106,2296	187,4246
NGR_c29950		0,019098	2,978364	179,3672	294,176	396,827	505,7128	468,8076
NGR_c29960		6,57E-06	3,404737	325,577	363,579	686,6268	783,7803	833,0045
NGR_c29970		4,30E-06	2,888793	165,8974	208,9441	340,787	315,7218	418,3808
NGR_c29980	<i>hmgA</i>	0,021532	3,665408	579,7168	779,5657	1337,607	1870,413	1620,041
NGR_c30010		0,00145	3,573727	1965,078	2320,448	4594,878	5034,487	5420,418
NGR_c30020		0,000973	2,45082	131,1204	159,5133	210,8711	235,6739	252,884

Nome - <i>locus_tag</i>	Abrev.	Valor de p (ajustado)	FOLD CHANGE	RPKM TEP1	RPKM TEP2	RPKM VIG1	RPKM VIG2	RPKM VIG3
NGR_c31020		0,000888	2,149298	384,2074	497,0442	150,7053	101,0588	159,9915
NGR_c31030		0,000153	2,608698	292,1306	282,0899	75,50544	63,7035	79,66314
NGR_c31090		0,000277	2,307707	230,7078	245,1145	374,5635	317,1012	399,7275
NGR_c31100	<i>atpC</i>	0,354669	1,683728	167,7046	204,0195	105,9562	39,89512	79,53486
NGR_c31110	<i>atpD</i>	0,192541	1,411943	718,6896	717,1427	336,6574	319,3187	348,0043
NGR_c31120	<i>atpG</i>	0,006368	1,825985	847,0794	836,1156	296,3432	354,171	241,0393
NGR_c31130	<i>atpA</i>	0,001104	2,093515	1034,898	1040,949	334,017	316,8142	326,3268
NGR_c31140	<i>atpH</i>	0,010973	2,365416	501,6164	367,9637	172,0068	85,48955	113,6212
NGR_c32340		0,002249	2,926646	201,153	202,5194	44,62059	44,00197	47,37003
NGR_c32610	<i>tbpA</i>	1,59E-06	3,670806	177,3916	228,8528	37,91171	31,40432	40,69495
NGR_c32660	<i>rpoH2</i>	0,000148	2,698674	122,4055	190,6065	269,9733	273,3299	286,0778
NGR_c32930		7,50E-14	4,787753	112,1098	81,09447	323,0045	246,0342	358,6733
NGR_c32950		2,52E-11	4,491862	177,2221	187,3007	595,4735	425,1056	619,8583
NGR_c33470	<i>rho</i>	4,69E-05	2,616681	231,3638	262,6993	43,14029	59,55907	83,96393
NGR_c34620	<i>tadG1</i>	0,007324	2,661705	126,0898	204,5245	45,06238	35,55011	42,52359
NGR_c34660	<i>cpaB1</i>	0,025314	2,078096	182,0782	222,7713	71,71166	39,60178	86,84505
NGR_c35670		0,003152	2,118563	278,1639	282,4885	83,35715	99,73781	73,41679
NGR_c36170		0,00614	3,374899	133,7355	90,2693	257,6956	273,6708	206,2329
NGR_c36470		0,015037	2,060113	130,6161	157,1342	36,67715	41,42955	60,56885
NGR_c36620		0,001273	2,808772	124,5207	104,662	249,6713	157,9847	240,5134